



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

MARCELA FARIAS COSTA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE DESMOGLEÍNA 1 EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

OrientadorA: Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima
Co-orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

RIO DE JANEIRO
2016



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MARCELA FARIAS COSTA

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE DESMOGLEÍNA 1 EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Oncologia.

Orientadora: Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

RIO DE JANEIRO

2016

C837a Costa, Marcela Farias.

Avaliação das alterações de desmogleína 1 em carcinoma epidermóide de esôfago. / Lilian Gonçalves dos Reis Bastos. – Rio de Janeiro, 2016.

89 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2016.

Orientador: Sheila Coelho Soares Lima.
Co-orientador: Luis Felipe Ribeiro Pinto

1. Neoplasias Esofágicas - Genética. 2. Carcinoma epidermóide - genética. 3. Desmogleína 1. 4. Expressão Gênica. 5. Metilação de DNA. I. Lima, Sheila Coelho Soares. II. Pinto, Luis Felipe Ribeiro. III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99432



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

MARCELA FARIAS COSTA

**AValiação DAS ALTERAÇÕES DE DESMOGLEÍNA 1 EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

ORIENTADOR: Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dr^a. Raquel Ciuvalschi Maia – Presidente (INCA)

Dr. Luiz Eurico Nasciutti (UFRJ)

Dr. Júlio César Madureira de Freitas (INCA)

Dr^a. Renata Binato Gomes (INCA)

Dr. André Luiz Mencialha (UERJ)

RIO DE JANEIRO

2016

AGRADECIMENTOS

No final a gente sempre se lembra do começo, hoje mais do que nunca eu sinto que tenho muito que agradecer. Não existe dentro de mim uma ordem hierárquica de agradecimento, apenas sei que ao longo dessa longa e árdua caminhada de crescimento intelectual, científico e pessoal muitas pessoas estiveram lá por mim, e por isso gostaria de dividir aquele abraço de carinho e gratidão com todos. Mas tento trazer aqui, em forma de afago, esse sentimento.

Preciso agradecer aos meus orientadores por aceitarem e acreditarem numa menina crua e desconhecida que chegou cheia de sonhos e vontade, e com muitas necessidades. Obrigada Felipe pela oportunidade, obrigada Sheila pelo crescimento.

Também preciso agradecer, obviamente, à minha família. Tenho uma família grande, de pessoas com personalidades muito diferentes e todas elas muito lindas. Ao meu pai Lázaro e minha mãe, preciso agradecer por todo o imperfeito amor do mundo. Todo o amor que vocês conseguiriam me dar, eu tive. Todo o incentivo, crença, orgulho, formação. Formação de um ser humano completo com raízes fortes e asas para voar, com um pé no chão e o coração na lua. Vocês me deram as três bases mais importantes que eu poderia ter: educação, força para lutar e dignidade. Além disso, vocês me deram a pessoa que eu mais amo, o meu grande amigo, companheiro e irmão e, como você mesmos me ensinaram: “irmãos são os amigos que estarão ao seu lado quando nós não estivermos mais lá”, a melhor parte de mim, Caio. O motivo pelo qual, eu sei que tenho que ser um exemplo, um bom ser humano, e a melhor irmã mais velha que eu conseguir. Te amo meu grande pequeno irmão. Desculpa pela minha escolha de não estar tão perto quanto eu gostaria, a vida nos dá um caminho, você também vai seguir o seu. Mas não importa onde, estaremos sempre juntos! “Quero aprender com teu pequeno grande coração, meu amor”.

Claro, também preciso agradecer ao meu pai Moacir e minha boadrasta Rita. As coisas acontecem no seu tempo certo, não é mesmo? Aconteceu no tempo certo para nós também, obrigada por todo o apoio, conselhos, todo o amor e acolhimento. Tenho muito orgulho de saber que tenho casa no coração de vocês. Obrigada por minhas lindas irmãs. Andrea, Camila e Renata, três grandes mulheres, fortes por natureza, exemplos. Obrigada minha irmãzona Rê, você que dividiu tanto comigo, continuaremos nas nossas caminhadas juntas também! Você, que mesmo mais nova, é tão mais pronta que eu, me deu tanto. Quero continuar aprendendo de você.

No Rio eu fiz amigos e amores. Quanto aos meus grandes colegas de trabalho, aqueles que estão conosco no dia a dia, alguns viraram grandes amigos e outros, improvavelmente, criei um carinho imenso. Tenho tanto a agradecer a vocês, vocês nem sabem o quanto! Aprendi a dividir, multiplicar, organizar, questionar. Aprendi também a rever erros, reavaliar posturas, pedir desculpa, não invadir o espaço do outro, e hoje tenho certeza que nos levaremos para onde formos, e torcemos uns pelos outros. Obrigada principalmente: Isabela (não esqueça que eu acredito em você), Marina (obrigada pela doçura, minha princesa!), Leão (adoravelmente desagradável), Ricardo e até a Vanessinha que me ajudou a me organizar. Todos os meus outros colegas e amigos dos outros andares, todo o pessoal do PHOP (um adendo para Rafa Montaze, Eugênia, Júlio Show, Priscila), e preciso abrir um espaço especial para minha grande amiga Elda: grande guerreira de sorriso e coração abertos. Obrigada por abrigar a mim e a minha família quando a gente mais precisou, te amo! Além do pessoal do quarto andar, grandes amigos de copa e de vida, por todo amor, cafés, dúvidas, conselhos pessoais e científicos, carinho e desabafos: Marion, Mirela, Raíssa e todos os outros. Hector e Miguel, obrigada pelo apoio, preocupação, conselhos, papos, Whiskey e Whisky, aulas de latim e muito mais.

Aos meu grandes amigos que deixei na Bahia (que saudades diárias de vocês), obrigada pelos passeios no rio, pelos choros no telefone, por comemorarem comigo todas as pequenas conquistas e por estarem a meu lado, mesmo com a distância. Amo todos vocês!

Em tempo, preciso agradecer à minha grande pequena companheira, amiga, parceira, que esteve ao meu lado e que, quantas vezes me deu a mão, o ombro, o coração, o amor e o conselho. Obrigada minha princesa, minha namorada, pelo crescimento em todas as formas possíveis. Por nós, Quincas, Marieta, Puda, Richard, por dividir seus amigos comigo, seu amor e aconchego. E também o crescimento. Não importa o que acontecer, sou sua maior fã!

Por último e não menos importante, preciso agradecer e deixar aqui meu manifesto de respeito para pessoas que deram para mim, pelo simples ato de doar, tempo e atenção. Sem nenhuma obrigação nem pretensão Laim Carvalho, Érico Costa e Mariana Lemos.

EPÍGRAFE

*O que será que será
Que dá dentro da gente e que não devia
Que desacata a gente, que é revelia
Que é feito uma aguardente que não sacia
Que é feito estar doente de uma folia
Que nem dez mandamentos vão conciliar
Nem todos os unguentos vão aliviar
Nem todos os quebrantos, toda alquimia
Que nem todos os santos, será que será
O que não tem descanso, nem nunca terá
O que não tem cansaço, nem nunca terá
O que não tem limite*

O Que Será (À Flor da Pele)
Chico Buarque

ÍNDICE	
AGRADECIMENTOS	iv
EPIGRAFE	vi
O Que Será (À Flor da Pele).....	vi
Chico Buarque	vi
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer de Esôfago	1
1.1.1. Adenocarcinoma de esôfago.....	3
1.1.2. Carcinoma epidermóide de esôfago	4
1.2. Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica.....	6
1.2.1. Modificações de histonas.....	6
1.2.2. RNAs não codificantes	7
1.2.3. Metilação do DNA	8
1.2.3.1. Metilação do DNA e câncer	9
1.3. Adesão celular	10
1.3.1. Junções oclusivas (<i>tight</i>).....	11
1.3.2. Junções comunicantes (GAP).....	12
1.3.3. Junção aderente.....	12
1.3.4. Adesão desmossomal.....	13
1.3.5. DSG1	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivo geral	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Amostras humanas.....	18
3.1.1. Biópsias de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago	18
3.1.2. Amostras cirúrgicas de CEE armazenadas em parafina	18
3.1.3. Extração de RNA.....	19
3.1.4. Quantificação de RNA.....	19
3.1.5. Reação de transcrição reversa.....	19
3.1.6. PCR em tempo real.....	20
3.1.7. Reação de PCR para amplificação de isoforma de <i>DSG1</i>	22
3.1.8. Extração de DNA.....	23
3.1.9. Quantificação de DNA	23
3.1.10. Tratamento com bissulfito de sódio.....	23
3.1.11. Reação de PCR para pirosequenciamento	24
3.1.12. Pirosequenciamento	24
3.1.13. Imunohistoquímica	25
3.2. Experimentos <i>in vitro</i>	27
3.2.1. Linhagens celulares	27
3.2.2. Cultivo da linhagem OE-21	27
3.2.3. Tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina	28
3.2.4. Contagem e avaliação da viabilidade celular	29
3.2.5. Extração de RNA.....	29
3.2.6. Extração de DNA.....	30
3.2.7. Extração e quantificação de proteínas totais.....	30
3.2.8. Western blotting	31

3.2.9. Imunofluorescência	32
3.3. Análises estatísticas	33
4. RESULTADOS	35
4.1 Informações clínico-patológicas dos pacientes com CEE.....	35
4.2 Análise de expressão gênica e metilação de <i>DSG1</i> em pacientes com CEE.....	37
4.3 Análise da expressão proteica de <i>DSG1</i> dos pacientes com CEE.....	43
4.4 Análise da expressão da isoforma de <i>DSG1</i>	49
4.5 Análise de expressão gênica e perfil de metilação de <i>DSG1</i> em linhagem de CEE humano frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina	50
4.6 Análise da expressão proteica de <i>DSG1</i> em linhagem de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina	55
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÕES	67
7. PERSPECTIVAS	69
8. BIBLIOGRAFIA	70
9. ANEXOS	82
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA	84
OBJETIVOS DO PROJETO DE PESQUISA	84
PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA	84
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA	85
MÉTODOS ALTERNATIVOS	85
RISCOS	85
BENEFÍCIOS	85
CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS	85
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA	86
CUSTOS.....	86
BASES DA PARTICIPAÇÃO.....	86
GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS.....	86
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA	87
DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA.....	87
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição geográfica da incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos. Azul mais escuro representa regiões de alta incidência e azul mais claro, regiões de baixa incidência. ASR: Taxa ajustada por idade. Adaptado de GLOBOCAN, 2012 – IARC..... 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Padrões de classificação de marcação de DSG1 de acordo com percentual de células marcadas.	27
Tabela 4.1: Dados Clínico-patológicos dos indivíduos incluídos no estudo.	36
Tabela 4.2: Dados Clínico-patológicos dos indivíduos incluídos no estudo e relação entre os valores de expressão e metilação de <i>DSG1</i>	39
Tabela 4.3: Quantificação do percentual de células marcadas por lâmina em CEE.	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1: Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>DSG1</i> e <i>GAPDH</i> (gene-referência).....	21
Quadro 3.2: Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene <i>DSG1</i> para posterior sequenciamento técnica de pirosequenciamento.	24
Quadro 3.3: Descrição das linhagens celulares provenientes de tecido esofágico utilizadas.	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Acetil
ADE – Adenocarcinoma de Esôfago
APS - Adenosina 5' fosfossulfato
ATP – Adenosina trifosfato
BNT – Banco Nacional de Tumor
cDNA – DNA complementar
CE – Câncer de Esôfago
CEE – Carcinoma Epidermóide de Esôfago
CO₂- Dióxido de carbono
DAB - Diaminobenzidina
DAPI - 4'6'-diamidino-2-fenilindol
DIPAT – Divisão de Patologia
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
DNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DP - Desmoplaquina
DSC - Desmocolina
DSG - Desmogleína
EC - Extracelular
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR – Fator de crescimento epidermal
FFPE – Fixada em formalina incluída em parafina
GAPDH - Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
HCL – Ácido clorídrico
HCPA – RS – Hospital das Clínicas de Porto Alegre
HDAC – Histona Deacetilase
IHQ - Imunohistoquímica
IL - Interleucina
INCA – Instituto Nacional de Câncer
KDa - Kilodanton
LINE - Elementos nucleares intercalados longos
Me - Metil
miRNA – Micro RNA
P – Fosfato

PCDH17 – Protocaderina 17
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PCRq - PCR quantitativo
PG - Placoglobina
PP - Periplaquina
PPi - Pirofosfato
PPL - Periplaquina
RNAm – Rna Mensageiro
RPM – Rotação por minuto
RT – Transcriptase reversa
SAM – S –Adenosil Metionina
SBF – Soro Bovino Fetal
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SINE - Elementos nucleares intercalados curtos
SV40 - Vírus vacuolante símio 40
TOQ – Tumor Odontogênico queratinocístico
TP53 – Tumor Protein 53
TTBS – Tampão salina tris
UTR – Região não codificante

Avaliação das alterações de Desmogleína 1 em Carcinoma Epidermóide de Esôfago

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcela Farias Costa

O câncer de esôfago (CE) é um dos dez tipos de tumores mais frequentes e apresenta uma sobrevida em cinco anos inferior a 20% no Brasil e no mundo. Esta alta letalidade está relacionada ao diagnóstico tardio da doença, o que resulta em um tratamento pouco eficaz. Dentre os diferentes tipos histológicos de CE, o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) corresponde a mais de 80% dos casos de câncer de esôfago no Brasil. Frente a tal panorama, a identificação de potenciais biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce de CEE é fundamental. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o objetivo de elucidar o papel das alterações epigenéticas na iniciação e progressão tumoral, e em estudo do nosso grupo, foi observado que alterações no padrão de metilação do DNA são comuns em CEE. As principais vias celulares afetadas foram as de componentes inflamatórios e adesão/diferenciação celular. Dentro desta última via, destacou-se o gene *Desmogleína 1 (DSG1)*, que codifica uma caderina desmossomal de mesmo nome, já relacionada à diferenciação celular em pele. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de alterações de DSG1 em CEE. Nas análises realizadas em amostras humanas, observamos que os tumores apresentam uma hipermetilação da região promotora e menores níveis de expressão gênica de *DSG1* em comparação ao tecido adjacente não tumoral pareado. Além disso, menores níveis de metilação foram observados em indivíduos com idade acima da mediana e tumores moderadamente diferenciados. O nível de metilação de *DSG1* no tumor se mostrou ainda um fator de prognóstico independente da idade em CEE, sendo que pacientes com maiores níveis de metilação no tumor apresentaram uma sobrevida média global de 6 meses, enquanto entre indivíduos com baixos níveis de metilação essa sobrevida foi de 15,5 meses. Para confirmar a correlação inversa entre expressão gênica e os níveis de metilação de *DSG1* observada nas amostras humanas, realizamos o tratamento com o agente desmetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina (5-Aza) na linhagem derivada de CEE OE-21 com diferentes doses e por diferentes períodos de tempo. No tratamento com 5-Aza a 100 nM por até 120h, foi observada uma perda de metilação tempo dependente, sendo esta mais marcante a partir do tempo de 48 horas. Já a expressão gênica de *DSG1* apresentou indução máxima no tempo de 72 horas, acompanhada de um aumento de expressão proteica. Finalmente, avaliamos a expressão proteica de DSG1 em 48 amostras de tecido tumoral e normal adjacente conservadas em parafina de 25 pacientes. O tecido normal apresentou o padrão já descrito para epitélios: expressão predominantemente membranar, mais proeminente nas camadas mais diferenciadas. Já o tecido tumoral apresentou áreas em que a expressão de DSG1 foi perdida e áreas em que a marcação foi observada principalmente no citoplasma, com marcação membranar menos frequente. As regiões que mantiveram marcação membranar foram aquelas consideradas de maior grau de diferenciação. Nossos dados sugerem ainda que a localização citoplasmática de DSG1 pode ser consequência da expressão de uma isoforma menor, transcrita a partir do mesmo gene, mas que não possui os domínios extracelulares e transmembrana. Em conclusão, a redução de expressão gênica de *DSG1* parece estar relacionada à hipermetilação de seu promotor em CEE, enquanto o padrão de expressão proteica é bastante heterogêneo nestes tumores e parece estar associado ao grau de diferenciação.

ABSTRACT

Evaluation of desmoglein 1 alterations in Epidemóide esophageal squamous cell carcinoma

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcela Farias Costa

Esophageal cancer (EC) is one of the ten most frequent tumors worldwide and in Brazil, showing a five-year overall survival lower than 20%. Such a high lethality is directly associated with a late diagnosis, which results in a poor treatment. Among the different histological subtypes of EC, esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) corresponds to more than 80% of the cases. Based on this, the identification of biomarkers that could anticipate ESCC diagnosis is of utmost importance. Several studies have tried to elucidate the role of epigenetic alterations on tumor initiation and progression and our group has already shown that alterations of DNA methylation patterns are common events in ESCC. Among the cellular pathways found to be altered in this study, inflammatory components and cell adhesion and differentiation were the most significant. One of the genes found to be hypermethylated in tumors was *Desmoglein 1 (DSG1)*, which encodes a desmosomal protein and has already been implicated in cellular differentiation in skin keratinocytes. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the presence of DSG1 molecular alterations in ESCC. The evaluation of human samples showed that ESCC presents *DSG1* hypermethylation and a downregulation of its expression in comparison with the paired non-tumor surrounding tissue. Also, lower *DSG1* methylation levels were observed in moderately differentiated tumors and in the tumor tissue of older individuals. *DSG1* promoter methylation in tumors was also found to be a prognostic factor in ESCC, with individuals with high levels showing a mean overall survival of 6 months, while patients that presented low methylation levels showed a mean overall survival of 15.5 months. In order to confirm the inverse correlation between *DSG1* methylation and gene expression observed in human samples, we treated OE-21 ESCC cells with 5-Aza-2'-deoxycytidina (5-Aza) in different doses for different periods of time. After the treatment with 5-Aza 100 nM for up to 120h, we observed a time-dependent *DSG1* demethylation. Furthermore, after 72h of treatment, we observed a maximal induction of *DSG1* gene expression, followed by the upregulation of its protein levels. Finally, we evaluated DSG1 protein expression in 48 samples, both FFPE normal and tumor tissue, from 28 ESCC patients. The non-tumor surrounding tissue showed the DSG1 expression pattern already described to other types of epithelium: a predominant membrane expression, especially in differentiated cells. The tumor tissue, on the other hand, showed a heterogeneous expression, with regions where DSG1 was totally absent and areas with a strong cytoplasmic staining. The membrane staining was less frequent and usually associated with higher differentiation. Our data also suggest that the presence of DSG1 in the cytoplasm could be a consequence of the expression of a smaller isoform encoded by the same gene, but which lacks the extracellular and transmembrana domains. In conclusion, this is the first study to show that the downregulation of *DSG1* expression might be a consequence of its promoter hypermethylation in ESCC. Also, we showed that DSG1 protein expression pattern is very heterogeneous in this type of cancer and might be associated with cellular differentiation.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de Esôfago

O câncer de esôfago (CE) é uma doença que possui ampla distribuição geográfica no mundo, podendo alcançar diferenças de até dezesseis vezes entre regiões de alta e baixa incidência. As regiões com as maiores taxas de incidência incluem o leste da África, centro-sul da Ásia (por esse motivo denominado cinturão asiático do câncer de esôfago), Japão e Sul da América do Sul, incluindo o Brasil e o Uruguai (Figura 1.1) (JEMAL et al., 2011; PARKIN et al., 2009).

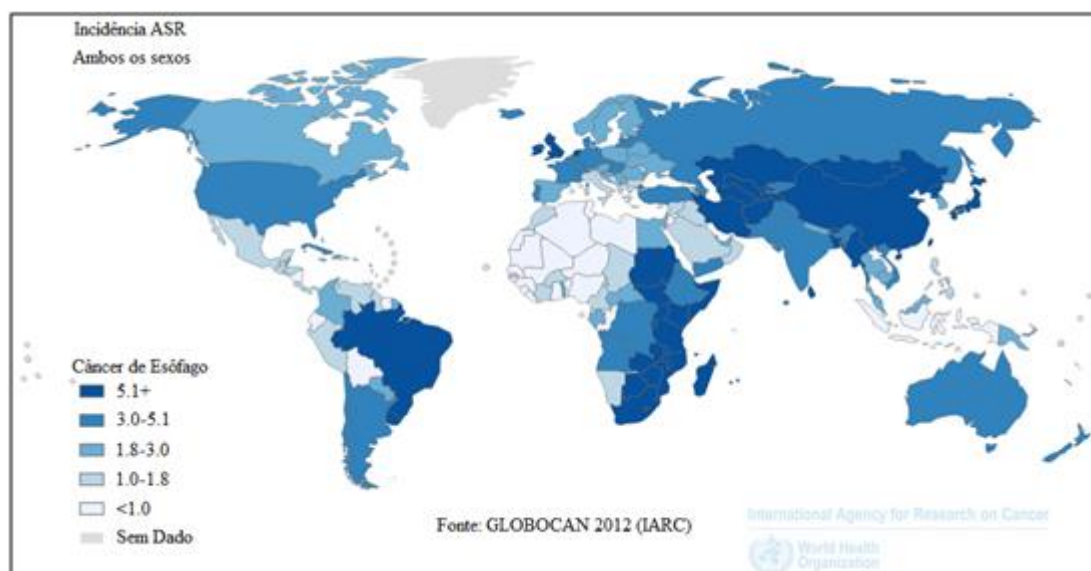


Figura 1.1: Distribuição geográfica da incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos. Azul mais escuro representa regiões de alta incidência e azul mais claro, regiões de baixa incidência. ASR: Taxa ajustada por idade. Adaptado de GLOBOCAN, 2012 – IARC.

A despeito das variações geográficas de incidência, o CE é responsável por 7% de todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal, além de ser o oitavo tipo de câncer mais frequente em todo o mundo e a sexta causa mais comum de morte por câncer (FERLAY et al., 2012; LEHRBACH; NITA; CECCONELLO, 2003; OHASHI et al., 2015). Dados ainda mais alarmantes chamam atenção para a gravidade e extensão da doença:

- Menos de 20% dos casos têm uma sobrevida maior que cinco anos após o diagnóstico (COHEN; AJANI, 2011);
- A incidência tende a aumentar, sendo que entre 2012 e 2025 são esperados mais de 640 mil novos casos em ambos os sexos (FERLAY et al., 2012);
- A cada 100 casos diagnosticados da doença, são observadas 87 mortes (COHEN; AJANI, 2011).

Todos estes dados trazem à tona a realidade desta neoplasia: é uma doença agressiva e com alta letalidade, sendo este panorama observado tanto no Brasil quanto no mundo (Figura 1.2) (DA COSTA et al., 2013; MCLARTY et al., 1997; OHASHI et al., 2015; RIBEIRO PINTO et al., 2003).

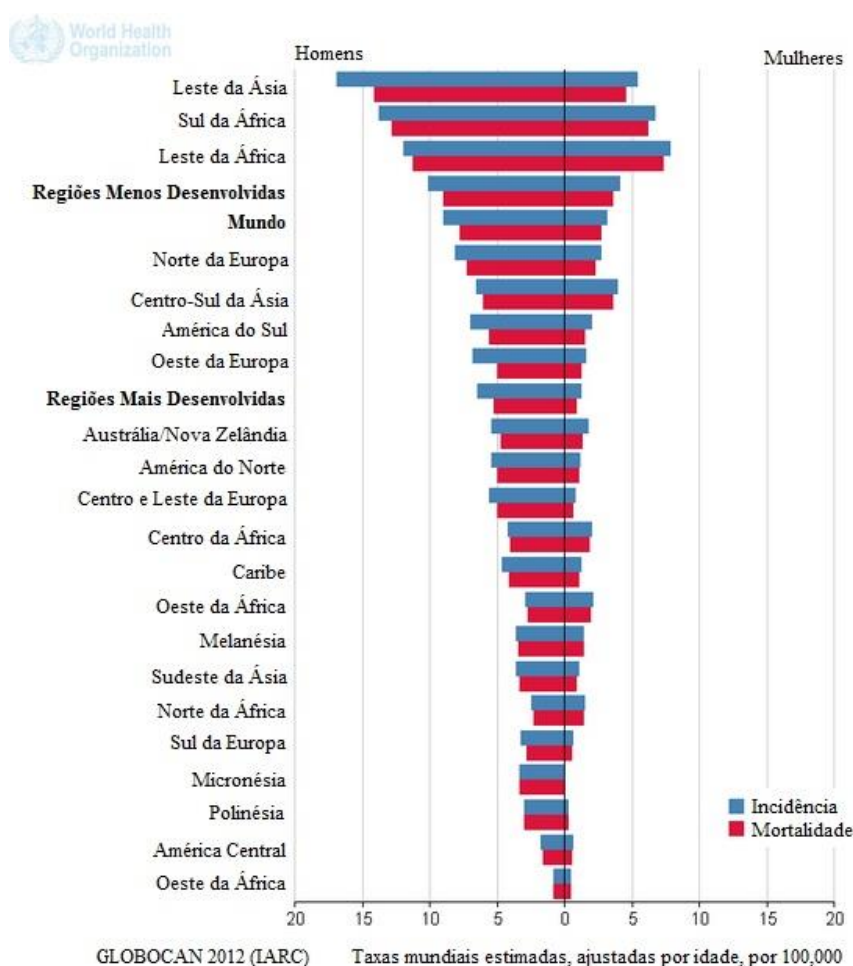


Figura 1.2: Gráfico representando as taxas de incidência e mortalidade de câncer de esôfago por sexo e região mundial, ajustadas por idade. As barras azuis representam as taxas de incidência mundiais estimadas, ajustadas por idade, por 100.000 habitantes. As barras vermelhas representam as taxas de mortalidade mundiais estimadas, ajustadas por idade, por 100.000 habitantes. Adaptado de GLOBOCAN, 2012 – IARC.

Usualmente, variações de incidência pontuais dentro de uma mesma área geográfica (Figura 1.1) tendem a indicar uma relação da gênese da doença com uma etiologia multifatorial, muitas vezes relacionada com hábitos culturais de consumo e exposição a carcinógenos, e fatores socioeconômicos como dificuldade no acesso a exames e tratamento adequados. Isto pode ser observado de forma clara quando se observa a diferença de incidência deste tumor entre regiões mais e menos desenvolvidas do mundo (Figura 1.2) (LAYKE; LOPEZ, 2006; RIBEIRO PINTO et al., 2003).

Além disso, tal diferença também pode ser explicada pela incidência diferenciada dos tipos histológicos de CE. Existem dois subtipos histológicos mais frequentes de câncer de esôfago: o adenocarcinoma de esôfago (ADE) e o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE). Apesar de acometerem o mesmo órgão, o ADE e o CEE diferem em suas principais características: distribuição geográfica, características clínicas, etiologia, população acometida, entre outros aspectos (QUEIROGA; PERNAMBUCO, 2005; HONGO; NAGASAKI; SHOJI, 2009).

1.1.1. Adenocarcinoma de esôfago

O ADE é mais incidente em regiões desenvolvidas, como Europa Ocidental e os Estados Unidos devido, principalmente, aos hábitos destas populações. Notadamente, o consumo de alimentos ricos em gordura e o aumento da média de peso dessas populações, caracterizando obesidade, parecem ser os fatores mais relevantes neste cenário. Recentemente, uma rápida mudança na incidência deste tumor vem acontecendo: seu aumento em países em desenvolvimento, pela adoção dos mesmos hábitos (FALK, 2009). Apesar disso, o CEE ainda corresponde a mais de 80% dos casos de CE. O principal fator de risco para o desenvolvimento do ADE é o esôfago de Barrett, condição pré-maligna na qual o epitélio normal do esôfago é substituído por um epitélio metaplásico colunar (SPECHLER et al., 1994). O esôfago de Barrett se origina principalmente em pacientes que sofrem de refluxo gastroesofágico crônico, condição que aumenta em mais de cem vezes a chance de desenvolver ADE (THOMAS; SOBIN, 1995). Além disso, o tabagismo foi identificado como fator de risco para o ADE, mas o etilismo mostrou estar pouco relacionado à gênese da doença (TOH et al., 2010).

1.1.2. Carcinoma epidermóide de esôfago

A história natural proposta para o desenvolvimento de CEE se baseia no modelo de exposição de longo prazo aos agentes etiológicos e transformação neoplásica na mucosa esofágica, que é raramente detectada nos estádios iniciais quando a terapia curativa é possível (mucosectomia para excisão do tumor *in situ* - tratamento primário) (CHEN et al., 1999). Nos estádios avançados, a quimiorradioterapia seguida ou não por esofagectomia são os procedimentos empregados (Figura 1.3) (DA COSTA et al., 2013).

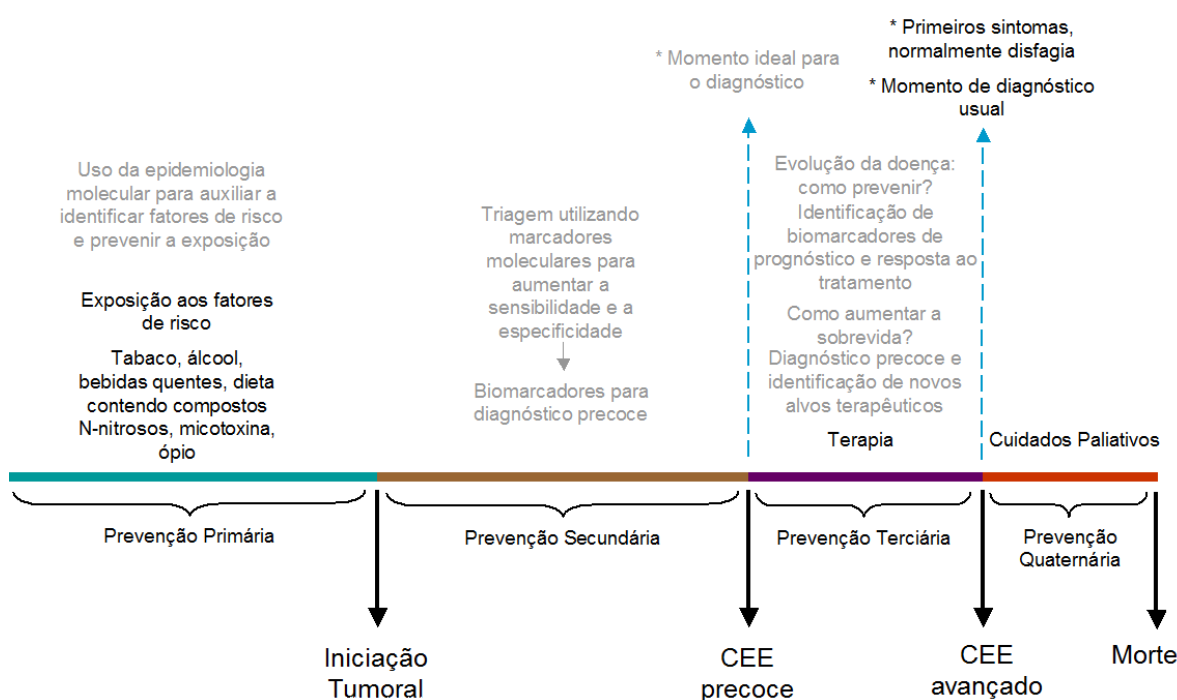


Figura 1.3: História natural do CEE. Progressão de CEE ao longo do tempo e os diferentes momentos de intervenção para a prevenção e o diagnóstico da doença. Adaptado de da Costa et al., 2013.

Diversos estudos epidemiológicos apontam que o etilismo e o tabagismo são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de CEE. Em países ocidentais, o consumo concomitante desses dois fatores representa um risco multiplicador (CASTELLSAGUÉ et al., 1999; IARC, [s.d.]). Além disso, há a sugestão de que o fumo tenha um papel importante tanto na iniciação quanto na promoção do tumor, enquanto o álcool teria um papel mais relevante na promoção. Isso porque após dez anos de abstinência de álcool, o risco retorna aos valores dos abstêmios, enquanto após dez anos sem tabaco o risco diminui apenas 50% (CASTELLSAGUÉ et al., 1999).

Todavia, há outros fatores que contribuem para a gênese do CEE. A contaminação de alimentos por nitrosaminas, carcinógenos que apresentam tropismo pelo esôfago (FORREST, 1993), desnutrição e o consumo de chá quente estão envolvidos na etiologia deste câncer em alguns países, como a China e a Índia. No Irã, além da desnutrição e da ingestão de chá quente, o consumo de ópio é um importante fator de risco para o desenvolvimento de CEE. No Japão, apenas o consumo de chá quente parece ter relação direta (SEPEHR et al., 2001; TUYNS, 1979). Já na região sul do Brasil, área de alta incidência, além do consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, há também o consumo do “chimarrão” (chá da erva mate consumido em torno de 70°C), que vem sendo associado ao desenvolvimento do CEE (CASTELLSAGUÉ et al., 1999, 2000).

Apesar de sua alta incidência e mortalidade, o CEE ainda é um tumor negligenciado e muito pouco se conhece acerca dos mecanismos moleculares que levam ao seu desenvolvimento. Alguns fatores genéticos já relacionados ao desenvolvimento de CEE incluem mutações em *TP53* (DA COSTA et al., 2013; RIBEIRO PINTO et al., 2003), com uma variação em prevalência entre 59% - 93% dos pacientes, dependendo da região geográfica. Modificações da via de sinalização de EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) já foram descritas em populações asiáticas, com a superexpressão de *EGFR* sendo observada em 59,6% - 76% dos casos (ZHANG et al., 2014). Já no Brasil, foi observado um aumento na expressão do RNAm de *EGFR* em 11% dos casos, mas com expressão proteica aumentada em apenas 4% dos casos (GONZAGA et al., 2012), reiterando as diferenças entre populações.

Mais recentemente, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de elucidar o papel das alterações epigenéticas na iniciação e progressão do carcinoma epidermóide de esôfago no mundo (KISHINO et al., 2016; KOMATSU; SASAKI, 2014; LI et al., 2014a; SINGH et al., 2015; WU et al., 2006). No Brasil, em estudo do nosso grupo, também foi observado que alterações no padrão de metilação do DNA são comuns em CEE (LIMA et al., 2011). Além disso, como principais vias celulares afetadas, foram encontradas o componente inflamatório e adesão/diferenciação celular. Dentro desta última via, destacou-se o gene que codifica a Desmogleína 1 (*DSG1*), encontrado hipermetilado na sua região promotora em tumores em comparação com o tecido normal adjacente.

1.2. Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica

A epigenética se refere ao estudo das alterações herdáveis que regulam a expressão gênica sem o envolvimento de modificações na sequência do DNA. O termo foi originalmente proposto em 1939 pelo embriologista Conrad Hal Waddington, em que descrevia a interação causal entre genes e seus produtos levando à existência de diversos fenótipos, e a sua relação com o ambiente (ESTELLER, 2008). Entre alguns dos principais mecanismos epigenéticos conhecidos estão as modificações de histonas, os RNAs não codificantes e a metilação do DNA.

1.2.1. Modificações de histonas

As histonas são proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA no núcleo das células e compõem os nucleossomos, octâmeros constituídos por duas unidades das histonas H2A, H2B, H3 e H4. Entretanto, já se sabe que essas proteínas possuem papel além do empacotamento do DNA, como estruturas que participam da regulação da expressão gênica. As histonas podem sofrer modificações covalentes em suas caudas, como: acetilação, metilação, sumoilação, ubiquitinação e fosforilação. O balanço das modificações destas proteínas é essencial no controle da expressão gênica. Um exemplo é a acetilação e a desacetilação: a acetilação das histonas é realizada pelas histona acetil-transferases (HATs), enquanto a desacetilação de histonas é catalisada pelas enzimas histona desacetilases (HDACs) (PASTORE; LEVINE, 2016). Quando não acetiladas, as caudas das histonas apresentam carga positiva, fazendo com que a interação com o DNA, que possui carga negativa, seja forte. Nestes casos, geralmente temos a formação de heterocromatina e o silenciamento gênico. Já quando as histonas são acetiladas, suas caudas perdem a carga positiva, o que torna a interação com o DNA mais fraca, levando à formação de eucromatina. Esta conformação da cromatina é mais acessível e está geralmente associada à transcrição ativa de genes (Figura 1.4).

Heterocromatina: Cromatina fechada, repressão da transcrição Eucromatina: Cromatina aberta, ativação da transcrição

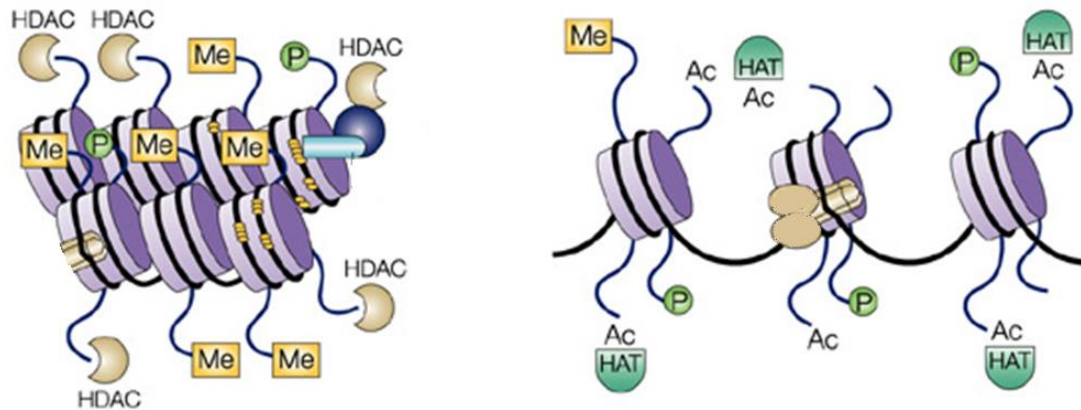


Figura 1.4: Estados de permissividade (eucromatina) e resistência (heterocromatina) da cromatina, e a interação de modificações epigenéticas na regulação da transcrição gênica. Na formação da heterocromatina, temos a atuação das HDACs, que levam à desacetilação das caudas das histonas, deixando-as com carga positiva e permitindo assim a interação forte com o DNA, que possui carga negativa. Já a eucromatina está associada à acetilação das histonas pelas HATs, que bloqueia a carga positiva das caudas dessas proteínas, diminuindo a interação entre histonas e DNA. As caudas das histonas podem ainda sofrer outras modificações covalentes, como metilação e fosforilação, também envolvidas na manutenção dos estados da cromatina. Adaptado de Johnstone, 2002. *Legenda:* HDAC = *Histona desacetilases*; HAT = *Histona Acetiltransferase*; Ac = *Radical Acetil*; Me = *Radical Metil*; P = *Fosfato*.

Outro exemplo é a metilação de histonas, que leva a diferentes conformações da cromatina dependendo do resíduo modificado (lisina ou arginina) e também da posição do aminoácido (ESTELLER, 2008). Estas modificações podem aumentar ou diminuir a afinidade do octâmero de histonas pela molécula de DNA através da modificação da carga dos resíduos de histona. Com isso, o DNA pode ficar mais ou menos acessível a fatores de transcrição e proteínas corregulatórias, ou ainda, a metilação sofrida pelas histonas pode servir de substrato para ligação de complexos regulatórios, regulando assim a expressão gênica (VALLASTER; VALLASTER; WU, 2012).

1.2.2. RNAs não codificantes

A classe de RNAs reguladores da expressão gênica é composta por mais de um tipo de RNA, como os longos RNAs não codificantes e microRNAs, que foram conservados ao longo da evolução por diversas atuações além da regulação da expressão gênica, como pela manutenção da estabilidade genômica, defesa contra elementos genéticos exógenos e outros (HOLOCH; MOAZED, 2015). A regulação da expressão gênica por RNAs não codificantes pode ser dar por diferentes mecanismos, como: recrutamento de complexos modificadores de cromatina (HOLOCH; MOAZED, 2015), indução de modificações de histona ou metilação do

DNA (EGGER et al., 2004). Entretanto, o mecanismo mais conhecido e estudado é aquele mediado por microRNAs, pequenos RNAs não codificantes de 19 a 24 nucleotídeos de tamanho que regulam negativamente a expressão proteica. Sua função se dá pela ligação ao RNAm e resulta em sua clivagem direta ou inibição da tradução (Figura 1.5) (HUMPHRIES; WANG; YANG, 2016).

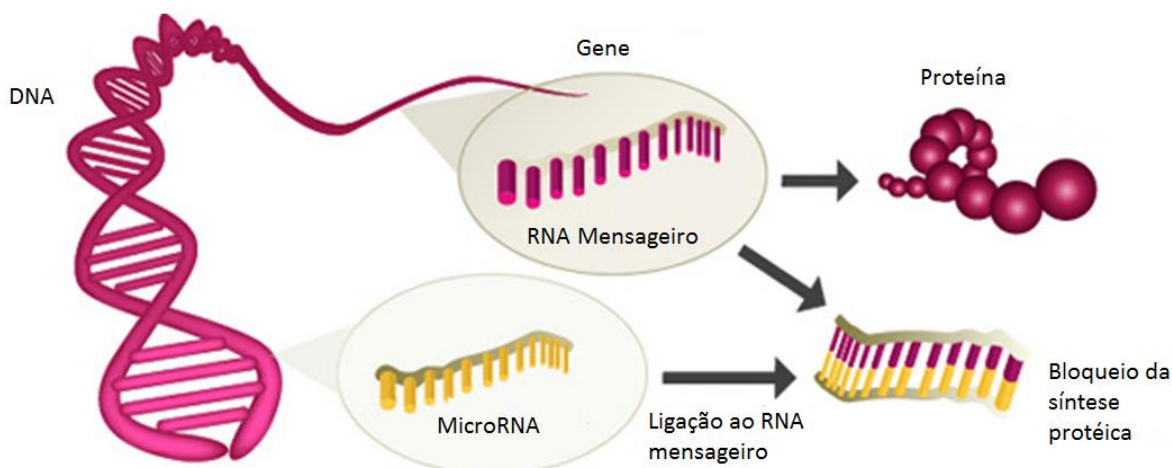


Figura 1.5: Interação dos microRNAs com o RNAm resultando na regulação da síntese proteica. Na ausência de miRNAs que tenham um determinado RNAm como alvo, este pode ser traduzido em proteína normalmente. Já quando o miRNA está presente, este se liga ao RNAm alvo por complementariedade e pode levar ao bloqueio da tradução. Adaptado de: <<http://www.longevinex.com/articles/micrnas-aging-and-resveratrol/>>. Acesso em 26 de fevereiro de 2016.

1.2.3. Metilação do DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais estudada e conhecida. O DNA é metilado a partir da adição covalente de grupos metil em dinucleotídeos CpG, reação catalisada pelas enzimas DNA metil-transferases. Em humanos, são conhecidas cinco DNMTs. A DNMT1 é a metil-transferase de manutenção, uma hemi-metilase envolvida no processo de metilação durante a replicação do DNA e responsável pela cópia do padrão de metilação da fita original. Já a DNMT2 é uma RNA metil-transferase, e por fim, as DNMTs da classe três (DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L) estão relacionadas à aquisição de metilação *de novo* do DNA durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, a DNMT3L não possui atividade catalítica, sendo um cofator das outras enzimas dessa classe (MÜLLER et al., 2015). As DNMTs usam como doador de grupamentos metil a molécula S-adenosilmetionina (SAM; Figura 1.6). Já se sabe que a metilação do DNA regula diferentes funções fisiológicas, como a inativação do cromossomo X, o imprinting genômico e a supressão de elementos

transponíveis. Uma vez que este mecanismo tem papel crítico na manutenção da homeostase celular e na regulação da transcrição, um padrão de metilação do DNA aberrante tem sido relacionado ao desenvolvimento de uma série de doenças, incluindo o câncer (ESTELLER, 2008).

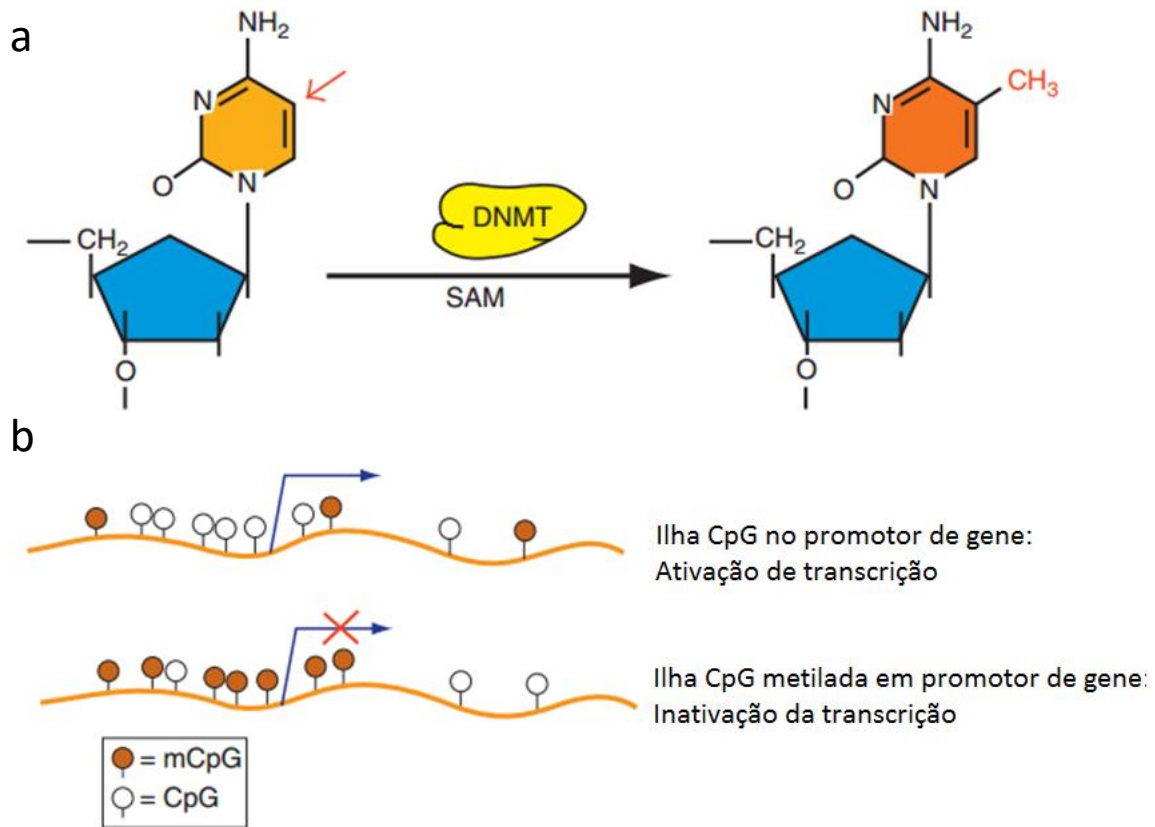


Figura 1.6: Mecanismo de metilação de citosinas. (A) Adição do radical metil no carbono 5 do anel das citosinas catalisada pela DNMT, tendo como doador do radical metil a molécula S-adenosilmetionina (SAM). (B) Regulação da transcrição pela metilação da região promotora de genes, em que as citosinas metiladas impedem a ligação de fatores de transcrição. Adaptado de: Kulis; Esteller, 2010. *Legenda: mCpG = CpG metilada; CpG = CpG não metilada.*

1.2.3.1. Metilação do DNA e câncer

Já foi demonstrado que, durante a evolução tumoral, acontecem modificações nos padrões de metilação do DNA. De maneira geral, é observada uma hipometilação global do genoma, incluindo elementos transponíveis como SINE (*short interspersed elements*) e LINE (*long interspersed elements*), o que leva ao aumento da instabilidade genômica. Além disso, também é observada a hipermetilação de promotores de genes supressores de tumor, geralmente associada ao silenciamento destes genes. Isto porque as citosinas metiladas

recrutam proteínas que se ligam ao DNA metilado (MBDs), bloqueando a ligação de fatores acessórios à transcrição e da própria RNA polimerase, além de recrutarem modificadores de histonas que levam à formação de heterocromatina. Estes mecanismos parecem contribuir para a perda da homeostase do tecido e para a progressão tumoral (Figura 1.7) (BABA; WATANABE; BABA, 2013).

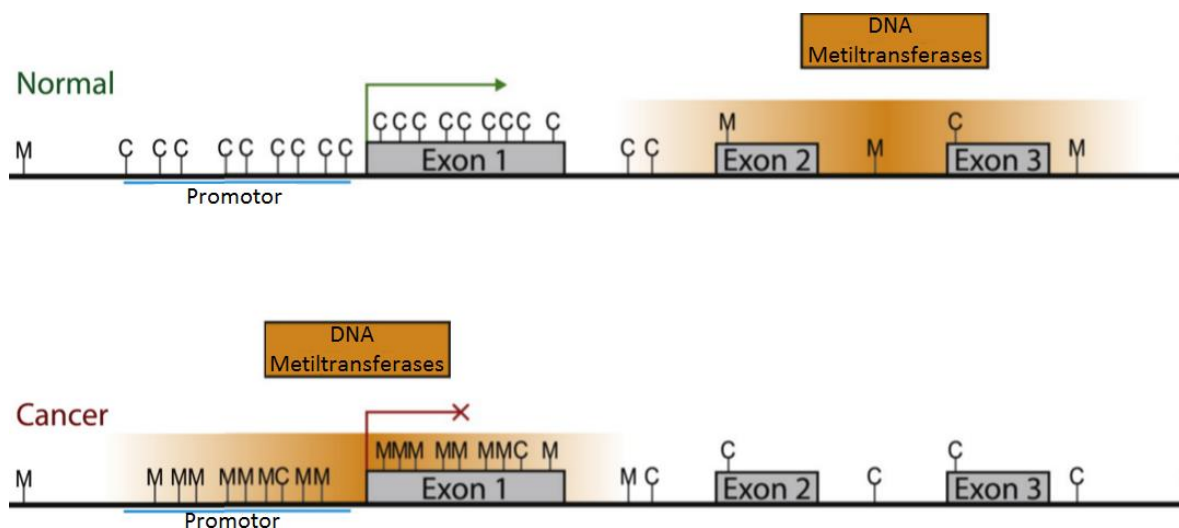


Figura 1.7: Perfis de metilação da região promotora e do corpo de genes supressores de tumor em células normais e tumorais. Adaptado de: <http://www.ous-research.no/>, acessado em 25 de fevereiro de 2016.

Entre os genes cuja expressão já foi encontrada desregulada por metilação em câncer, estão aqueles que codificam moléculas de adesão. Já foram encontrados padrões de metilação aberrantes regulando E-caderina em tumores de cólon e rim (KIM et al., 2016) e a regulação das caderinas desmossomais desmocollinas 1, 2 e 3 no câncer de pulmão (CUI et al., 2012), por exemplo. Além disso, conforme citado anteriormente, nosso grupo já mostrou uma hipermetilação de *DSG1* em CEE, porém os efeitos dessa alteração epigenética sobre a expressão dessa caderina ainda não foram avaliados.

1.3. Adesão celular

A expressão das proteínas de adesão é um processo extremamente complexo e que cada dia mais tem sido visto como responsável por diversos papéis, além da adesão. Possivelmente, o primeiro grande marco na evolução das espécies é a multicelularidade, uma vez que este evento demandou a aquisição de uma série de características como adesão,

cooperação e especialização celulares (NIKLAS, 2014). Hipotetiza-se que as bases moleculares da execução destas características em diferentes formas de vida (bactérias, plantas, fungos e animais) evoluíram simultaneamente culminando na atual diversidade de formas de adesão e comunicação celulares (NIKLAS, 2014): as junções dos tipos Gap e Tight, as junções aderentes e os desmossomos (Figura 1.8).

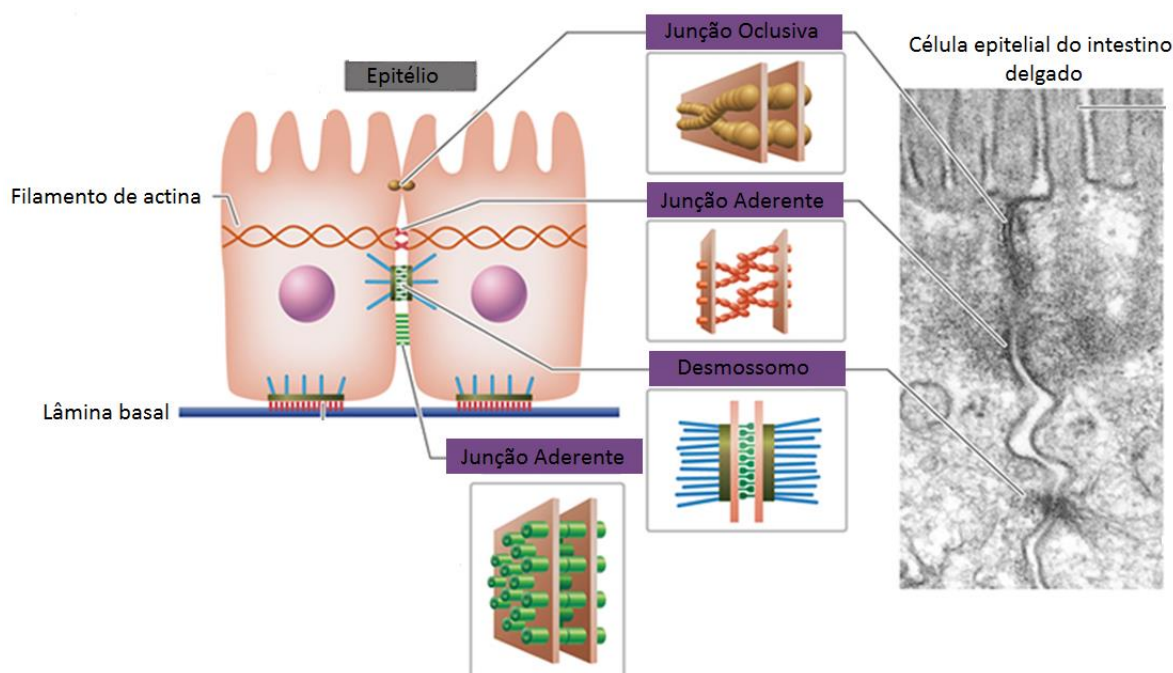


Figura 1.8: Representação dos tipos de adesão entre células e na lâmina basal de células epiteliais. Entre células, podem ser formadas junções oclusivas, aderentes e desmossomais. À direita, fotografia por eletromicroscopia mostrando os tipos de adesão celular em intestino delgado. Adaptado de: http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/index_active.html, acessado em: 26 de fevereiro de 2016.

1.3.1. Junções oclusivas (*tight*)

A função primária das junções oclusivas é manter a permeabilidade celular e paracelular, ou entre células. Sua capacidade de formar barreiras resistentes e permeáveis em tecidos diferentes, de acordo com suas necessidades, faz com que seja essencial em tecidos que fazem troca seletiva de íons, macromoléculas e água, como o epitélio intestinal (APLIN; JONES; HARRIS, 2009; BROOKE; NITOIU; KELSELL, 2012) (Figura 1.8).

Esse tipo de junção forma uma barreira intercelular contínua através do epitélio, necessária para separar os espaços teciduais e prevenir o movimento seletivo de solutos pelo epitélio através do espaço intercelular. Por essa capacidade, auxilia na formação da

polarização celular por formar uma barreira basolateral, e ao mesmo tempo, permitir a passagem de moléculas pelo seu sistema de pequenos poros carga-seletiva. As junções oclusivas são compostas pelas proteínas claudinas, ocludinas e pelos conectores ao citoesqueleto como as proteínas ZO-1, 2 e 3 (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009; HARTSOCK; NELSON, 2008).

1.3.2. Junções comunicantes (GAP)

As junções do tipo GAP (Figura 1.8) medeiam a comunicação celular. Através da transferência de pequenas moléculas e íons entre o citoplasma de células adjacentes, este tipo de junção celular permite a comunicação celular e respostas a estímulos externos, funções vitais na manutenção da homeostase celular (BROOKE; NITOIU; KELSELL, 2012).

Os vertebrados expressam duas famílias de proteínas formadoras das junções comunicantes: as conexinas e panexinas. Este tipo de junção não é composto por canais passivos, apesar do que se achou por muito tempo, mas usa o mecanismo de poro central que abre e fecha de acordo com estímulos biológicos, como a voltagem e mecanismos que ainda não foram completamente elucidados (HERVÉ; DERANGEON, 2013).

1.3.3. Junção aderente

A junção aderente tem múltiplas funções, incluindo iniciar a estabilização da conexão entre células, manter a arquitetura tecidual, regular a ligação aos filamentos de actina e regular a transcrição gênica e sinalização de diversas vias celulares. Sua distribuição na membrana ocorre como um cinturão ao redor do corpo da célula, desta forma, unindo as células (Figura 1.8).

A junção aderente é formada pelas caderinas clássicas, como E-caderina, diretamente ligada à membrana celular. Proteínas da família das cateninas, como a β -catenina e α -catenina, medeiam a conexão entre as caderinas e o citoesqueleto (HARTSOCK; NELSON, 2008; MENG; TAKEICHI, 2009).

1.3.4. Adesão desmossomal

Os desmossomos são organelas responsáveis por um tipo de junção intercelular que tem como principal característica conferir adesão forte a células adjacentes em tecidos que sofrem stress mecânico, como coração, pele, língua, esôfago e outros. O termo é oriundo do grego - 'desmo' (ligação) e 'soma' (corpo)- e foi proposto inicialmente por histologistas que consideravam estas organelas como 'pontos de solda' que mantinham as células unidas (CIRILLO, 2014; GETSIOS; HUEN; GREEN, 2004; GREEN; SIMPSON, 2007; KOTTKE; DELVA; KOWALCZYK, 2006).

As proteínas desmossomais têm um padrão de expressão específico, baseado no padrão de diferenciação tecidual (Figura 1.9). Essa organização é muito importante pois, mais recentemente, a expressão diferencial destas proteínas foi correlacionada a outras funções normais do tecido e mostrou-se que elas são responsáveis pela homeostase do epitélio pela manutenção da integridade tecidual, organização estrutural, além de papéis envolvidos na regulação de vias de sinalização celular e no balanço entre proliferação e diferenciação, morfogênese e apoptose (CHIDGEY; DAWSON, 2007a; CIRILLO, 2014; GETSIOS; HUEN; GREEN, 2004; GREEN; SIMPSON, 2007; GREEN et al., 2010; HATZFELD; WOLF; KEIL, 2014; JOHNSON; NAJOR; GREEN, 2014; KITAJIMA, 2014). As famílias de proteínas que compõem os desmossomos são: plaquinas ou *plakin family* (desmoplaquina - Dp), 'armadillo' ou *armadillo family* (placoglobina - Pg e placofilinas) e as caderinas desmossomais ou *cadherin family* (desmogleínas - Dsgs e desmocolinas - Dscs) (Figura 1.9).

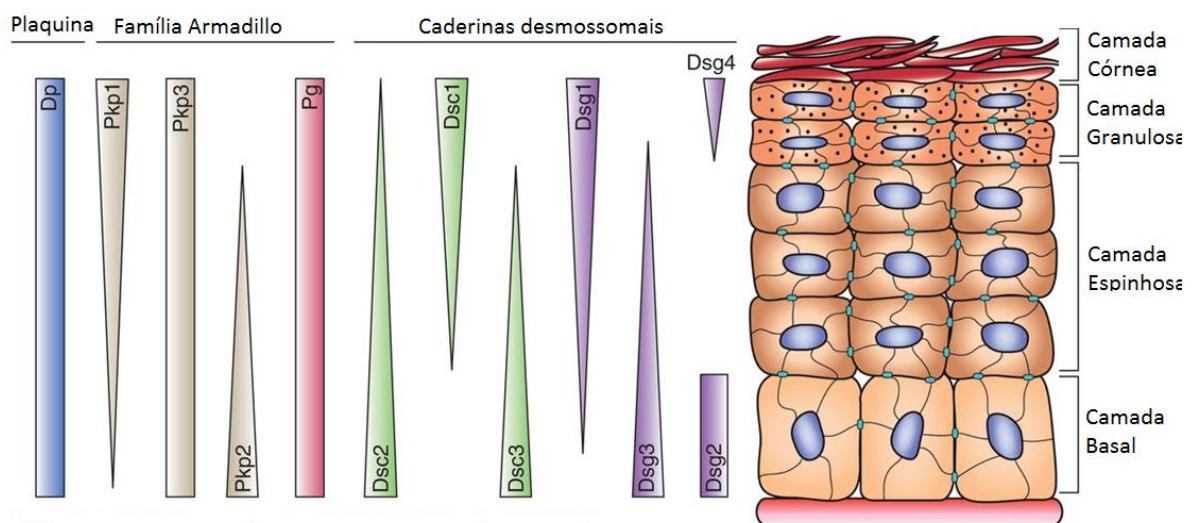


Figura 1.9: Expressão diferencial das proteínas desmossomais de acordo com a diferenciação tecidual nas camadas da epiderme, e famílias das proteínas que compõem o desmossomo. Adaptado de Johnson; Najor; Green, 2014.

Entre as proteínas da família armadillo, a placoglobina (γ -catenina) é majoritariamente expressa nos desmossomos, por conta da sua maior afinidade com as caderinas desmossomais em comparação à E-caderina (CHITAEV et al., 1996; GARROD; CHIDGEY, 2008). As placofilinas 1, 2 e 3 também apresentam um padrão de expressão associado com o grau de diferenciação do tecido e são expressas tanto nos desmossomos quanto nas junções aderentes. Estas são as responsáveis pela conexão da proteína desmoplaquina com o filamento intermediário (Figura 1.10) (GARROD; CHIDGEY, 2008; HATZFELD; WOLF; KEIL, 2014). A desmoplaquina, por sua vez, interage diretamente com o filamento intermediário no citoplasma, sendo que no coração a proteína que assume este papel é a desmina (GARROD; CHIDGEY, 2008).

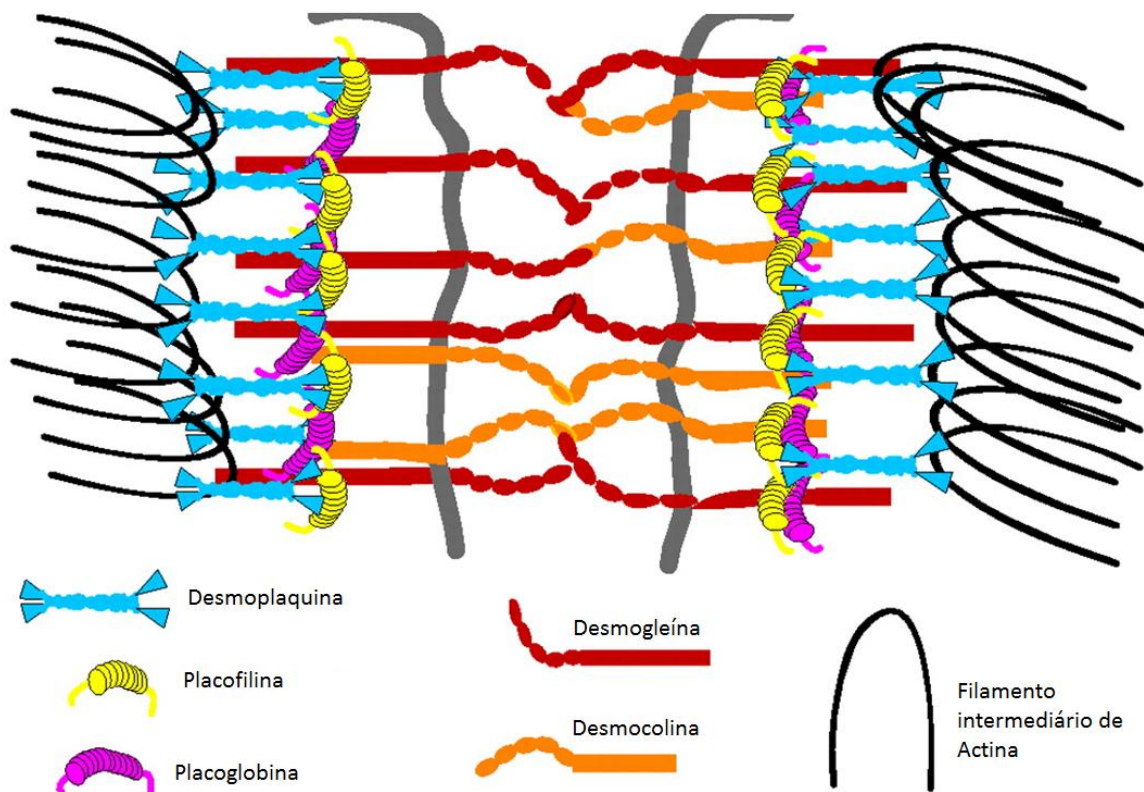


Figura 1.10: Representação esquemática mostrando a constituição proteica de um desmossomo. Em vermelho e laranja estão destacadas as caderinas desmossomais ancoradas à membrana celular (cinza). Estas proteínas interagem com proteínas da família *armadillo* (amarelo e lilás), com a desmoplaquina (em azul) e com o filamento intermediário de actina (preto) na região citoplasmática de modo a formar os desmossomos. Adaptado de Kottke; Delva; Kowalczyk, 2006.

As caderinas desmossomais possuem três regiões principais: uma região intercelular, onde acontece a interação entre as caderinas e responsável pela adesão entre células; uma região transmembrana, através da qual a proteína se ancora à membrana celular; e a região citoplasmática, onde se dá a interação com as proteínas que fazem a conexão ao filamento

intermediário (proteínas da família armadillo e desmoplaquina). A família das caderinas desmossomais é composta por sete proteínas: DSGs de 1 a 4 e DSCs de 1 a 3.

1.3.5. DSG1

A família das desmogleínas foi descoberta no início dos anos 90, só depois sendo caracterizada sua participação na superfamília das caderinas. Seu nome veio do grego “desmos” de ligação e “glein” de cola e, como se localizam nos desmossomos, ficaram caracterizadas como caderinas desmossomais (HAMMERS; STANLEY, 2013). A expressão diferencial dessas proteínas se dá não só de acordo com a diferenciação celular (Figura 1.9), mas é também tecido-específica: a desmogleína 2 é expressa ubiquamente em tecidos que possuem desmossomos, como no tecido cardíaco; a expressão de desmogleína 4 é restrita ao folículo capilar; e as desmogleínas 1 e 3 são encontradas em epiderme e mucosas (BAZZI et al., 2009; DONETTI et al., 2005; HAMMERS; STANLEY, 2013; LI, 2014).

Na época em que a caracterização inicial das desmogleínas estava sendo feita, descobriu-se que a porção extracelular de DSG1 é o antígeno de anticorpos policlonais de uma rara doença autoimune de pele, o pemphigus foliaceus (ISHII et al., 2008). Outros casos em que DSG1 é atacada, desta vez por toxina, são o impetigo bolhoso e a síndrome da pele escaldada, causadas pela produção de toxina esfoliativa A pelo *Staphylococcus aureus*. Em ambas as doenças, há perda de formação da barreira tecidual e quebra da ligação entre a camada granular da pele e as camadas inferiores (PAYNE et al., 2004)

Mais recentemente, Getsios e cols., (2009) identificaram um papel de DSG1 que vai além da manutenção da adesão entre células das camadas superiores, e mais diferenciadas, do tecido epitelial. Foi apontado pelos autores um papel desta proteína na manutenção da diferenciação queratinocítica e morfogênese suprabasal em pele independente da região N-terminal da proteína (necessária para adesão entre células), da região de DSG1 que interage com as proteínas da família *armadillo*, ou mesmo da coexpressão de desmocolina 1. Na verdade, foi mostrado que DSG1 promove a entrada das células nas camadas superiores do epitélio pela supressão da via de sinalização EGFR-Erk 1 e 2 através de seu domínio citoplasmático, que precisa estar ancorado à membrana. Dessa forma, DSG1 facilitaria a progressão celular no programa de diferenciação e estratificação terminal das camadas superiores do epitélio, trazendo um papel além da adesão celular para esta proteína.

Mais de 90% dos cânceres humanos são de origem epitelial (COOPER; PETERS, 1995), portanto, estudar os fatores que promovem a arquitetura normal e funcional do epitélio, além dos mecanismos pelos quais esses são modificados é fundamental no entendimento da gênese de diversos tumores. Quanto à formação e maturação tecidual, há uma demanda de programação celular cuidadosamente organizada de maneira a promover corretamente a homeostase do epitélio, como na regulação das propriedades adesivas e manutenção do formato celular, migração, proliferação e diferenciação celular (SCHOCK; PERRIMON, 2002). Quando algum desses fatores perde o balanço, as consequências podem ser deletérias ao tecido ao ponto de iniciar-se o processo carcinogênico. Um exemplo é a perda de adesão celular, neste caso a perda de E-caderina, como um dos marcadores da perda das características morfológicas do tecido epitelial e ganho de características mesenquimais, processo chamado de transição epitélio-mesenquimal, que já foi relacionado ao aumento da invasividade e migração celulares em carcinoma epidermóide de esôfago (NIWA et al., 2014). Desta forma, e de acordo com o previamente exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a presença de alterações de DSG1 em CEE.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a presença de alterações moleculares de *DSG1* em carcinoma epidermóide de esôfago.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica de *DSG1* em carcinoma epidermóide de esôfago e tecido adjacente não tumoral;
- Avaliar o perfil de metilação da região promotora de *DSG1* em carcinoma epidermóide de esôfago e tecido adjacente não tumoral;
- Avaliar a correlação entre expressão gênica e metilação de *DSG1* em amostras de pacientes com CEE;
- Avaliar o padrão de expressão proteica de *DSG1* em carcinoma epidermóide de esôfago e tecido adjacente não tumoral;
- Investigar a influência das características clínico-patológicas dos pacientes com CEE sobre a expressão gênica de *DSG1* e a metilação de sua região promotora;
- Avaliar a associação entre os níveis de expressão e metilação de *DSG1* com a sobrevida dos pacientes com CEE;
- Avaliar influência da metilação sobre a expressão gênica de *DSG1 in vitro* por meio da utilização de agente desmetilante;
- Investigar a existência de uma isoforma predita de *DSG1* em carcinoma epidermóide de esôfago e tecido adjacente não tumoral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras humanas

3.1.1. Biópsias de pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago

Foram incluídos no estudo 36 pacientes diagnosticados com CEE primário no Instituto Nacional de Câncer (INCA). Foram considerados os seguintes critérios para a inclusão dos pacientes:

- Casos cujo laudo histopatológico confirmou o diagnóstico de CEE revisto na Divisão de Patologia (DIPAT - INCA);
- Pacientes que ainda não haviam sido submetidos a qualquer tratamento na ocasião da biópsia;
- Pacientes cadastrados no Banco Nacional de Tumores (BNT) – INCA, onde as amostras eram armazenadas;
- Pacientes em condições clínicas que permitissem a realização de endoscopia digestiva alta e biópsias no Serviço de Endoscopia - INCA.

Além dos procedimentos vinculados ao BNT-INCA, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob o número 116/11 (Anexo 1). Foram coletadas biópsias de CEE e do tecido normal adjacente ao tumor de cada paciente incluído no trabalho. Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento informado (Anexo 2). Além disso, as informações sobre os pacientes foram coletadas a partir de seus prontuários com o preenchimento de uma ficha padronizada (Anexo 3).

Essas amostras foram utilizadas para a extração de ácidos nucleicos e análise de expressão gênica e perfil de metilação da região promotora de *DSGI*.

3.1.2. Amostras cirúrgicas de CEE armazenadas em parafina

Material cirúrgico preservado em parafina de 26 pacientes diagnosticados com CEE foi obtido a partir do arquivo de blocos e lâminas da Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA e do arquivo de blocos de parafina do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA-RS). Os mesmos critérios de inclusão utilizados para os pacientes provenientes do INCA foram utilizados para o recrutamento de pacientes do HCPA. Os blocos foram mantidos à

temperatura ambiente até o seu processamento. O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa de todas as instituições envolvidas (Anexo 4).

Estas amostras foram utilizadas para avaliação da expressão proteica pela técnica de imunohistoquímica.

3.1.3. Extração de RNA

As amostras frescas de CEE e tecido normal adjacente foram processadas no laboratório do BNT-INCA, como determina o regimento da instituição. Para a extração do RNA total, foi utilizado o RNeasy Mini kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C e foram utilizadas na avaliação da expressão gênica de *DSG1*.

3.1.4. Quantificação de RNA

A quantificação e determinação da pureza das amostras de RNA foi realizada com o auxílio do equipamento NanoDrop (Uniscience), um espectrofotômetro simples, capaz de mensurar a concentração de ácidos nucleicos em solução. Para a realização da quantificação, é necessário configurar os parâmetros do equipamento para mensurar ácidos nucleicos, determinados pela absorbância em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, 1 µL de RNA total foi pipetado no leitor do aparelho. O aparelho já calcula automaticamente a concentração do RNA em ng/µL e verifica o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a leitura em 260 nm e a leitura em 280 nm (comprimento de onda necessário para mensuração de proteínas na solução). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão era equivalente ou ultrapassava o valor de 1,7.

3.1.5. Reação de transcrição reversa

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita através da reação de transcrição reversa (RT), na qual o RNA total extraído foi incubado com a enzima transcriptase reversa *SuperScript II*® (Invitrogen, Estados Unidos). Em um microtubo foram adicionados 250 ng de *primer* randômico (Promega), 500 ng de RNA, 1 µL de dNTPs a 10 mM e água livre de RNase suficiente para completar o volume final de 20 µL de reação e subsequente incubação

por 5 minutos a 65°C. Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão da enzima transcriptase reversa (5X) fornecido pelo fabricante (Invitrogen, Estados Unidos) e 2 µL de DTT 0,1M e subsequente incubação por 2 min a 25°C. Em seguida, foi adicionado 1 µL de *SuperScript II*® (200 U) e as reações foram incubadas no termociclador por 10 min a 25°C e 50 min a 42°C. A inativação da enzima foi feita incubando a reação a 70°C por 15 min. Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.1.6. PCR em tempo real

A PCR quantitativa (PCRq) ou PCR em tempo real é um tipo de reação em cadeia da polimerase em que podemos observar a geração de novas cópias de determinada sequência do DNA ao longo da reação, ou seja, em tempo real. Esta metodologia foi realizada em termociclador equipado com detectores de fluorescência que acompanham o processo de amplificação através da captação de sinal fluorescente emitido por moléculas específicas (fluoróforos), quando estas interagem com o DNA ao fim de cada ciclo da reação. O fluoróforo mais comumente utilizado nas práticas de PCRq é o reagente SYBR Green que emite fluorescência após interagir fisicamente com a dupla-fita de DNA ao longo do processo de amplificação.

As reações de PCRq foram realizadas na plataforma Rotor-gene (Qiagen). Em cada reação foram adicionados 5 µL do reagente QuantiFast SYBR Green 2x (Qiagen), 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos específicos para cada gene (Quadro 3.1) a 10 µM, 1,0 µL de cDNA diluído 1:20 (para as amostras humanas) ou 1:10 (amostras de linhagens celulares) e 3,4 µL de água deionizada autoclavada. A ciclagem consistiu de uma incubação a 95°C por 5 minutos, seguida de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 seg e anelamento/amplificação a 60°C por 10 seg. Após cada ciclo, a fluorescência foi capturada. Ao fim da reação, foi adicionada uma curva de dissociação a fim de verificar a formação de produtos inespecíficos e contaminação.

Quadro 3.1: Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *DSGI* e *GAPDH* (gene-referência)

	Sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene
<i>DSGI</i>	Senso: 5'- CTAGACAGAGAGCAATACGGC-3' Antissenso: 5'-GAAGACTGTTCCATGTAAGGGA- 3'
<i>DSGI Isoforma</i>	Senso: 5'- TACGAATTTCTAAATAGTAT-3' Antissenso: 5'-TGTATAAACTCCTGAGTTGTC - 3'
<i>GAPDH</i>	Senso: 5'- CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA-3' Antissenso: 5'-AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT- 3'

Após a reação, foi feita a quantificação do RNAm de *DSGI* relativa ao gene referência, *GAPDH*, através do método de ΔC_T . Durante a reação de amplificação, é gerado um gráfico em que o eixo Y representa o sinal de fluorescência captado e o eixo X, o número de ciclos da reação. No primeiro ciclo da reação de PCR, há emissão de fluorescência que servirá como a linha de base do gráfico de amplificação. No decorrer da reação, o aumento do sinal de fluorescência indica o acúmulo de produto de PCR. Esse acúmulo é representado por meio de uma curva exponencial. Durante esta fase, é determinado um limiar de detecção de fluorescência fixo acima da linha de base (*threshold*). A partir desse limiar, é obtido o parâmetro C_T (ciclo de *threshold*), definido como o número de ciclos, inteiro ou não, em que a fluorescência ultrapassou o limiar previamente estabelecido. Como o experimento foi feito sempre em duplicata, foi calculada a média dos C_T s tanto para *DSGI* como para o gene-referência *GAPDH*. A diferença entre as médias dos C_T s (ΔC_T) do gene de interesse e do *GAPDH* foi calculada pelo programa Microsoft Excel e o valor de quantificação relativa foi expresso pela fórmula $2^{-\Delta C_T}$, também calculado no programa Microsoft Excel.

Para o estabelecimento do limiar de detecção, foi feita uma curva padrão para cada gene, *DSGI* e *GAPDH*, através de uma diluição seriada de cDNA de um controle positivo da reação. Foi utilizada como controle positivo a linhagem celular OE-21.

3.1.7. Reação de PCR para amplificação de isoforma de *DSG1*

Para detecção de expressão da isoforma de *DSG1*, foram construídos oligonucleotídeos específicos para cada transcrito do gene (Figura 3.1). O transcrito maior, que codifica a proteína completa de *DSG1*, está representado na parte superior da figura. Este possui 15 exons que codificam o peptídeo sinal (PS), a porção da pré-proteína (PP), a porção extracelular (EC), o domínio de ancoragem à membrana, a região transmembrana (TM) e a porção citoplasmática da molécula de adesão. Já o transcrito menor, ou isoforma, está representado logo abaixo e possui apenas os exons que codificam a porção citoplasmática de *DSG1*. A diferença entre os dois transcritos está no primeiro exon da isoforma menor, presente apenas nesta. Esta região foi então selecionada para o desenho dos oligonucleotídeos específicos para esta isoforma.

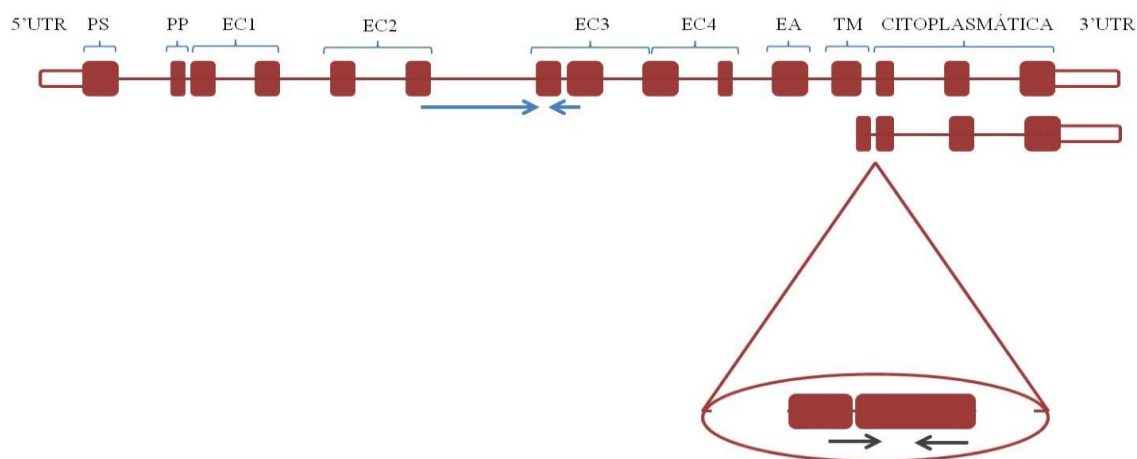


Figura 3.1: Representação esquemática dos transcritos de *DSG1* com indicação do local de anelamento dos oligonucleotídeos construídos. As caixas preenchidas representam os exons, enquanto as caixas vazias representam as porções 5'UTR e 3'UTR. Pelas setas azuis, estão delimitados os oligonucleotídeos usados para a amplificação de produto específico de *DSG1* completa e pelas setas pretas, os oligonucleotídeos usados para a amplificação de produto específico da isoforma de *DSG1*. *Legenda:* UTR = Região não traduzida; PS = Peptídeo Sinal; PP = Domínio pré-proteína; EC = Domínio extracelular; EA = Domínio de ancoragem extracelular; TM = Domínio transmembrana; Citoplasmática = Região citoplasmática.

Foi realizada então, PCR semiquantitativa com os cDNAs produzidos em 2.1.5. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L contendo Tampão 1X, 0,2 mM dNTP Mix, 0,2 mM de cada primer e 1 unidade de Taq Platinum DNA polimerase (Qiagen, Alemanha). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação (5 minutos a 95°C), seguida de 50 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (30

segundos a 52°C) e extensão (30 segundos a 72°C), finalizada por uma extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos das reações de PCR foram então visualizados em gel de agarose 2%. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados estão mostradas no quadro 3.1.

3.1.8. Extração de DNA

As amostras de CEE e tecido normal adjacente foram processadas no laboratório do BNT-INCA, como determina o regimento da instituição. Para a extração do DNA total, foi utilizado o DNeasy Mini kit (Qiagen, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C e foram utilizadas na avaliação do perfil de metilação da região promotora de *DSG1*.

3.1.9. Quantificação de DNA

Como para as amostras de RNA, a quantificação e determinação da pureza das amostras de DNA foram realizadas com o auxílio do equipamento NanoDrop (Uniscience), capaz de mensurar a concentração de ácidos nucleicos em solução. Para a realização da quantificação, é necessário configurar os parâmetros do equipamento para mensurar ácidos nucleicos, determinados pela absorbância em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, 1 µL de DNA total foi pipetado no leitor do aparelho. O aparelho já calcula automaticamente a concentração do DNA em ng/µL e verifica o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a leitura em 260 nm e a leitura em 280 nm (comprimento de onda necessário para mensuração de proteínas na solução). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão era equivalente ou ultrapassava o valor de 1,7.

3.1.10. Tratamento com bissulfito de sódio

Com o objetivo de transformar as citosinas não metiladas em uracila (as citosinas metiladas permanecem inalteradas), 500 ng de DNA genômico foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio, utilizando EZ DNA Methylation Kit® (Zymo Research, Estados Unidos), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após o tratamento, o DNA foi eluído em 20 µL do tampão de eluição fornecido no kit, de maneira que sua

concentração final fosse de 25 ng/μL. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C até sua utilização.

3.1.11. Reação de PCR para pirosequenciamento

Para a determinação do nível de metilação da região promotora de *DSGI*, foi preciso amplificar a região de interesse. Para isso, um total de 25 ng de DNA genômico tratado com bissulfato de sódio foi amplificado utilizando primers específicos para a região promotora de *DSGI* (Quadro 3.2). Para que posteriormente apenas uma das fitas amplificadas seja selecionada, um dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR deve ser marcado com biotina, neste caso foi o reverso. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 μL contendo Tampão 1X, 0,2 mM dNTP Mix, 0,2 mM de cada primer e 1 unidade de Taq Platinum DNA polimerase (Qiagen, Alemanha). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação (5 minutos a 95°C), seguida de 50 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (30 segundos a 56°C) e extensão (30 segundos a 72°C), finalizada por uma extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos das reações de PCR foram então visualizados em gel de agarose 2%.

Quadro 3.2: Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene *DSGI* para posterior sequenciamento técnica de pirosequenciamento.

	Sequências dos oligonucleotídeos específicos
Amplificação de <i>DSGI</i>	Senso: 5'- AGAAAGTATGGGAGAAG-3' Anti-Senso: 5'Biotina-CTTCCTCCA ACTA - 3'
Pirossequenciamento de <i>DSGI</i>	5'-TTT ATT ATT TGT ATA A-3'

3.1.12. Pirosequenciamento

Os produtos de PCR foram coletados utilizando “beads” revestidas com estreptavidina com o objetivo de ligar apenas as fitas biotiniladas. A fita biotinilada foi então sequenciada na plataforma PyroMark Q96 (Qiagen, Alemanha) da Facility de Epigenética do INCA. Esta técnica baseia-se no sequenciamento por síntese, com adição e incorporação sequencial de

nucleotídeos. Cada nucleotídeo é incorporado pela DNA polimerase se houver complementariedade à fita molde, e essa incorporação pode ser monitorada em tempo real. Inicialmente, o oligonucleotídeo iniciador do sequenciamento se anela à fita simples do produto gerado na reação de PCR. São então adicionados as enzimas responsáveis pela catálise da reação: DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase, e os substratos da reação: adenosina 5' fosfosulfato (APS) e luciferina. O sequenciamento se inicia pela adição sequencial de dNTPs, desta forma, quando há incorporação à fita molde, há também a liberação de pirofosfato (PPi), e a enzima ATP sulfúrilase converte então o PPi em ATP na presença do substrato APS. O ATP produzido é utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina (catalisada pela luciferase) que gera luz em uma intensidade proporcional à quantidade de ATP produzida. Só então, a luz produzida é captada e visualizada como um pico no gráfico luz X tempo, sendo que a altura de cada pico é proporcional à quantidade de nucleotídeos incorporados. Enquanto isso, a apirase degrada continuamente os nucleotídeos não incorporados e o ATP. O método de pirosequenciamento trata cada sítio CpG como um polimorfismo C/T e gera um dado quantitativo da proporção relativa do alelo metilado versus o alelo não metilado. Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse foram avaliados convertendo os pirogramas em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos (VAISSIÈRE et al., 2009). Para a análise do perfil de metilação da região promotora de *DSG1* foi utilizado um oligonucleotídeo de sequenciamento descrito no quadro 3.2.

3.1.13. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é uma técnica amplamente utilizada para determinar a presença/ausência e localização celular de proteínas de interesse. Neste estudo, para a avaliação da presença e localização da proteína desmossomal DSG1, a técnica foi realizada em secções de 3 µm de cada caso de CEE. Como controle positivo de cada reação, foi utilizado tecido esofágico de indivíduos saudáveis. Os cortes foram fixados nas lâminas através de uma incubação a 60°C overnight, em estufa. A desparafinização foi feita em dois banhos de 5 minutos/cada em xilol aquecido em estufa, seguidos de quatro banhos de xilol por 5 minutos/cada em capela. O corte foi então desidratado em seis banhos em etanol por 3 minutos/cada, e hidratado em um banho de 3 minutos em água corrente. Para a recuperação antigênica, as secções foram incubadas em banho-maria submersas em solução tampão EDTA, pH 8,0, por 45 minutos a 98°C. Em seguida, os casos foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e foram lavados em água corrente por 5 minutos. As secções foram

circuladas por caneta Dako Pen (Dako®; Agilent Technologies, Estados Unidos) e incubadas em três banhos de 5 minutos/cada de tampão de lavagem (TBS 1X + 0,1% de Tween 20). Logo após, retirou-se qualquer resquício de tampão de lavagem e os cortes foram incubados, por duas vezes, em solução inibidora de peroxidase endógena (Peroxidase Block – Novolink Polymer Detection Systems, Leica Biosystems®) por 20 minutos/cada. As lâminas foram, então, lavadas com água destilada e incubadas em mais três banhos de 5 minutos/cada de tampão de lavagem. Os cortes foram secos e incubados em solução inibidora de ligações inespecíficas (Protein Block – Novolink Polymer Detection Systems, Leica Biosystems®) por 30 minutos. Em seguida, retirou-se o excesso de Protein Block e foi aplicado o anticorpo primário anti-DSG1 (SC 20114; Santa Cruz Biotechnologies, Estados Unidos), diluído 1:400 em solução diluidora do mesmo kit. Os controles negativos recebiam apenas a solução diluidora. As lâminas foram incubadas *overnight* a 4°C. No dia seguinte, as lâminas foram incubadas em três banhos por 5 minutos/cada de tampão de lavagem e, em seguida incubadas com solução Post Primary Block (Novolink Polymer Detection Systems, Leica Biosystems®). As secções foram, então, lavadas com água destilada e incubadas por mais três vezes por 5 minutos/cada em tampão de lavagem, para em seguida a solução de polímero (Polymer - Novolink Polymer Detection Systems, Leica Biosystems®) ser adicionada por 30 minutos. Logo após, foram lavadas com água destilada e mais uma vez incubadas em dois banhos de 5 minutos/cada em tampão de lavagem. Posteriormente, o processo de revelação foi feito através da coloração por DAB (Novolink Polymer Detection Systems, Leica Biosystems®). Para tal revelação, utilizou-se 50 µL de DAB para cada 1 mL de solução tampão (DAB Substrate Buffer) proveniente do kit e contra-coradas em Hematoxilina por 1 minuto.

A análise da expressão de DSG1 contou com a avaliação de dois patologistas independentes. A avaliação foi realizada pela quantificação da porcentagem de células contendo cada tipo de marcação celular: citoplasma, membrana, núcleo e perinúcleo. O *score* de marcação foi estabelecido a partir dos pontos de corte mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Padrões de classificação de marcação de DSG1 de acordo com percentual de células marcadas.

<i>Score</i>	Porcentagem de células marcadas
00	0%
01	1 a 25%
02	26 a 50%
03	51 a 75%
04	76 a 100%

3.2. Experimentos *in vitro*

3.2.1. Linhagens celulares

Inicialmente, foram realizados testes da expressão gênica de *DSG1* em linhagens provenientes de epitélio esofágico normal e de CEE: HET-1A, OE-21, TE-1, TE-11 e TE-13 (Quadro 3.3). Apenas a linhagem OE-21 apresentou níveis detectáveis de expressão do gene de interesse. A partir de então, passamos a utilizar esta linhagem nos testes *in vitro*.

Quadro 3.3: Descrição das linhagens celulares provenientes de tecido esofágico utilizadas.

Linhagem	Histologia	Diferenciação	Estágio	Tumorigenicidade	Imortalização
HET-1A	Normal	-	-	-	SV 40
OE-21	CEE	Moderado	IIA	+	-
TE-1	CEE	Bem	II	+	-
TE-11	CEE	Moderado	IV	+	-
TE-13	CEE	Pouco	IV	+	-

Fontes: ATCC - <http://www.atcc.org/products/all/CRL-2692.aspx#characteristics> acessado em 22/01/2016; Sigma - <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/96062201?lang=pt®ion=BR> acessado em 22/01/2016)

3.2.2. Cultivo da linhagem OE-21

A linhagem OE-21 foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO₂ e testadas com MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Cambrex Bio Science, Estados Unidos) para a certificação de ausência de contaminação por micoplasma.

3.2.3. Tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina

O composto 5-Aza-2'-desoxicitidina (Decitabina; A3656 - Sigma, Estados Unidos) é um modificador epigenético que causa desmetilação do DNA. Foi inicialmente utilizado como uma alternativa menos tóxica à molécula 5-azacitidina no tratamento quimioterápico de leucemia. Ambos são análogos nucleosídicos que são incorporados ao DNA durante a replicação celular (CHRISTMAN, 2002) e durante a reação de metilação do DNA, as DNMTs se ligam covalentemente a essas moléculas, causando uma diminuição dos níveis proteicos de DNMTs solúveis (PALII et al., 2008). Além deste mecanismo, a 5-Aza-2'-desoxicitidina não pode ser metilada (SOLÍS et al., 2015), ambos mecanismos levam a uma desmetilação global do DNA.

Inicialmente, foi realizada uma curva para determinar a melhor dose para o tratamento com o agente 5-Aza-2'-desoxicitidina. Um total de 2×10^4 células foram plaqueadas por poço em placas de seis poços e, após incubação por 24h, o tratamento foi iniciado com 2 mL da solução de meio de cultura acrescido de 5-Aza-2'-desoxicitidina diluída em DMSO nas doses de 10 nM, 100 nM e 1 μ M. Ao controle, foram adicionados 2 mL da solução de meio de cultura acrescido de DMSO (mesmo volume de DMSO da solução de 5-Aza-2'-desoxicitidina). Em seguida, as células foram incubadas por 144h na estufa a 37°C sob 5% de CO₂. O meio de cultivo com o composto era trocado a cada 48 horas.

Foi também realizada uma curva para determinar o melhor tempo para o tratamento com o agente 5-Aza-2'-desoxicitidina. Para realização deste experimento, foram plaqueadas quantidades diferentes de células para cada grupo de avaliação, como se segue:

- 25 x 10⁴ células/ poço - para o tratamento de 24h;
- 12,5 x 10⁴ células/ poço - para o tratamento de 48h;
- 6,2 x 10⁴ células/ poço - para o tratamento de 72h;
- 3,1 x 10⁴ células/ poço - para o tratamento de 96h;

1,5 x 10⁴ células/ poço - para o tratamento de 120h.

Após incubação por 24h, as linhagens celulares foram tratadas com 2 mL da solução de meio de cultura acrescido de 5-Aza-2'-desoxicitidina diluída em DMSO na dose de 100 nM, e cultivadas nas mesmas condições do tratamento anterior. Foram feitos três experimentos independentes em triplicata de cada tratamento.

3.2.4. Contagem e avaliação da viabilidade celular

Após a marcação com azul de tripan, as células vivas de membrana intacta não se coram, pois o corante não atravessa a membrana e assim não é incorporado. Já nas células não viáveis, esse corante atravessa a membrana e é incorporado. Após esta marcação, as células são observadas no microscópio para a avaliação da viabilidade.

Após incubação com o corante azul de tripan na proporção 1:1, as células viáveis foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer. A contagem foi feita nos quadrantes diretamente adjacentes ao quadrante central da câmara, sendo que os valores encontrados foram somados e divididos pelo número de quadrantes avaliados (quatro). O valor final foi então multiplicado pelo fator de diluição 2x10⁴ para se obter o número de células por mL.

3.2.5. Extração de RNA

O RNA total foi extraído das células coletadas após tratamento utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Estados Unidos) seguindo indicações do fabricante. Cada amostra foi homogeneizada por pipetagem em 500 µL de TRIzol® e incubada por cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de clorofórmio com subsequente homogeneização em agitador vortex. Após este processo, houve incubação por 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foram adicionados 250 µL de isopropanol e 1 µL de glicogênio (Life Technologies, Estados Unidos) com posterior agitação e incubação *overnight* em freezer -20°C, para a precipitação do RNA. O protocolo foi seguido de

centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 75%. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, com posterior descarte do etanol. Ao pellet formado foram adicionados 10 µL de água livre de RNase e DNase, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C até sua utilização na avaliação da expressão gênica de *DSG1*. A quantificação do RNA, RT e PCRq foram feitas nas mesmas condições das amostras humanas (itens 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6).

3.2.6. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de células coletadas após tratamento pelo método de SDS/Proteinase K. O protocolo se iniciou pela adição de 500 µL de solução de digestão (NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM; EDTA 25 mM e SDS 0,5% - pH 8,0) e 10 µL de proteinase K a 25 mg/mL (Invitrogen, Estados Unidos). A solução foi incubada a 65°C por 1 hora. Após a digestão, as amostras foram homogeneizadas em vortex e foram adicionados 300 µL de NaCl 6M saturado. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm e foi coletado o sobrenadante, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol (Merk, Alemanha). Seguiu-se uma incubação a -20°C por 30 minutos e uma centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 500 µL de etanol 70% (Merk, Alemanha) seguida de nova centrifugação (12.000 rpm, 5 minutos), descarte do sobrenadante e evaporação por 5 minutos a 55°C em termobloco (Novainstruments, Brasil). Ao pellet formado foram adicionados 10 µL de água livre de RNase e DNase, e as amostras foram armazenadas em freezer -20°C até sua utilização. A quantificação, tratamento com bissulfito, PCR e pirosequenciamento foram realizados nas mesmas condições das amostras humanas (itens 2.1.8, 2.1.9, 2.1.10, 2.1.11).

3.2.7. Extração e quantificação de proteínas totais

A obtenção do extrato proteico celular total foi realizada pela adição de 100 µL de tampão de lise (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 250 mM, SDS 0,1%, DTT 2 mM, NP40 0,5%) e 1 µL de coquetel de inibidores de protease 100X (Cell Signaling, Estados Unidos), homogeneização a cada 10 minutos por um total de 30 minutos em gelo. Para a precipitação dos componentes celulares, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 minutos a 4°C

e o sobrenadante foi transferido para novo tubo. Estas amostras foram armazenadas em freezer -80°C , e utilizadas para a avaliação da expressão proteica de DSG1 por western blotting.

Com o objetivo de determinar a concentração de proteínas, foram utilizados 2 μL do extrato proteico utilizando o fluorômetro Qubit® Protein Assay Kit (Life Technologies Corporation, Estados Unidos), tendo sido feita a calibração do equipamento a cada quantificação. A solução tampão do kit foi preparada na concentração de 1:200 e 200 μL dessa solução foram utilizados para determinar a concentração de cada um dos extratos proteicos, assim como dos controles contidos no kit. Os tubos foram homogeneizados, incubados em temperatura ambiente por 15 minutos e lidos no equipamento.

3.2.8. Western blotting

O gel de separação consistiu de um gel de poli-acrilamida a 8% preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida a 30%. Foi utilizado um volume de 1,6 mL da solução estoque de acrilamida/bis-acrilamida, 1,5 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8, 0,2 mL de persulfato de amônia (APS) a 10%, 30 μL de TEMED e 2,7 mL de água destilada. Esta solução foi vertida entre placas de vidro e imediatamente recoberta por 1 mL de SDS a 0,1%.

Após a polimerização, o SDS foi retirado e foi adicionado o gel de empacotamento de poli-acrilamida a 3%, preparado com 0,6 mL de acrilamida/bis-acrilamida a 30%, 1,5 mL de Tris 0,5 M/ SDS 0,4% pH 6,8, 80 μL de TEMED, 0,2 mL de APS 10% e 3,7 mL de água destilada.

As amostras foram preparadas numa proporção de 3 volumes de amostra para 1 volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 8%, SDS 40%, glicerol 40% e Tris-HCl 2 mM pH 6,8), de maneira que a quantidade de proteína fosse de um total de 15 μg . Adicionou-se 1 μL de β -mercaptoetanol às amostras, que foram aquecidas por cinco minutos a 95°C , seguindo-se a adição de mais 2 μL de β -mercaptoetanol. A eletroforese realizou-se após a aplicação das amostras no gel, com uma corrente de 20 mA no gel de empacotamento e 40 mA no gel de resolução até a saída do corante. O tampão de corrida consistia em Tris 25 mM, glicina 192 mM e SDS a 0,1%, pH 8,3.

A transferência foi realizada utilizando o iBlot® Transfer Stack Kit (Thermo Fisher Scientific Inc, Estados Unidos), de acordo com especificações do fabricante.

Após a transferência, foi realizada a incubação da membrana com 5% de leite Molico® (Nestlé, suíça) diluído em TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05% pH 7,5), *overnight* para o bloqueio de ligações inespecíficas. No dia seguinte, foi feita a incubação utilizando o anticorpo primário anti-DSG1 (SC 20114; Santa Cruz, Estados Unidos) na concentração de 1:300 diluído em leite a 5%, por 4 horas. A membrana foi lavada então com TTBS quatro vezes por 15 minutos/cada. Seguiu-se a incubação com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (31460, Thermo Scientific, EUA) na concentração de 1:5000 por 1 hora diluído em TTBS. A membrana foi novamente lavada com TTBS três vezes por 15 minutos/cada e com TBS por 15 minutos.

A revelação da membrana seguiu os procedimentos recomendados pelo manual do kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (General Electric, Estados Unidos). De maneira resumida, deixamos as soluções por 20 minutos em temperatura ambiente, preparamos as soluções (Luminol e peróxido) 1:1, a membrana foi incubada por 5 minutos e revelada em equipamento Gel Doc XR, BioRad (Estados Unidos).

A intensidade das bandas foi verificada com o auxílio do programa ImageJ, versão 1.49.

3.2.9. Imunofluorescência

A imunofluorescência, assim como a imunohistoquímica, é amplamente utilizada para avaliar a localização e intensidade de marcação de proteínas de interesse através de utilização de anticorpos secundários acoplados a corantes fluorescentes. Para a realização da técnica, 5×10^3 células foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre uma lamínula. Após o tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina a 100 nM por 72h, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com PBS 1X. Para fixar as células, foram adicionados 500 µL de metanol:acetona (70:30) a cada poço, por 5 minutos a -20°C . Para a retirada dos agentes de fixação, as células foram lavadas com PBS 1X, seis vezes por 5 minutos/cada. Após esta etapa, as células foram permeabilizadas pela adição de 500 µL/poço de Triton X100 a 0,5%, por 30 minutos. Após a incubação, o Triton foi removido, os poços foram lavados com PBS 1X por 5 minutos, e as etapas de permeabilização e de lavagem foram repetidas. Após estas etapas, foi adicionado 1 mL de PBS contendo albumina sérica bovina (BSA) 1% e as placas foram mantidas por 1 hora à temperatura ambiente, para o bloqueio de ligações inespecíficas. As células foram então incubadas com anticorpo primário anti-DSG1 SC 20114 (1:300; Santa Cruz, Estados Unidos) em BSA 1% PBS 1X por 90 minutos. O anticorpo foi retirado e as células lavadas

com PBS 1X, por 5 minutos. As células foram incubadas com anticorpo secundário Alexa 594 (1:250; Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos) diluído em PBS 1X por 1 hora, e, após este período, o anticorpo secundário foi removido e as células foram lavadas com PBS 1X, por 5 minutos. Para a marcação nuclear, foi realizada a incubação com DAPI (1:5000) por 5 minutos, seguida de sete lavagens sucessivas com PBS 1X.

Após as lavagens, as lâminas foram montadas com meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Estados Unidos) e lidas em seguida em microscópio confocal Olympus FV10i (Olympus, Japão).

A expressão de DSG1 foi determinada a partir da quantificação da intensidade de fluorescência pelo programa FV10-ASW, versão 2.1 Viewer. Para a obtenção da expressão total de DSG1, foram avaliados seis campos por condição, sendo que cada campo foi individualmente normalizado através da divisão da intensidade total de fluorescência do campo pelo número de células. A avaliação da relação membrana/citoplasma de DSG1 foi feita pela seleção randômica de quatro regiões de igual área na membrana e outras quatro equivalentes para o citoplasma. Então, foi feita a média da intensidade de fluorescência das quatro regiões selecionadas, para membrana e para citoplasma, em cada um dos seis campos para cada condição.

3.3. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 4. Primeiramente, todos os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Quando os grupos a serem comparados passavam no teste de normalidade, foi realizado um teste paramétrico (Teste T pareado ou não pareado, dependendo do caso). Já quando os dados não obedeceram à distribuição normal, foram utilizados testes não paramétricos (Wilcoxon ou Mann-Whitney para amostras pareadas e não pareadas, respectivamente).

As correlações entre os diferentes parâmetros avaliados foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 4. Quando os dados apresentavam distribuição normal, foi feito o teste de Pearson, enquanto a correlação de Spearman foi utilizada quando os dados não foram paramétricos.

Para a estimativa de sobrevida univariada, foi utilizada a curva de Kaplan-Meier e a significância estatística entre os grupos foi calculada pelo teste de log-rank. Uma vez que observamos uma associação entre a idade e os níveis de metilação do promotor de *DSG1*, esta

variável contínua foi categorizada (indivíduos com menos de 65 anos e indivíduos com idade ≥ 65 anos) e selecionada para a análise multivariada. Finalmente, a regressão de Cox foi aplicada usando o método stepwise forward. Todas as análises de sobrevida foram feitas com o auxílio do pacote “Survival” para o ambiente R.

Todos os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Informações clínico-patológicas dos pacientes com CEE

As características clínico-patológicas dos dois grupos de indivíduos incluídos neste estudo estão descritas na Tabela 4.1. O primeiro grupo doou amostras incluídas em parafina (FFPE) e o outro doou amostras frescas, tanto de tecido tumoral quanto de tecido normal adjacente. No primeiro caso, as amostras foram provenientes de dois centros distintos, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e do Instituto Nacional de Câncer (INCA), e foram utilizadas para análise de expressão proteica por imunohistoquímica. Já as amostras frescas foram todas coletadas no INCA, tendo sido utilizadas para as análises de expressão gênica e metilação de *DSGI*. De uma maneira geral, os dois grupos apresentaram um perfil bastante semelhante, sendo a maioria de homens (58,3% e 75% entre as amostras incluídas em parafina e frescas, respectivamente) com uma mediana de idade entre 57 e 59 anos. Já em relação às características dos tumores, também foi observada uma grande similaridade entre as amostras utilizadas para os diferentes tipos de análises, sendo o principal sítio acometido o terço médio (60% e 73,3% em amostras incluídas em parafina e frescas, respectivamente), com uma predominância de tumores moderadamente diferenciados (em torno de 70-75%) e de estadiamento 3 ou 4 (entre 70 e 88% dos casos). Além disso, para os pacientes que doaram amostras frescas, foi possível a coleta de dados referentes à sobrevida, sendo que 64% dos pacientes foram a óbito até o término do trabalho.

Tabela 4.1: Dados Clínico-patológicos dos indivíduos incluídos no estudo.

	Grupos de indivíduos	
	FFPE	Amostras frescas
Número de indivíduos	25	36
Idade	Mediana: 57 (39 - 74)	Mediana: 58,7 (39 - 77)
Gênero	M - 14 (58,3%) F - 10 (41,7%) ND - 1	M - 27 (75%) F - 9 (25%) ND - 0
Origem	INCA - 14 (56%) HCPA - 11 (44%)	INCA - 38 (100%) HCPA - 0
Localização	DISTAL - 9 (36%) MÉDIO - 15 (60%) PROXIMAL - 1 (4%) ND - 0	DISTAL - 2 (6,7%) MÉDIO - 22 (73,3%) PROXIMAL - 6 (20%) ND - 8
Diferenciação	<i>IN SITU</i> e BEM - 1 (4%) MODERADAMENTE - 19 (76%) POUCO - 5 (20%)	<i>IN SITU</i> e BEM - 0 (0%) MODERADAMENTE - 26 (72,2%) POUCO - 10 (27,8%)
Estadiamento	1 e 2 - 3 (30%) 3 e 4 - 7 (70%) ND - 15	1 e 2 - 2 (11,8%) 3 e 4 - 15 (88,2%) ND - 19
T	1 e 2 - 8 (57,1%) 3 e 4 - 6 (42,9%) ND - 11	1 e 2 - 0 (0%) 3 e 4 - 17 (100%) ND - 19
N	0 - 9 (64,3%) 1 - 5 (35,7%) ND - 11	0 - 4 (36,4%) 1 - 7 (63,6%) ND - 25
M	0 - 7 (87,5%) 1 - 1 (12,5%) ND - 17	0 - 3 (21,4%) 1 - 11 (78,6%) ND - 22
Sobrevida	VIVOS - ND ÓBITOS - ND	VIVOS - 13 (36%) ÓBITOS - 23 (64%)
Tipo de análise realizada	IHQ - 25 RT-PCRq - 0 Pirosequenciamento - 0	IHQ - 0 RT-PCRq - 36 Pirosequenciamento - 36

Nota: ND: Dados não disponíveis; Os percentuais foram calculados sobre os valores dos pacientes que apresentaram informações.

4.2 Análise de expressão gênica e metilação de *DSG1* em pacientes com CEE

Entre os indivíduos que doaram amostras frescas utilizadas para as análises de expressão gênica e perfil de metilação de *DSG1*, foi observada uma sobrevida global média de 9,1 meses (Figura 4.1).

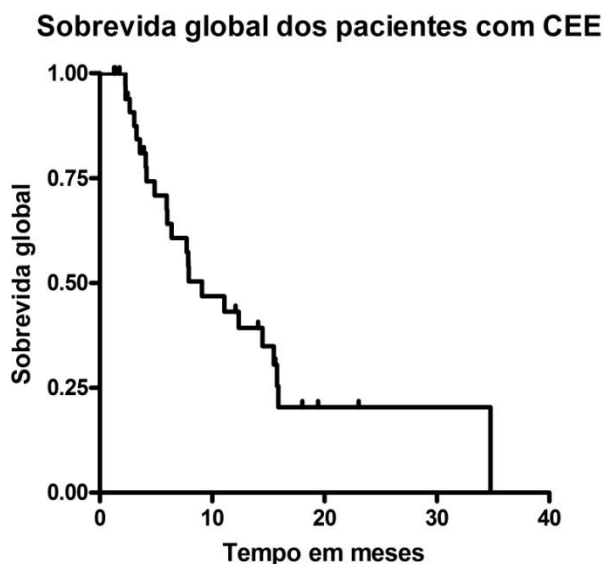


Figura 4.1: Curva de Kaplan-Meier representando a sobrevida global dos pacientes diagnosticados com CEE que doaram amostras frescas (tecido normal adjacente e tumoral) para as análises de expressão gênica e perfil de metilação de *DSG1*.

A análise de expressão gênica foi realizada em um total de 36 amostras de CEE e de tecido normal adjacente pareadas, sendo que em duas amostras tumorais não foi possível detectar a expressão de *DSG1* e estes pacientes foram excluídos das análises posteriores. Dentre as amostras em que o RNAm de *DSG1* foi detectado, foi observada uma redução significativa da expressão de *DSG1* no tumor, em comparação com o tecido normal adjacente ($p=0,0043$, Figura 4.2a). A mediana de expressão no tecido normal adjacente foi de 0,05135, enquanto no tumor foi de 0,01613.

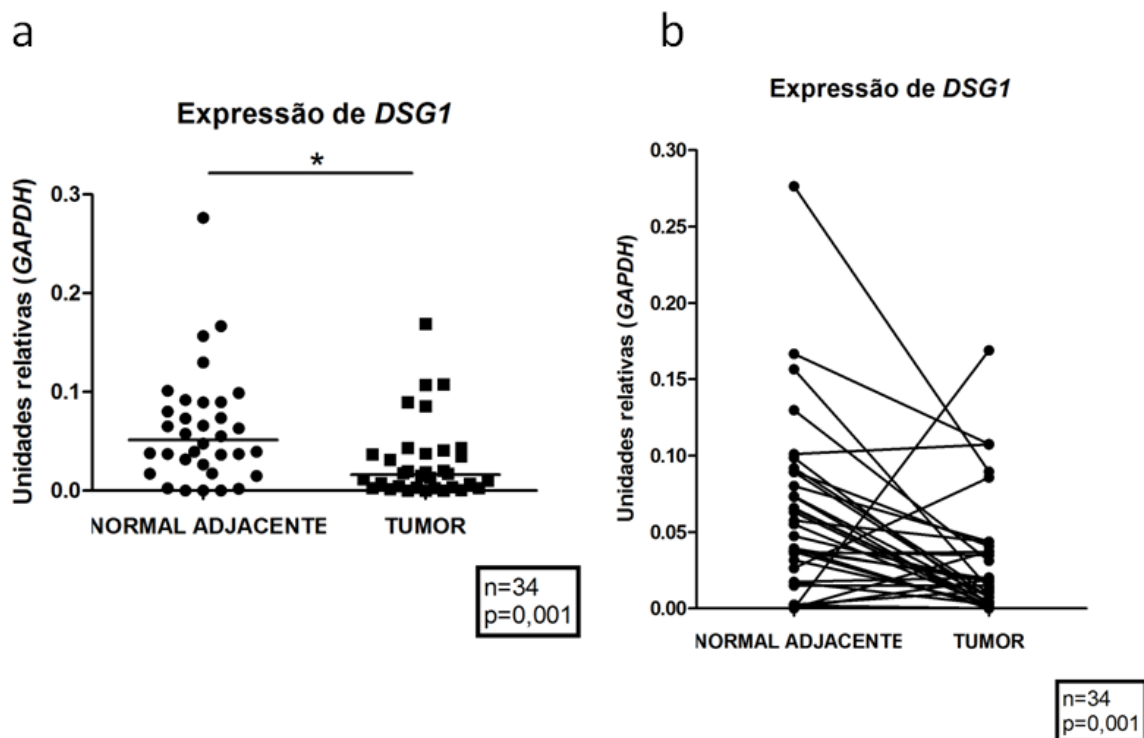


Figura 4.2: Análise do perfil de expressão gênica de *DSG1* em pacientes com CEE. (a) Dot-blot representando a comparação da expressão entre tecido normal adjacente e tumor. (b) Comparação pareada de expressão entre tecido normal adjacente e tumor. * $p < 0,05$, teste de Wilcoxon.

Em análise pareada das amostras (Figura 4.2b), é possível observar perfis distintos: pacientes que apresentaram maior expressão do gene no tumor (14%); um grupo de pacientes que mantiveram níveis de expressão semelhantes nos dois tecidos (12%); e pacientes com menor expressão de *DSG1* no tumor (74%). Isso nos levou a avaliar se a heterogeneidade observada na expressão de *DSG1* poderia estar correlacionada às características clínico-patológicas dos pacientes. Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para nenhuma das comparações feitas utilizando os níveis de expressão gênica no tumor ou o fold-change de expressão (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Dados Clínico-patológicos dos indivíduos incluídos no estudo e relação entre os valores de expressão e metilação de *DSG1*.

	Expressão no tumor	Valor de p	Fold-change de Expressão	Valor de p	Metilação no tumor	Valor de p	Delta de metilação	Valor de p
Idade								
< Mediana	0,01722 (2,242e-005 – 0,08962)		0,3242 (0,0003069 – 160,9)		75,42 (29,06 – 93,40)		35,88 (-2,000 – 84,00)	
> Mediana	0,01309 (0,0005437 – 0,1690)	0,4801	0,4491 (0,01463 – 1292)	0,9725	53,63 (28,40 – 69,81)	0,0055	28,81 (-19,36 – 49,41)	0,0906
Gênero								
Homens	0,01504 (2,428e-005 – 0,1690)		0,4491 (0,0006180 – 1292)		66,23 (28,40 – 93,40)		30 (-16,98 – 84,00)	
Mulheres	0,03125 (2,242e-005 – 0,1073)	0,8913	0,2406 (0,0003069 – 1,061)	0,3693	58,4 (29,06 – 92,94)	0,3734	17,2 (-19,36 – 39,77)	0,1119
Diferenciação do tumor								
Pouco	0,004503 (3,433e-005 – 0,1073)		0,1593 (0,01852 – 111,8)		72,86 (46,00 – 93,40)		34,18 (13,00 – 68,13)	
Moderadamente	0,01722 (2,242e-005 – 0,1690)	0,4466	0,3622 (0,0003069 – 1292)	0,9378	59,23 (28,40 – 89,05)	0,038	27,11 (-19,36 – 84,00)	0,0851
Invasão linfonodal								
N0	0,01595 (0,007652 – 0,03755)		2,896 (0,08567 – 160,9)		54,64 (42,00 – 84,00)		29,77 (24,00 – 84,00)	
N1	0,0102 (2,242e-005 – 0,1073)	0,9273	0,1593 (0,0003069 – 1,061)	0,1091	52,95 (29,06 – 89,05)	0,9273	32,89 (-2,000 – 58,84)	0,9273
Metástase								
M0	0,007652 (0,002743 - 0,02033)		0,1593 (0,08567 – 1,165)		46,00 (42,00 - 48,28)		27,00 (24,00 – 29,54)	
M1	0,03125 (2,242e-005 – 0,1690)	0,3916	0,3242 (0,0003069 – 1292)	0,8763	58,40 (29,06 – 80,12)	0,213	17,20 (-19,36 – 49,41)	0,7555

Nota: Os valores representados indicam a mediana em cada grupo avaliado e, entre parênteses, estão representados os valores mínimos e máximos observados.

Em seguida, avaliamos se a expressão gênica de *DSGI* teria um impacto na sobrevida dos pacientes. Na Figura 4.3, podemos observar que indivíduos com expressão abaixo ou acima da mediana apresentaram uma sobrevida global bastante semelhante ($p=0,2056$).

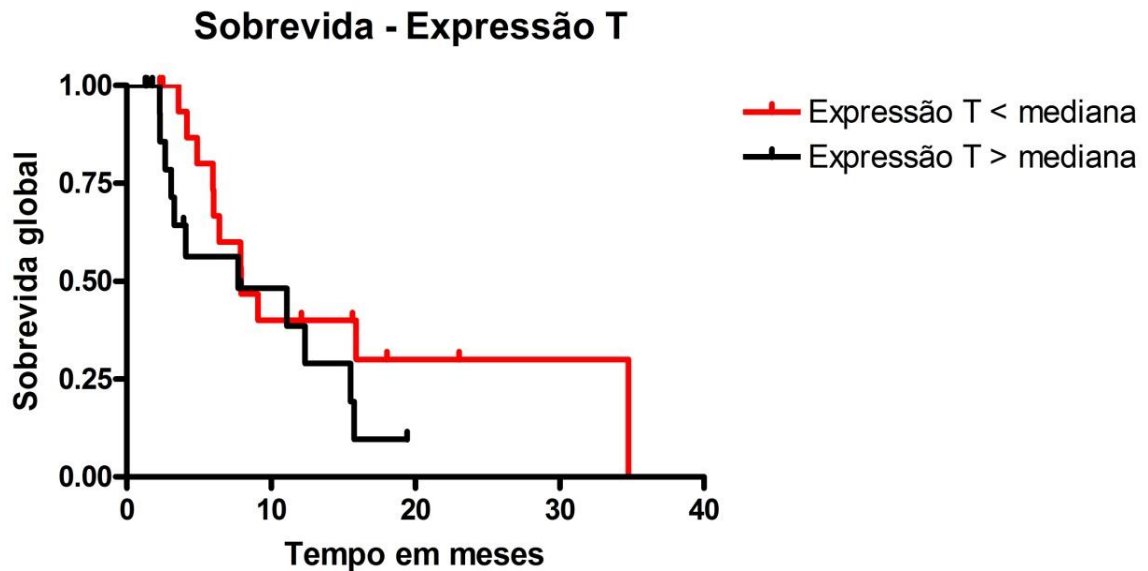


Figura 4.3: Curva de Kaplan-Meier representando a análise de sobrevida global dos pacientes com CEE de acordo com os valores de expressão de *DSGI* no tecido tumoral. Linha vermelha: expressão no tumor abaixo da mediana; linha preta: expressão no tumor acima da mediana. $p=0,2056$, teste de log-rank.

Para a análise do perfil de metilação da região promotora de *DSGI*, foram analisadas 36 amostras pareadas de tecido normal adjacente e CEE. Nesta análise, foi observado um aumento significativo da metilação na região promotora no tumor, em relação ao tecido normal adjacente ($p<0,0001$, Figura 4.4a), com o tecido normal apresentando uma mediana de 26,45% de metilação e o tumor de 62,52%.

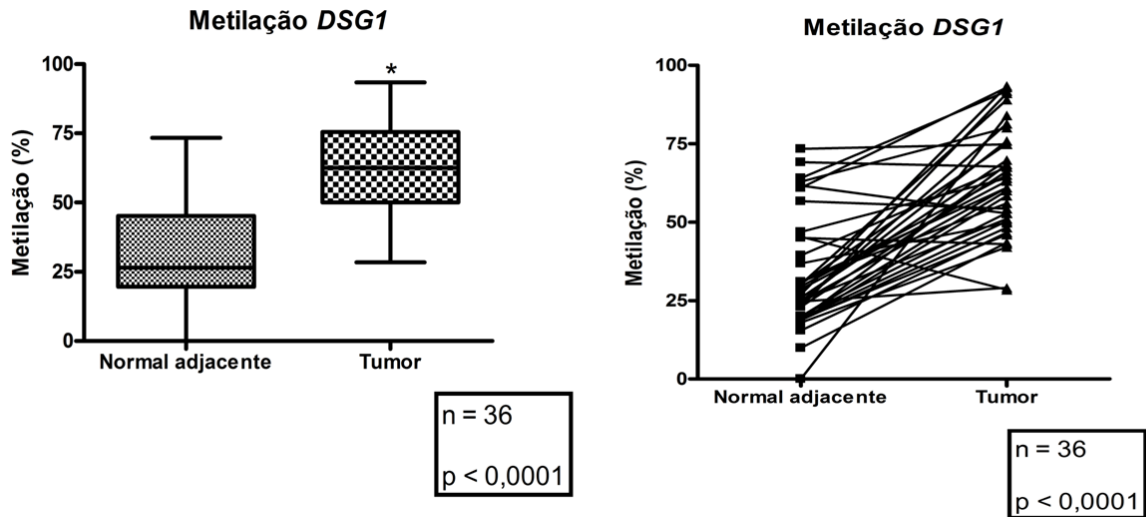


Figura 4.4: Análise do perfil de metilação da região promotora de *DSG1* em pacientes com CEE. (a) Box-plot representando a comparação da metilação entre tecido normal adjacente e tumor. (b) Comparação pareada de metilação entre tecido normal adjacente e tumor. * $p < 0,05$, teste de Wilcoxon.

Em análise pareada, também é possível notar grupos com perfis distintos de metilação: um grupo maior de pacientes com maiores níveis de metilação no tumor (80,5% das amostras); um grupo de pacientes que manteve um perfil de metilação semelhante nas duas avaliações (14%) e um grupo pequeno em que a metilação diminuiu no tumor (5,5%) (Figura 4.4b).

Avaliamos em seguida se existia uma correlação entre os valores de metilação e expressão gênica de *DSG1* nas amostras avaliadas, o que seria indicativo da regulação da expressão por este mecanismo epigenético. Na Figura 4.5, podemos observar uma correlação inversa significativa entre estes valores em cerca de 37,7% dos casos ($p = 0,0015$).

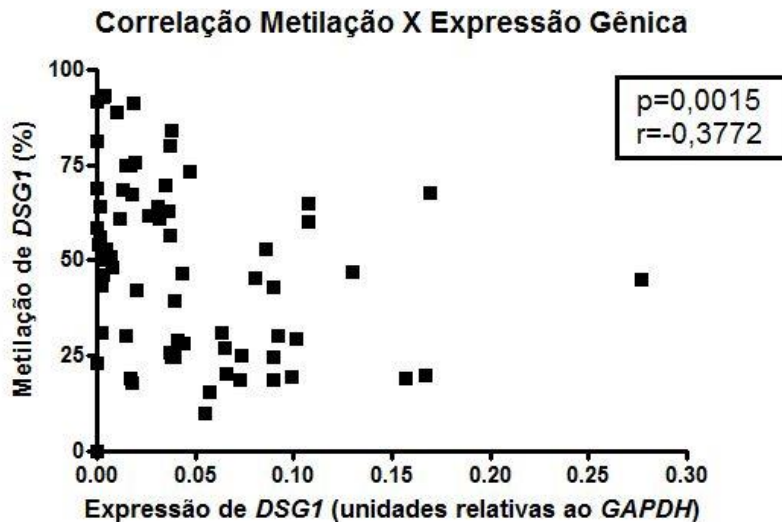


Figura 4.5: Avaliação da correlação entre expressão gênica e metilação da região promotora de *DSG1* em amostras de tumor e tecido adjacente não tumoral de pacientes com CEE. Teste de Spearman.

Avaliamos também se existiria uma correlação entre os níveis de metilação no tumor ou delta de metilação (metilação no tumor menos a metilação no tecido normal adjacente) com os dados clínico-patológicos dos pacientes (Tabela 4.2). De maneira interessante, menores níveis de metilação foram observados no tecido tumoral de indivíduos com idade acima da mediana em comparação a indivíduos com idade inferior à mediana ($p=0,0055$), enquanto tumores moderadamente diferenciados apresentaram menores níveis de metilação quando comparados a tumores pouco diferenciados ($p=0,038$).

Na Figura 4.6, podemos observar a análise de sobrevida global dos pacientes de acordo com os níveis de metilação da região promotora de *DSG1* nos tumores. Os dados mostraram que pacientes com níveis de metilação acima da mediana apresentam uma sobrevida significativamente menor do que indivíduos com valores de metilação abaixo da mediana ($p=0,0144$). A sobrevida média nesses grupos foi de 6,0 e 15,5 meses, respectivamente. Devido à associação observada entre os níveis de metilação no tumor e a idade dos pacientes em avaliação anterior, foi feita uma análise de sobrevida global ajustada por idade. Isto demonstrou que valores de metilação de *DSG1* no tumor são um fator de prognóstico independente da idade em CEE, com uma *hazard ratio* de 3,156 (1,054-9,455).

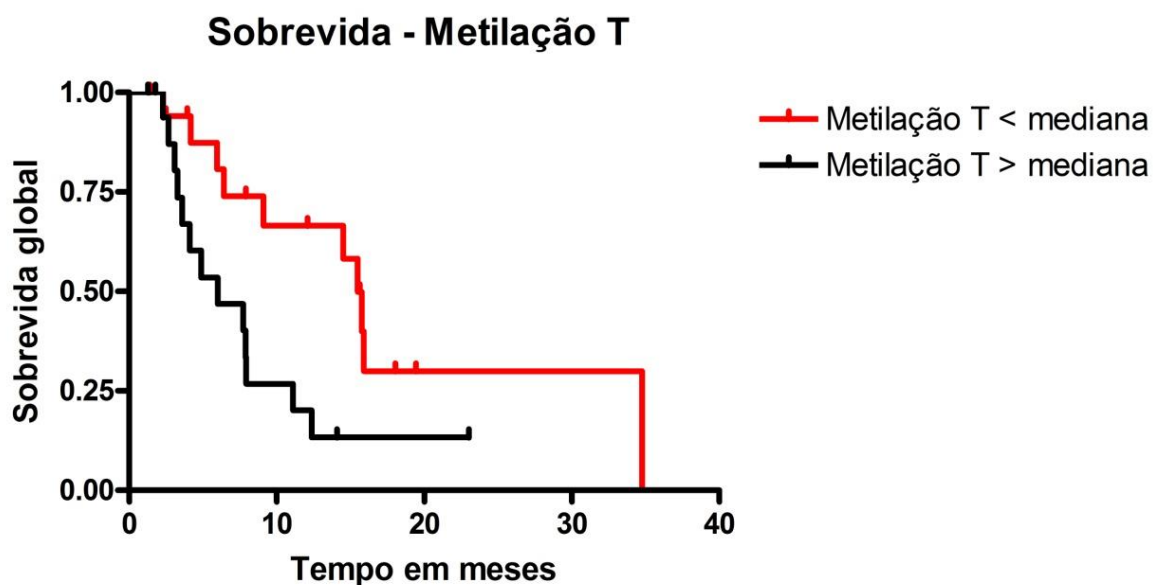


Figura 4.6: Curva de Kaplan-Meier representando a análise de sobrevida global dos pacientes com CEE de acordo com os valores de metilação da região promotora de *DSG1* no tecido tumoral. Linha vermelha: metilação no tumor abaixo da mediana; linha preta: metilação no tumor acima da mediana. $p=0,0144$, teste de log-rank.

4.3 Análise da expressão proteica de DSG1 dos pacientes com CEE

Para a avaliação da expressão proteica de DSG1, 25 peças cirúrgicas incluídas em parafina foram avaliadas pela técnica de imunohistoquímica, contendo regiões tumorais e tecido normal adjacente. A avaliação foi realizada pela quantificação do percentual de células marcadas por lâmina, tanto para a marcação citoplasmática, quanto para a marcação membranar.

Como controles positivo e negativo da reação, foi utilizado esôfago de indivíduos saudáveis (Figuras 4.7a e b). O padrão de marcação de DSG1 encontrado no esôfago de indivíduos saudáveis foi o esperado para epitélios, com marcação citoplasmática nas camadas basais e marcação membranar nas camadas suprabasal e apical.

O padrão de marcação de DSG1 encontrado nos tumores foi bastante heterogêneo. Houve casos com marcação predominantemente membranar (Figura 4.7c) e casos com predominância de marcação citoplasmática (Figura 4.7d). Além disso, seis casos apresentaram marcação nuclear (25% do total de casos, Figura 4.7e) e um caso apresentou marcação perinuclear (4% do total de casos, Figura 4.7f).

Outro achado que nos chamou atenção foi a heterogeneidade de marcação observada em lâminas de fragmentos tumorais diferentes oriundas do mesmo paciente. As figuras 4.7g e h representam a marcação predominante encontrada em regiões distintas de um mesmo tumor, sendo que podemos observar uma predominância de marcação membranar na Figura 4.7g, enquanto o fragmento representado na Figura 4.7h apresenta uma marcação predominantemente citoplasmática. Uma grande heterogeneidade também foi observada em outro caso representado nas Figuras 4.7i e j. Enquanto na região representada na primeira figura observamos áreas sem qualquer marcação e pequenas áreas com marcação membranar, na segunda imagem há uma predominância da marcação citoplasmática.

Um terceiro achado sinalizado pelas patologistas que fizeram a avaliação das lâminas foi uma aparente relação entre a ausência de marcação membranar de DSG1 e o menor grau de diferenciação celular, enquanto que, dentro do mesmo tumor, células que mantiveram o perfil de marcação membranar apresentavam características mais diferenciadas (Figura 4.7k). Finalmente, a Figura 4.7l mostra um campo com intensa heterogeneidade de marcação, contendo células tumorais sem qualquer expressão de DSG1, células com marcação membranar e/ou citoplasmática.

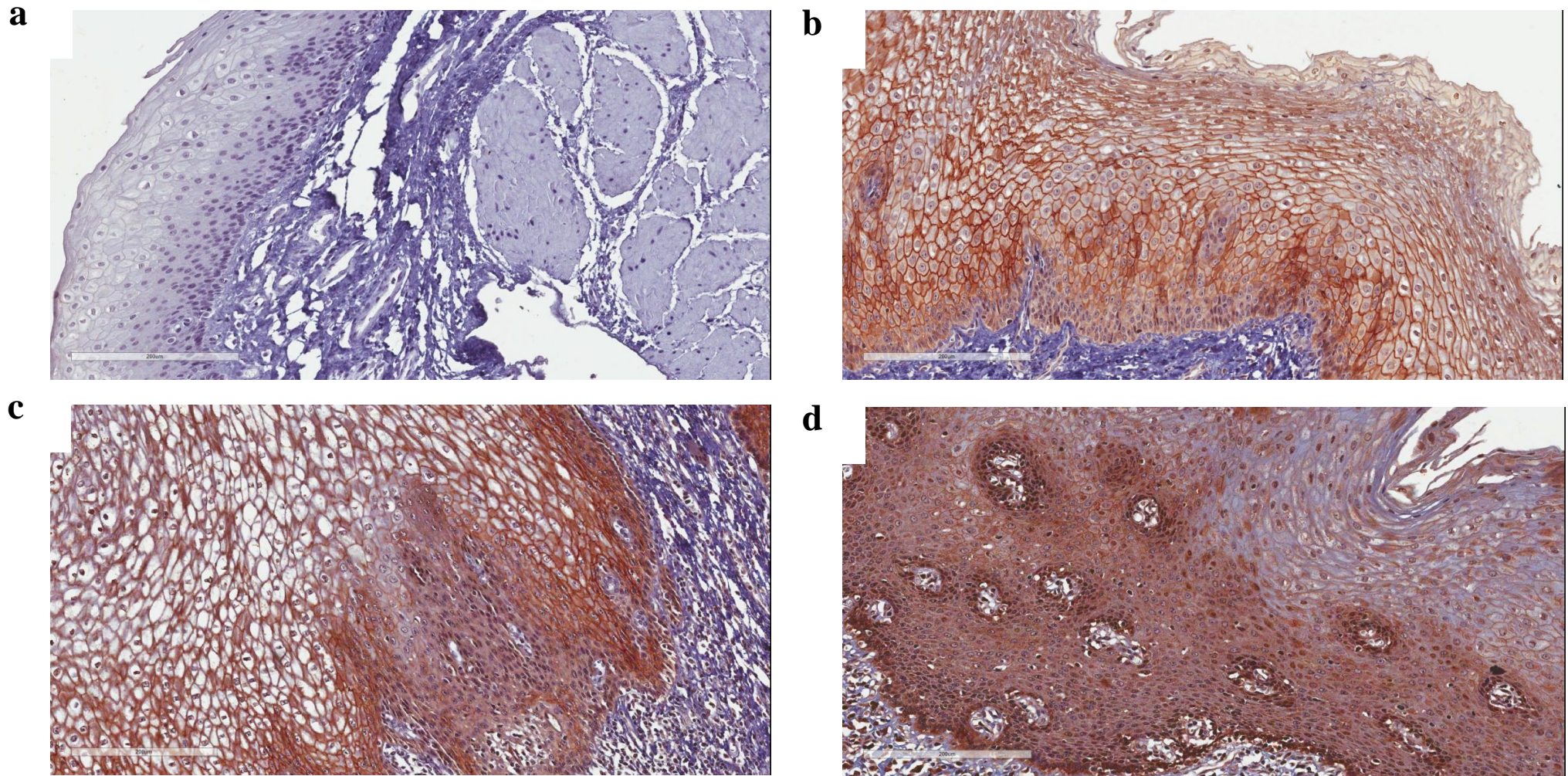


Figura 4.7: Imunomarcção de DSG1 em esôfago saudável e CEE. (a) Controle negativo da reação de imunohistoquímica em esôfago saudável; (b) Controle positivo da reação de imunohistoquímica em esôfago saudável; (c) Imagem representativa de caso de CEE com marcação predominantemente membranar; (d) Imagem representativa de caso de CEE com marcação predominantemente citoplasmática.

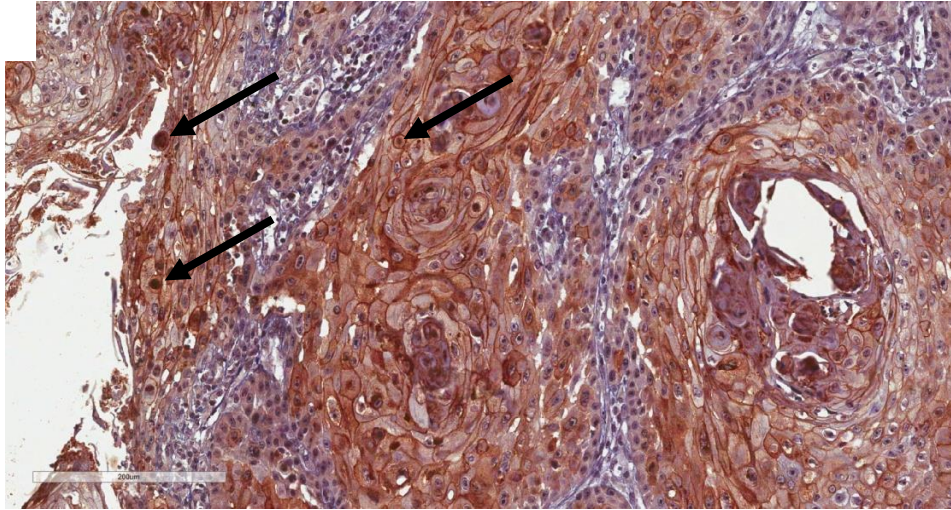
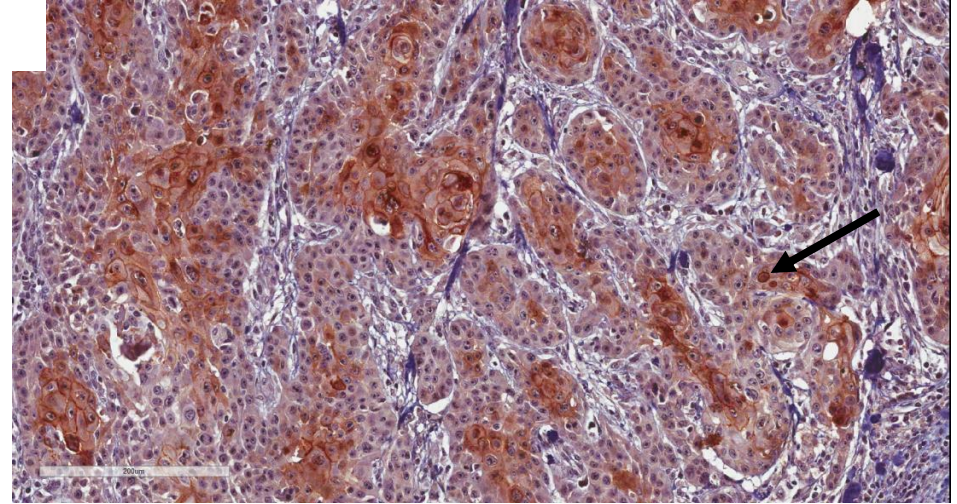
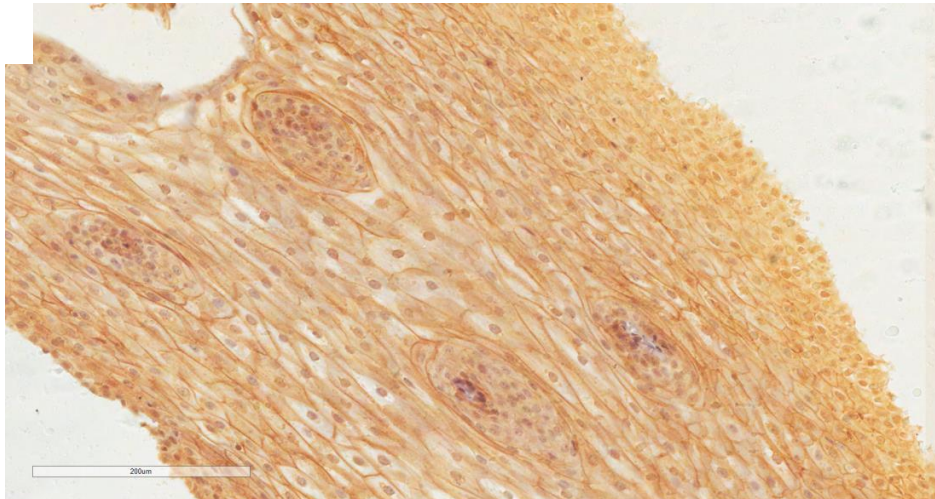
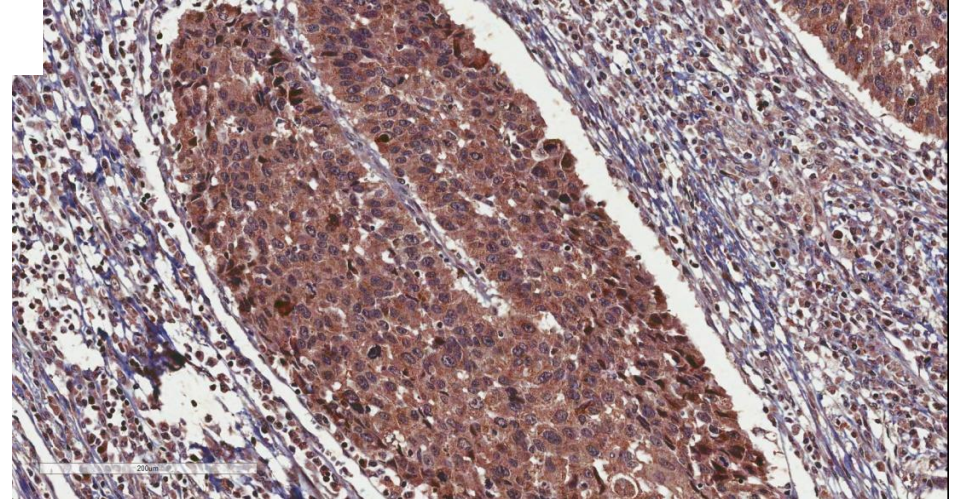
e**f****g****h**

Figura 4.7: Imunomarcção de DSG1 em esôfago saudável e CEE. (e) Imagem representativa de caso de CEE com marcação nuclear, indicada pela seta; (f) Imagem representativa de caso de CEE com marcação perinuclear, indicada pela seta; (g) e (h) Lâminas de dois blocos independentes do mesmo paciente com CEE, onde (g) representa uma predominância de marcação membranar e (h) representa a predominância de marcação citoplasmática.

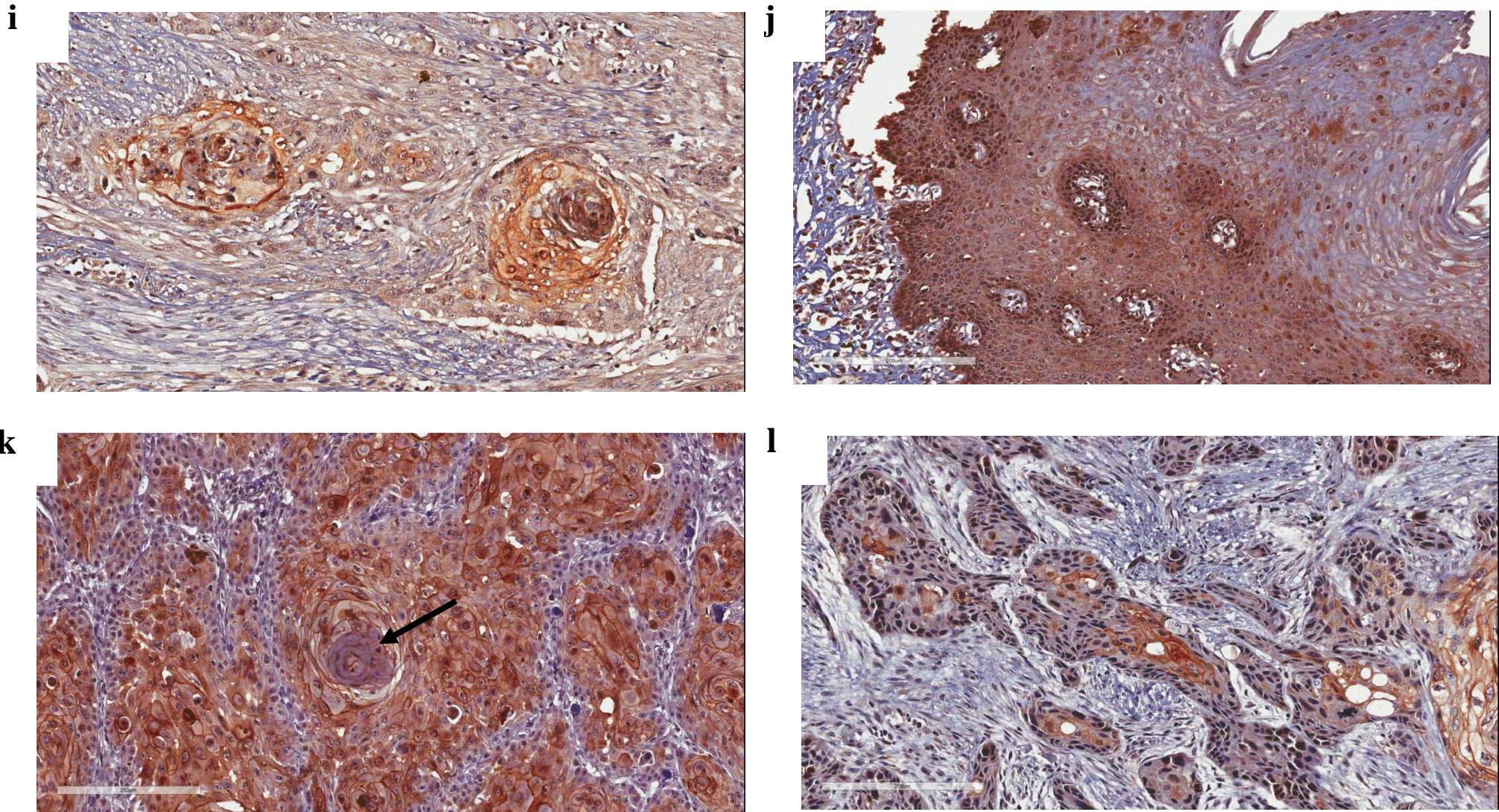


Figura 4.7: Imunomarcção de DSG1 em esôfago saudável e CEE. (i) e (j) Lâminas de dois blocos independentes do mesmo paciente com CEE, sendo que i) apresenta grande heterogeneidade de marcação, incluindo áreas não marcadas e (j) apresenta predominância de marcação citoplasmática; (k) Imagem representativa de perda de marcação de DSG1 em células pouco diferenciadas, indicada pela seta; (l) Imagem representativa de caso demonstrando marcação heterogênea nos subsítios celulares.

Após a quantificação do percentual de células com cada tipo de marcação (membranar ou citoplasmática) em cada caso, foi possível observar uma relação inversa entre a presença de DSG1 na membrana e no citoplasma: enquanto 80% dos casos apresentaram expressão membranar em menos de 50% das células (*scores* 00, 01 e 02), 80% dos casos apresentaram DSG1 no citoplasma em mais de 50% (*scores* 03 e 04; Tabela 4.3). Além disso, dentro da nossa amostra, 28% dos casos não tiveram níveis observáveis de DSG1 na membrana, enquanto que nenhum caso apresentou ausência de expressão de DSG1 no citoplasma, sugerindo uma perda de expressão da proteína na membrana acompanhada de aumento de expressão no citoplasma (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Quantificação do percentual de células marcadas por lâmina em CEE.

<i>Score</i>	Marcação Membranar	Marcação citoplasmática
0	28%	0%
1	32%	12%
2	20%	8%
3	12%	20%
4	8%	60%
Total	100%	100%

Nota: Os scores foram determinados a partir do percentual de células marcadas, em que 0 é ausência de células marcadas, 1 - de 1 a 25% de células marcadas; 2 - de 26 a 50% de células marcadas; 3 - de 51 a 75% de células marcadas e 4 - de 76 a 100% de células marcadas.

4.4 Análise da expressão da isoforma de *DSG1*

Em busca de validar a isoforma predita de *DSG1* depositada no Human Protein Atlas (UHLEN et al., 2015), uma reação de PCR semi-quantitativa foi realizada em duplicata, utilizando cDNAs de cinco amostras pareadas de CEE (tecido normal adjacente e tecido tumoral) e uma amostra de pool de amostras de carcinoma de células escamosas de laringe (Figura 4.8). Foi observada a expressão da isoforma de *DSG1* em todas as amostras. Entretanto, não foi possível determinar se existe diferença significativa de expressão desta isoforma entre o tecido normal e o tecido tumoral de pacientes com CEE.

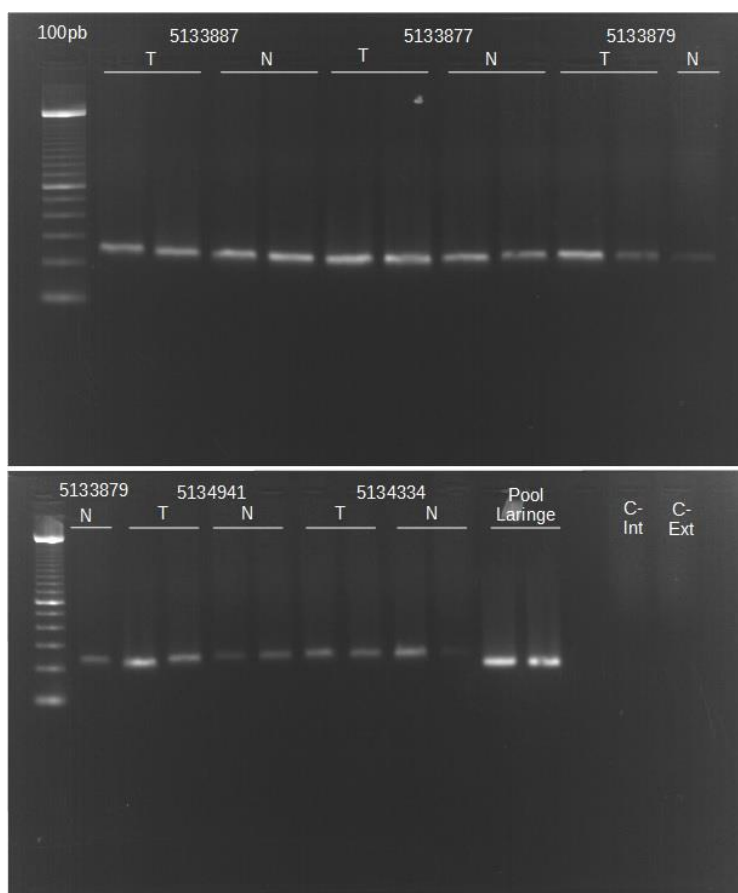


Figura 4.8: Expressão da isoforma de *DSG1* em amostras pareadas de CEE e em *pool* de amostras de carcinoma de células escamosas de laringe .

4.5 Análise de expressão gênica e perfil de metilação de *DSG1* em linhagem de CEE humano frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina

Com o intuito de confirmar a regulação da expressão de *DSG1* por metilação em sua região promotora, realizamos ensaios *in vitro*. Para isso, inicialmente avaliamos a expressão de *DSG1* em cinco linhagens provenientes de esôfago humano, sendo uma obtida a partir de células esofágicas saudáveis (HET-1A) e quatro obtidas a partir de CEE (TE-1, TE-11, TE-13 e OE-21). Na Figura 4.9, podemos observar que apenas a linhagem OE-21 apresentou amplificação detectável por RT-PCRq, assim como um pico único na curva de dissociação (Figura 4.10), referente à desnaturação do produto de amplificação. Por isso, esta linhagem foi utilizada nos experimentos subsequentes.

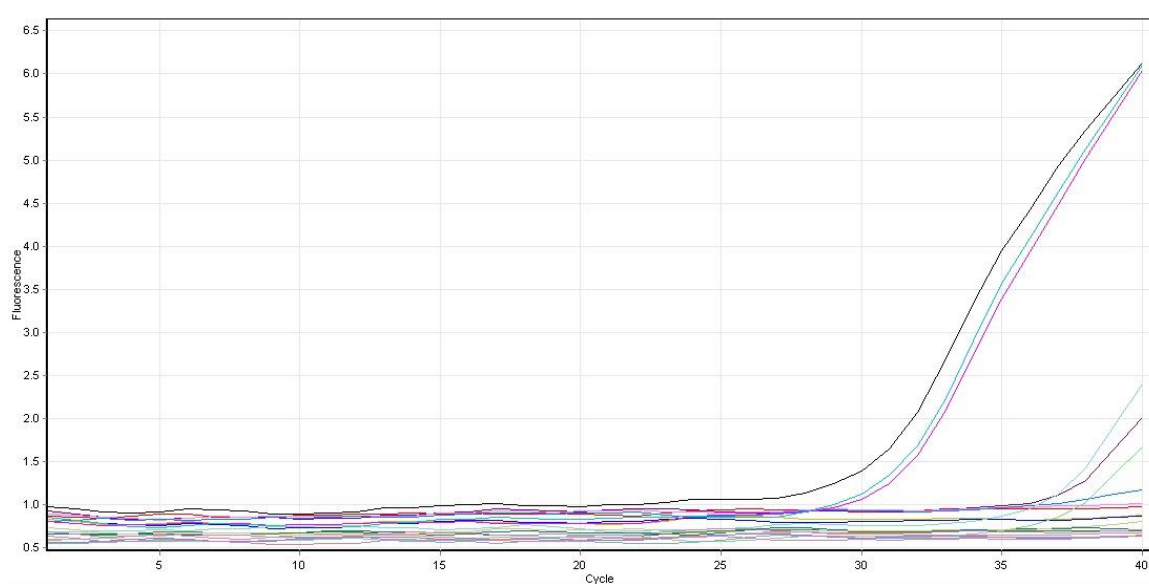


Figura 4.9: Curva de amplificação de *DSG1* em linhagens de esôfago humano saudável e de CEE. As curvas rosa, preta e azul representam as amostras de linhagem de CEE OE-21, demonstrando a amplificação do produto de *DSG1*. As outras curvas representam as linhagens HET-1A, TE-1, TE-11 e TE-13.

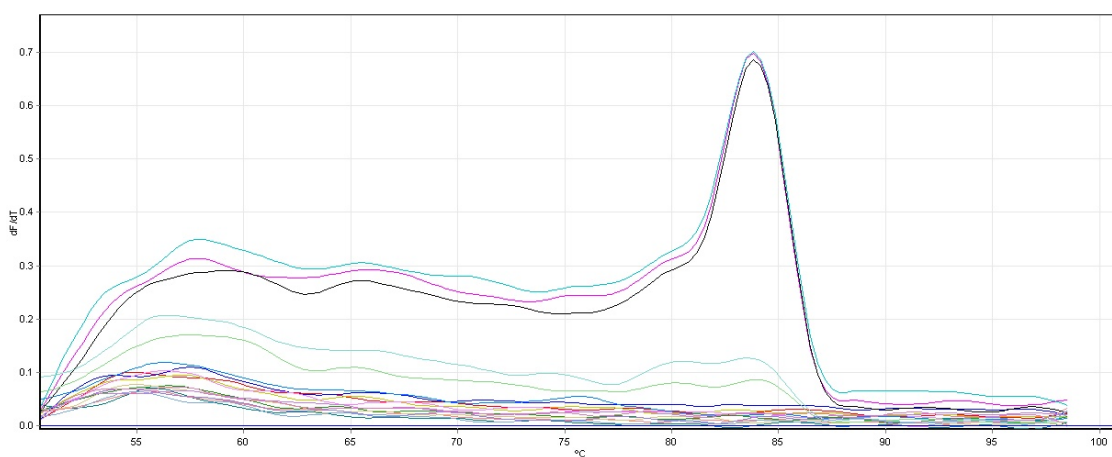


Figura 4.10: Curva de dissociação do produto de amplificação de *DSG1* em linhagens de esôfago humano saudável e de CEE. As curvas rosa, preta e azul representam as amostras de linhagem de CEE OE-21, demonstrando a amplificação específica do produto de *DSG1*. As outras linhas representam as linhagens HET-1A, TE-1, TE-11 e TE-13.

4.5.1. Análise de viabilidade e do perfil de metilação de *DSG1* em linhagem de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com diferentes doses de 5-Aza-2'-desoxicitidina

O tratamento da linhagem OE-21 com o agente desmetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina foi feito inicialmente com concentrações de 10 nM, 100 nM e 1 μ M por 6 dias (144 horas), com o intuito de determinar que dose da droga apresentaria níveis menos tóxicos e o maior efeito de desmetilação. Foi possível observar que a dose de 100 nM, apesar de ter se mostrado tóxica, com controle apresentando média de viabilidade celular de $59,24 \times 10^4$ células e a dose de 100 nM apresentando média de células viáveis de $8,52 \times 10^4$ (Figura 4.11a), causou a maior desmetilação da região promotora de *DSG1* na linhagem OE-21, com médias de metilação no controle de 52,32 e na dose de 100 nM de 10,55 (Figura 4.11b).

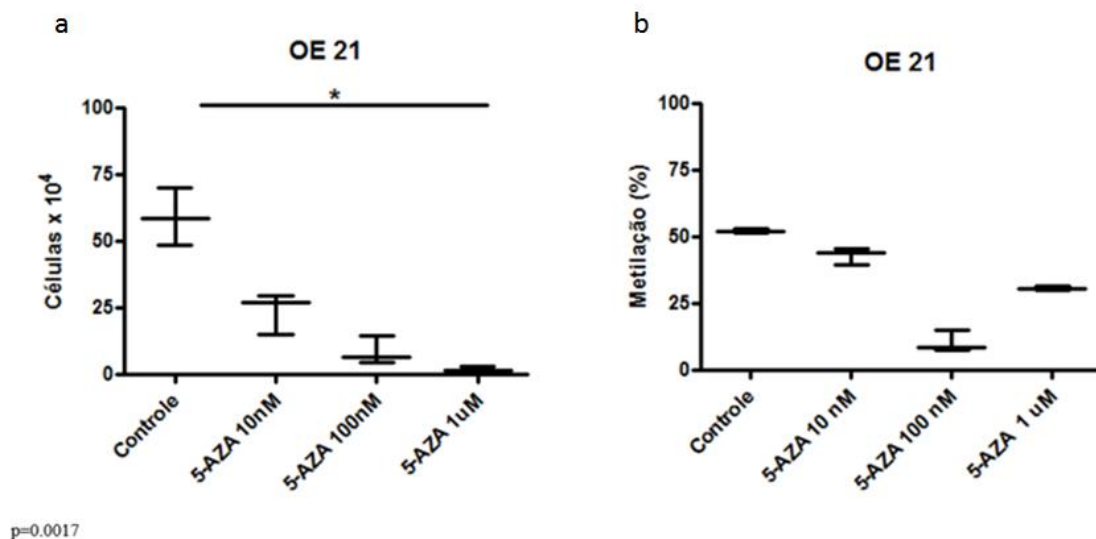


Figura 4.11: Viabilidade celular e perfil de metilação de *DSGI* em linhagem celular de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com diferentes doses de 5-Aza-2'-desoxicitidina por 144 horas. (a) Contagem de células viáveis nas doses testadas; (b) Percentual de metilação da região promotora de *DSGI* nas doses testadas. * $p < 0,05$, teste de Kruskal-wallis e pós teste de Dunns.

4.5.2. Análise de viabilidade e do perfil de expressão gênica e de metilação de *DSGI* em linhagem de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina por diferentes períodos de tempo

Uma vez que a dose de 100 nM levou a uma desmetilação expressiva da região promotora de *DSGI*, mas se mostrou altamente tóxica no tempo de 144 horas, foi realizado o tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina por menores intervalos de tempo. Na Figura 4.12, podemos observar que os tratamentos até 96 horas apresentaram uma média de viabilidade celular acima de 50%, enquanto o tratamento por 120 horas levou a uma redução de viabilidade de mais de 60%. Além disso, o tratamento com o agente desmetilante levou a um aumento de expressão de cerca de 1,9 vezes em relação ao controle no tempo 48 horas, sendo essa indução máxima em 72 horas (9,4 vezes; Figura 4.13), enquanto que no tempo de 96 horas, essa indução foi de 4 vezes em relação ao controle. Foi observada também uma desmetilação progressiva do promotor de *DSGI* ao longo do tempo de tratamento, com uma perda de metilação de 24% no tempo de 48 horas, enquanto em 72 e 96 horas essa diferença alcançou 33% em relação ao controle (Figura 4.14).

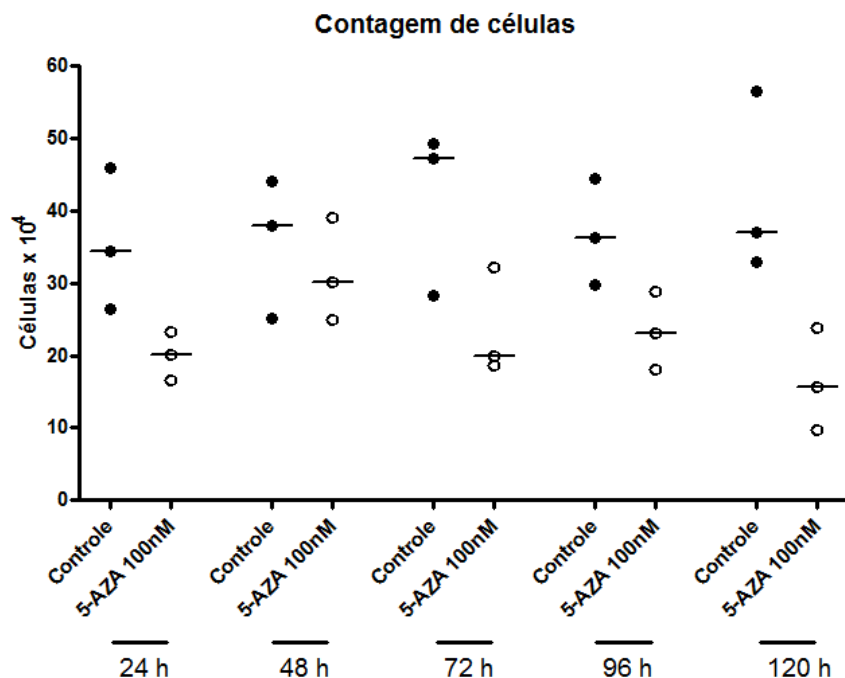


Figura 4.12: Viabilidade celular em linhagem celular de CEE humano OE-21 em tempos de 24 a 120 horas de tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 100 nM. O experimento foi realizado três vezes em triplicata. $p > 0,05$, teste de Wilcoxon.

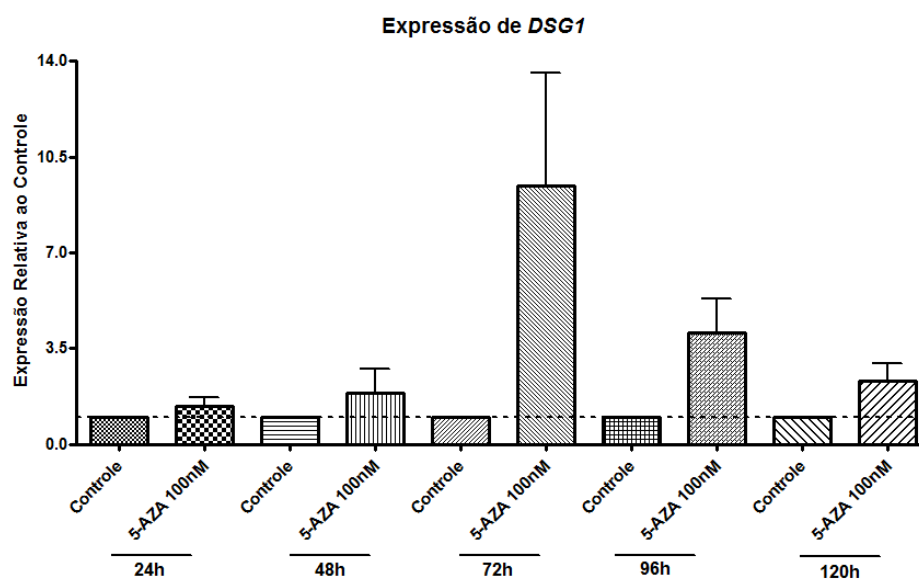


Figura 4.13: Expressão de *DSG1* em linhagem celular de CEE humano OE-21 em tempos de 24 a 120 horas de tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 100 nM. Valores relativos ao controle de cada tempo. O experimento foi realizado três vezes em triplicata. $p > 0,05$, teste de Wilcoxon.

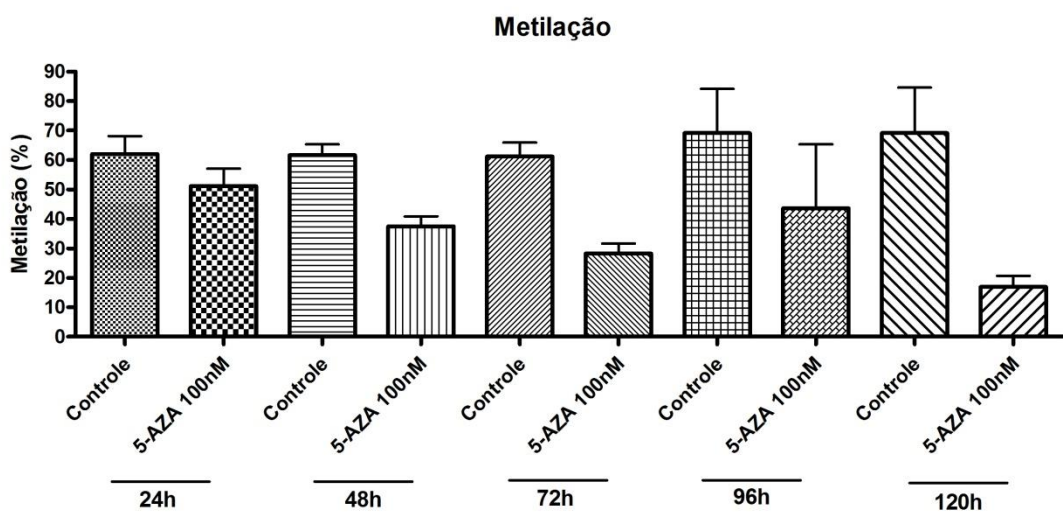


Figura 4.14: Percentual de metilação da região promotora de *DSG1* em linhagem celular de CEE humano OE-21 em tempos de 24 a 120 horas de tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 100 nM. O experimento foi realizado três vezes em triplicata. $p > 0,05$, teste de Wilcoxon.

Em análise de correlação entre os valores de metilação e de expressão de *DSG1* levando-se em conta todos os tempos do tratamento, não foi encontrada correlação significativa (Figura 4.15).

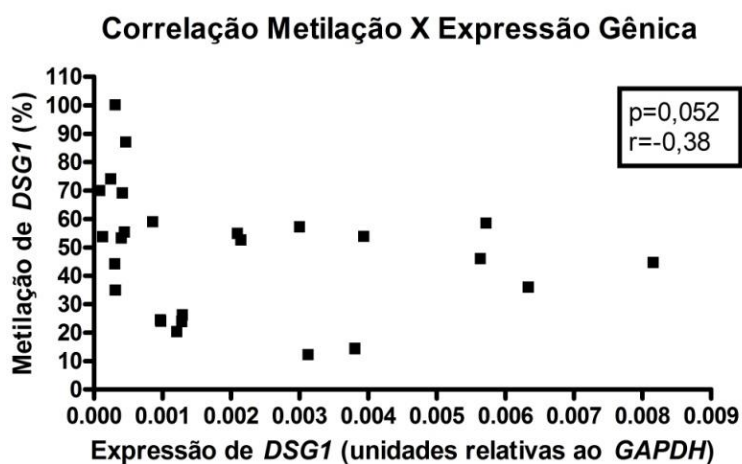


Figura 4.15: Avaliação da correlação entre expressão gênica e metilação da região promotora de *DSG1* nos tempos de 24 a 120 horas. Teste de Spearman.

Entretanto, analisando a correlação entre expressão gênica e percentual de metilação de *DSG1* nos tempos de 72 e 96 horas, os quais apresentaram maior indução da expressão de *DSG1* em relação ao controle, foi encontrada correlação inversa significativa entre estes parâmetros (Figura 4.16). Ou seja, menores níveis de metilação de *DSG1* estavam relacionados a maiores níveis de expressão gênica, e vice-versa.

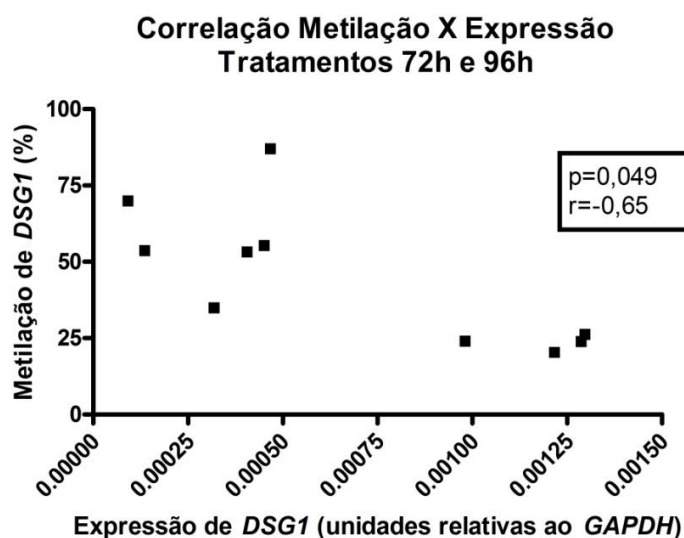


Figura 4.16: Avaliação da correlação entre expressão gênica e metilação da região promotora de *DSG1* nos tempos de 72 e 96 horas. Teste de Spearman.

4.6 Análise da expressão proteica de *DSG1* em linhagem de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina

Após a observação da indução da expressão gênica de *DSG1* em resposta ao tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina, avaliamos se esta mesma indução era observada nos níveis proteicos de *DSG1*. Para isso, o tratamento das células OE-21 foi realizado com o agente desmetilante na concentração de 100 nM por 72 horas, visto que esta foi a condição que resultou nos maiores aumentos de expressão gênica. Na avaliação por *western blotting*, foi possível observar a banda esperada referente à *DSG1* completa (165 KDa), que teve um aumento de 36% após o tratamento em relação ao controle (Figura 4.17).

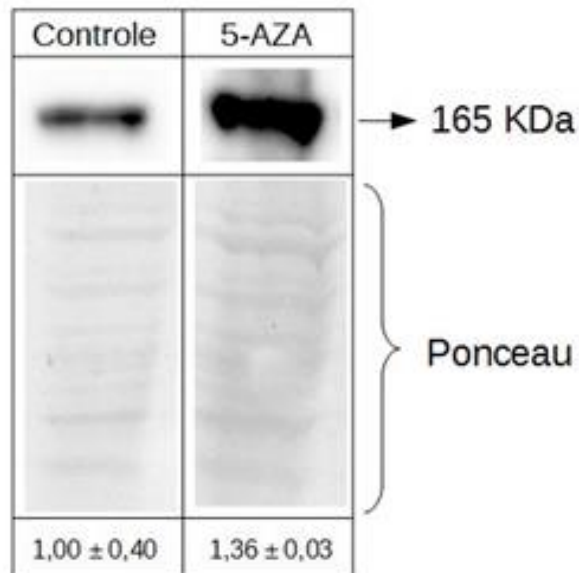


Figura 4.17: Análise da expressão proteica de DSG1 por *Western Blotting* em linhagem celular de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina a 100 nM por 72 horas. A quantificação representada na parte inferior da figura foi feita pela normalização com Ponceau de dois experimentos.

Em seguida, avaliamos a expressão proteica de DSG1 por imunofluorescência após o tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina nas mesmas condições utilizadas para a realização da técnica de *western blotting*. Esta análise teve o intuito não só de avaliar, por uma outra técnica, a influência da desmetilação do promotor de *DSG1* sobre sua expressão proteica, mas também de avaliar o efeito da desmetilação sobre a compartimentalização celular de DSG1.

Na Figura 4.18, é possível observar imagens de campos representativos de células tratadas apenas com o veículo da droga (controle) e de células tratadas com o agente desmetilante (5-aza-2'-desoxicitidina a 100 nM por 72h). Além disso, também estão representadas por círculos as áreas delimitadas para quantificação da marcação membranar ou citoplasmática, tendo sido avaliadas quatro áreas distintas para cada tipo de marcação por campo, em oito campos para membrana e o mesmo número de campos para citoplasma.

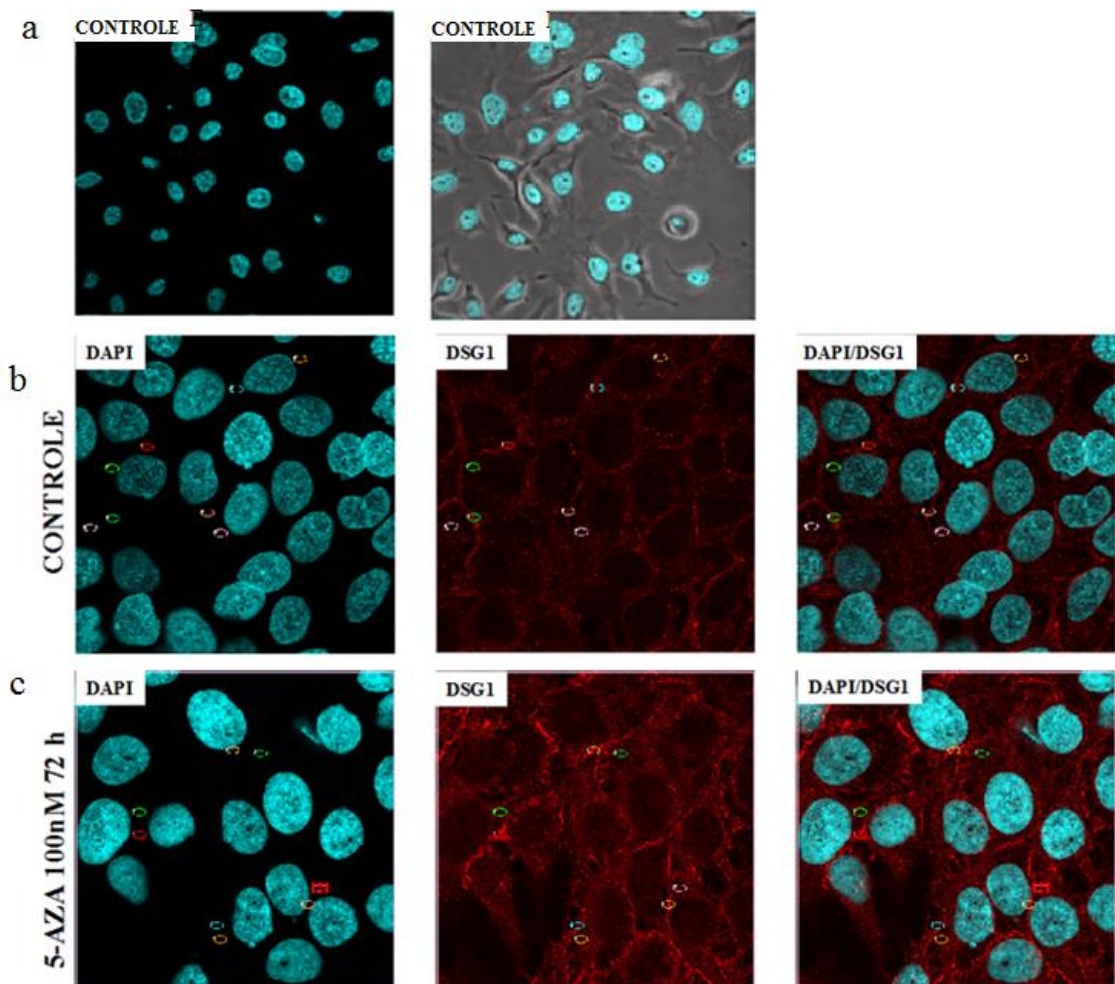


Figura 4.18: Expressão protéica de DSG1 avaliada por imunofluorescência em linhagem celular de CEE humano OE-21 frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina a 100 nM por 72 horas. (A) Controles negativos da reação não apresentando marcação de DSG1; (B) Imagem representativa de células incubadas apenas com DMSO, o veículo do agente desmetilante, demonstrando marcação membranar e citoplasmática de DSG1; (C) Imagem representativa de células tratadas com 5-Aza-2'-desoxicitidina, mostrando aumento de marcação membranar e citoplasmática de DSG1 em comparação às células tratadas com DMSO.

Em análise da expressão proteica pela quantificação da emissão de fluorescência por pixel dentro dos campos escolhidos, primeiro foi possível observar um aumento significativo da expressão proteica total após o tratamento com 5-aza-2'-desoxicitidina (Figura 4.19a). Com relação à localização celular, também foi possível observar aumentos significativos da expressão membranar e da expressão citoplasmática isoladamente após o

tratamento (Figura 4.19b e c). É importante ressaltar que tanto nas células tratadas apenas com o veículo da droga (controle) quanto naquelas tratadas com o agente desmetilante, a expressão membranar foi maior que a expressão citoplasmática.

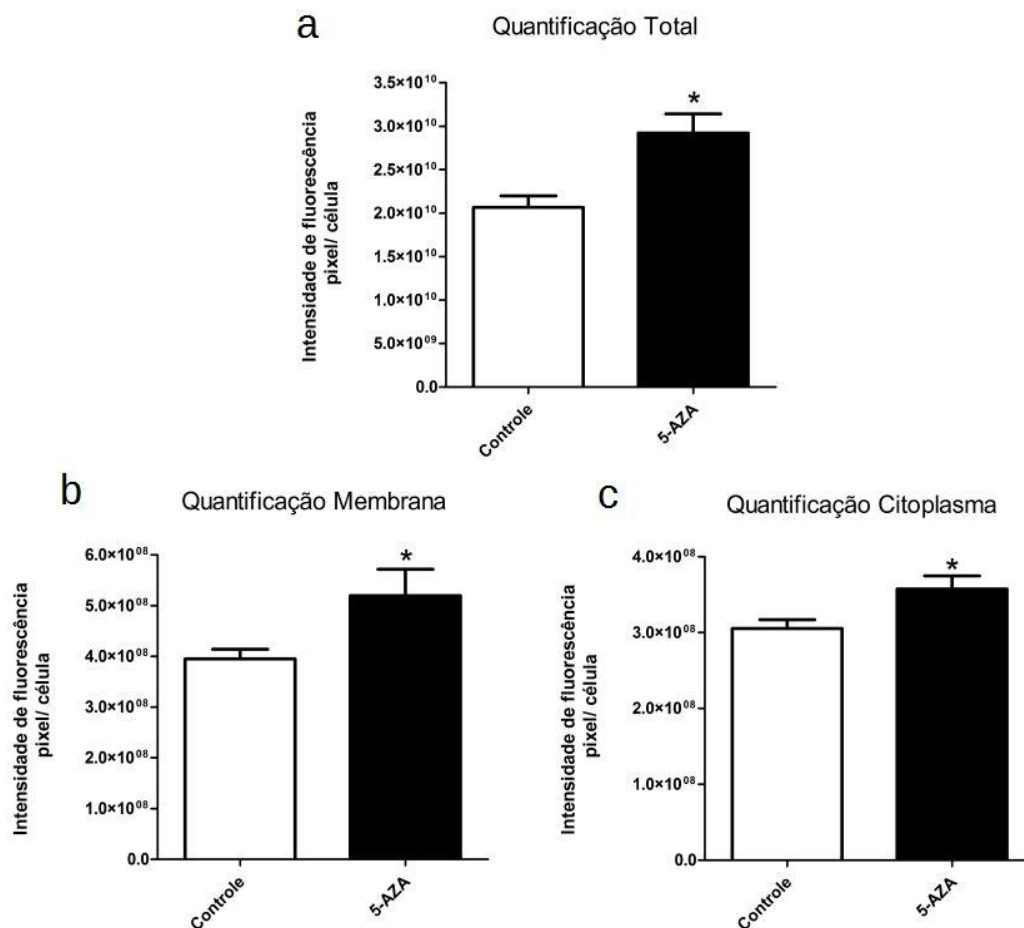


Figura 4.19: Quantificação da expressão proteica de DSG1 avaliada por imunofluorescência frente ao tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina a 100 nM por 72 horas. (a) Quantificação de intensidade de fluorescência das regiões membranar e citoplasmática, mostrando aumento significativo de expressão de DSG1 frente ao tratamento. (b) Quantificação de intensidade de fluorescência da região membranar, mostrando aumento significativo de expressão de DSG1 frente ao tratamento. (c) Quantificação de intensidade de fluorescência da região citoplasmática, mostrando aumento significativo de expressão de DSG1 frente ao tratamento. * $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunns.

5. DISCUSSÃO

Alterações no padrão de expressão de proteínas de adesão são fenômenos comumente encontrados em diversos tumores. Um exemplo é a perda de função ou expressão de E-caderina, a primeira caderina a ser descrita, que são eventos impactantes durante a progressão tumoral em diferentes tipos de câncer, como estômago, fígado, mama, endométrio e tireoide (PEĆINA-SLAUS, 2003). Diversos mecanismos podem levar à ocorrência deste padrão: mutação, metilação do DNA, clivagem, fosforilação e degradação proteicas (BERX; VAN ROY, 2009; CARNEIRO et al., 2012; HÉCTOR PEINADO, FRANCISCO PORTILLO, 2004). Atualmente, outras caderinas vêm ganhando atenção, e tem sido mostrado que tanto a perda de expressão de proteínas específicas do tecido em questão, quanto o ganho de expressão de caderinas não características do tecido afetado podem ocorrer durante o desenvolvimento tumoral (CHIDGEY; DAWSON, 2007a). Além disso, está cada vez mais claro que proteínas de adesão estão envolvidas não só na manutenção da integridade física do tecido, mas também são cruciais na coordenação do balanço entre proliferação e diferenciação celular (GETSIOS et al., 2009b). Com isso, a avaliação de alterações desses mediadores em câncer pode apontar não só biomarcadores da transformação celular, mas também auxiliar na compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento e progressão de tumores.

O presente estudo é o primeiro trabalho que mostra uma redução da expressão gênica de *Desmogleina 1* no carcinoma epidermóide de esôfago, e o aumento de sua expressão gênica e proteica pela desmetilação de seu promotor *in vitro*. Outros trabalhos em câncer já avaliaram o perfil de expressão de *DSGI*. Por exemplo, na comparação entre ameloblastoma, tumor odontogênico queratinocístico (TOQ) e tecido normal de gengiva, foi mostrado que marcadores de diferenciação epitelial, como *DSGI*, são encontrados mais expressos em TOQ e tecido normal em comparação ao ameloblastoma. Esse e outros achados do estudo reforçaram a diferente origem tecidual desses tumores, enquanto o ameloblastoma é proveniente de epitélio dental, o TOQ provém de células escamosas. Por outro lado, não foi relatada diferença na expressão de *DSGI* entre o TOQ e o tecido normal de gengiva, sugerindo que alterações de expressão de *DSGI* não contribuem para o desenvolvimento deste tipo de tumor, apesar dele ser do mesmo tipo histológico do CEE (HEIKINHEIMO et al., 2015).

Em outros tumores, não foram avaliadas alterações do perfil de expressão gênica de *DSG1* e, apesar da discussão sobre a sua desregulação em condições patológicas ter sido iniciada em tecido epitelial de pele (STANLEY et al., 1986), estudos que avaliaram a sua expressão gênica relacionada a doenças são majoritariamente em tecido esofágico. No contexto do refluxo gastroesofágico, foram publicados dois estudos em que se avaliou o perfil de expressão gênica de proteínas desmossomais (*DSGs* 1, 2, 3 e Placoglobina), um no epitélio distal do esôfago e outro na cárdia. A diferença entre estes tecidos se refere à origem do epitélio: o tecido esofágico distal é composto de epitélio escamoso, enquanto a cárdia (região entre o esôfago inferior e o estômago) é composta de epitélio colunar. No estudo sobre epitélio distal do esôfago, foram avaliadas amostras de refluxo não erosivo, refluxo erosivo e tecido saudável (WEX et al., 2012b). Não foram encontradas diferenças na expressão gênica e proteica de *DSG1* entre o refluxo erosivo e o não erosivo, entretanto, quando estes tecidos foram comparados ao controle, o refluxo não erosivo apresentou expressão gênica de *DSG1* cerca de seis vezes maior. Quando a mesma comparação foi feita entre o refluxo erosivo e o controle saudável, *DSG1* foi encontrada oito vezes mais expressa em nível de RNAm e os níveis de proteicos também se mostraram aumentados (WEX et al., 2012a). Em contrapartida, na cárdia, Placoglobina e *DSG2* foram ubiquamente expressas nas amostras, enquanto a expressão de *DSG1* e 3 não foram detectadas (WEX et al., 2012b). Estes achados reiteram informações já descritas na literatura, como a presença ubíqua de *DSG2* nas superfícies epiteliais como um todo, e a presença restritiva de *DSGs* 1 e 3 nos epitélios escamosos, como esôfago e pele (GARROD; CHIDGEY, 2008). Além disso, trazem à tona a discussão acerca de um possível mecanismo de compensação entre os componentes desmossomais, entre eles as caderinas, como uma tentativa de restaurar a função de barreira epitelial frente a um insulto, neste caso, mediado por acidez.

Blanchard e cols. (2007) avaliaram o perfil global de expressão gênica por meio de técnica em larga escala em pacientes com esofagite eosinofílica, doença similar ao refluxo gastroesofágico, porém de etiologia alérgica. Comparando amostras de indivíduos saudáveis com amostras de indivíduos com doença ativa, foi encontrada uma expressão de IL-13 dezesseis vezes maior na esofagite, além de uma expressão reduzida de *DSG1*. Quando tratadas com IL-13, as amostras dos pacientes com esofagite foram novamente avaliadas quanto ao seu perfil transcricional e 22% de todo o seu transcriptoma se sobrepunham à expressão encontrada nos pacientes com doença ativa, incluindo a

supressão de *DSGI*. Já a avaliação de pacientes tratados e com doença em remissão mostrou que o perfil transcricional desses pacientes se assemelhava ao perfil de indivíduos saudáveis em 98%. Entretanto, doze genes permaneceram desregulados nessas amostras, entre eles *DSGI*, encontrada suprimida em relação ao epitélio esofágico saudável.

Em outro trabalho utilizando técnicas em larga escala, a expressão de *DSGI* foi encontrada cerca de doze vezes menor nos pacientes com esofagite eosinofílica em comparação aos controles saudáveis. Estes dados foram avaliados por RT-PCRq em uma coorte maior e diferente de pacientes, desta vez, incluindo indivíduos tratados e com doença em remissão em que o tecido está histologicamente idêntico ao tecido saudável. Nessa avaliação, a redução de *DSGI* em pacientes com doença ativa foi ainda maior, cerca de vinte e duas vezes menor em comparação aos controles. Entretanto, quando avaliados os níveis de expressão gênica de *DSGI* nos pacientes tratados e com doença em remissão, estes foram iguais aos níveis encontrados nos controles saudáveis (SHERRILL et al., 2014).

Os dados apresentados aqui sugerem um papel importante de *DSG1* na manutenção da homeostase de epitélios estratificados, incluindo o esôfago. Dessa a forma, a redução de expressão gênica desta caderina demossomal observada em nosso trabalho poderia contribuir para o desenvolvimento de CEE. Além disso, a expressão deste gene parece ser bastante sensível a insultos que o epitélio possa sofrer, sendo a resposta bastante variável. Enquanto uma inflamação crônica induzida pela infiltração de eosinófilos na mucosa esofágica leva à redução da expressão de *DSGI*, a inflamação induzida pelo refluxo ácido leva à sua superexpressão. Uma vez que o carcinoma epidermóide de esôfago é intrinsecamente associado à inflamação, este pode ser um dos mecanismos pelos quais a expressão de *DSGI* é diminuída nesse tipo de tumor.

Além da redução da expressão gênica de *DSGI* em CEE, nosso trabalho também mostrou um aumento significativo dos níveis de metilação da região promotora deste gene, também em comparação ao tecido normal adjacente. Alterações epigenéticas diversas já foram descritas em CEE. Em 2011 nosso grupo realizou o primeiro metiloma neste tipo de câncer, detectando alterações no perfil de metilação de mediadores inflamatórios, como IL-10 e IL-6, e de moléculas envolvidas na adesão e comunicação celular, como a própria hipermetilação da região promotora de *DSGI* no tumor em relação ao tecido normal adjacente, confirmada no presente estudo (LIMA et al., 2011). Em outros trabalhos que

avaliaram o perfil global de metilação em CEE, foram observadas alterações em diversas vias de sinalização celular, tais como: apoptose, metabolismo do carbono, proliferação, entre outros. Entretanto, perfis aberrantes de metilação em genes relacionados a alguma forma de adesão celular foram majoritariamente relatados (CHEN et al., 2015a, 2015b; LI et al., 2014b; SINGH et al., 2015). Dessa forma, alterações epigenéticas poderiam contribuir de maneira significativa para alterações do padrão de expressão de moléculas de adesão em CEE, entretanto, estudos avaliando a relação entre expressão e metilação de *DSG1* não tinham sido realizados até então.

No presente estudo, encontramos uma correlação inversa significativa entre os níveis de metilação da região promotora de *DSG1* e os seus níveis de expressão gênica, indicando, pela primeira vez, que *DSG1* pode ser regulada por esse mecanismo epigenético. Além disso, também observamos uma relação entre a desmetilação da região promotora de *DSG1* induzida pelo agente desmetilante 5-Aza-2'-desoxicidina e o aumento de sua expressão gênica e proteica. Ensaio envolvendo desmetilação do DNA com restauração da expressão gênica não são incomuns, e esta relação já foi encontrada para outras proteínas de adesão. No adenocarcinoma de esôfago, Wang e cols, (2014) detectaram hipermetilação da região promotora da caderina desmossomal Desmocolina 3, acompanhada de menores níveis de sua expressão gênica. Estes níveis foram restaurados pelo tratamento com agente desmetilante. Já em CEE, foi encontrada a restauração da expressão gênica da proteína desmossomal que interage diretamente com as caderinas desmossomais, a Periplaquina (*PPL*) (OTSUBO et al., 2015), e protocaderina 17 (*PCDH17*) (HARUKI et al., 2010). Além disso, para a E-caderina Ling e cols. (2011) e Si e cols. (2001) encontraram resultados similares, também tendo observado aumento de expressão gênica e proteica após a desmetilação do gene.

Em nosso trabalho, também foi observado um padrão de expressão proteica aberrante de *DSG1* em CEE. A diminuição da expressão membranar desta proteína acompanhada, muitas vezes, do aumento da expressão citoplasmática foi marcante. Além disso, foi observada pelas patologistas uma relação entre o padrão de marcação e o grau de diferenciação celular. Até então, a expressão proteica foi o parâmetro mais avaliado na literatura com relação às caderinas desmossomais. Em CEE, já foi observada a relação da menor expressão proteica de *DSG1* com pior prognóstico, menor tempo de sobrevida e

maiores taxas de metástase linfonodal (NAKANO et al., 1998; NAKASHIMA et al., ; NATSUGOE et al., 2002). Além disso, tais trabalhos já sinalizavam a relação do padrão de expressão desta proteína, que transita entre os padrões membranar e citoplasmático, com a heterogeneidade tumoral. A associação entre a perda de marcação das caderinas desmossomais e a perda de diferenciação celular já havia sido observada por Fang e cols. (2014) no CEE para a DSG3, e por Natsugoe e cols. (1994) para DSG1.

Nossos dados não mostraram uma relação significativa entre expressão gênica e expressão proteica de *DSG1* com dados como sobrevida, invasão linfonodal e grau de diferenciação do tumor. Entretanto, em muitos dos casos avaliados, não foi possível ter acesso a tais informações. Sendo assim, o número de indivíduos incluídos em algumas destas análises pode ter muito pequeno para observar tais associações. Por outro lado, indivíduos com maior idade apresentaram menores níveis de metilação. Este dado vai de acordo com o que já foi relatado na literatura, ou seja, uma hipometilação associada ao envelhecimento (SUN; YI, 2015). Além disso, tumores moderadamente diferenciados apresentaram menores níveis de metilação da região promotora de *DSG1* em comparação a tumores pouco diferenciados e esta hipometilação também foi associada a uma maior sobrevida dos pacientes. Estas associações poderiam ser um reflexo do efeito da metilação sobre a expressão gênica de *DSG1*, mas esta não se mostrou alterada de acordo com os parâmetros avaliados. Isto pode indicar que a metilação do DNA contribui para a regulação da expressão de *DSG1*, mas não é o único mecanismo envolvido em CEE. Conforme citado anteriormente, outros fatores, como mediadores inflamatórios, que poderiam também ser regulados por metilação diferencial, são capazes de afetar a expressão desta caderina e podem contribuir para a sua desregulação neste tipo tumoral.

A localização de proteínas de membrana no citoplasma não é exclusividade de DSG1. Na adesão do tipo aderente, por exemplo, β -catenina, que normalmente medeia a interação entre caderinas e os microfilamentos de actina, pode ser translocada do seu sítio membranar. Este fenômeno pode ocorrer por alguns mecanismos: perda de adesão, perda de expressão das suas proteínas parceiras, ou pela saída de Placoglobina dos desmossomos, que compete pelo seu sítio na junção aderente e é capaz de translocá-la. Em condições normais, quando liberada no citoplasma, β -catenina é encaminhada para degradação, porém se a célula estiver sendo estimulada pelo fator Wnt, β -catenina é protegida da degradação e migra para o núcleo, onde inicia uma cascata de transcrição gênica que induz proliferação

celular (CHIDGEY; DAWSON, 2007b; HUBER; PETERSEN, 2015). Assim como já foi relatado para β -catenina, DSG1 também pode estar exercendo outras funções quando presente no citoplasma. Na verdade, já foi mostrado em pele que o domínio citoplasmático de DSG1, quando ancorado à membrana, impede a sinalização mediada por EGFR e induz diferenciação celular (GETSIOS et al., 2009b). Sendo assim, nas camadas basais do epitélio, onde não há expressão membranar de DSG1, a via de sinalização mediada por EGFR está ativa e suprime a diferenciação. Por outro lado, em camadas mais apicais, DSG1 está presente na membrana e bloqueia esta sinalização. Portanto, esta correção com EGFR pode indicar um mecanismo pelo qual a perda de expressão de DSG1 ou sua localização no citoplasma podem levar à perda de diferenciação celular e contribuir para o desenvolvimento de CEE. Entretanto, mais estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

Uma vez que nosso estudo e outros trabalhos já citados aqui mostraram que a camada basal de epitélios humanos, como do próprio esôfago, apresentam expressão citoplasmática de DSG1, podemos dizer que este padrão de expressão é fisiológico. Porém, não está claro que fatores podem contribuir para a localização desta proteína desmossomal em outros sítios que não a membrana. Neste contexto, algumas hipóteses podem ser levantadas, como a clivagem por proteases ou a existência de uma isoforma de *DSG1* gerada por *splicing* alternativo. Porém, em algumas condições patológicas, mutações também parecem contribuir para este fenômeno.

Variantes de *DSG1* já foram associadas ao desenvolvimento de duas doenças, para as quais não há relatos de comprometimento esofágico: o pemphigus foliaceus e o queratoderma palmoplantar. Ambas as doenças acometem a pele e podem ser causadas por mutações de *DSG1*, sendo o pemphigus foliaceus também causado por uma reação autoimune. Foram encontradas variantes polimórficas de *DSG1* associadas ao pemphigus foliaceus em populações da França e Tunísia (AYED et al., 2002; MARTEL et al., 2001), e mutações diferentes associadas ao queratoderma palmoplantar (BARBER et al., 2007; BERGMAN et al., 2010; DUA-AWEREH et al., 2009; HERSHKOVITZ et al., 2009; HUNT et al., 2001). Além disso, mais recentemente, um trabalho identificou uma mutação em *DSG1* associada a uma nova síndrome descrita, caracterizada por dermatite severa, alergias múltiplas e desperdício metabólico. A presença da mutação foi correlacionada ao fenótipo de localização citoplasmática de DSG1 e, neste trabalho, dois dos pacientes

relataram esofagite eosinofílica e refluxo esofágico (SAMUELOV et al., 2013). Porém, um trabalho do nosso grupo utilizando a técnica de RNA-seq não identificou qualquer mutação em *DSG1* em pacientes com CEE (dados não publicados), sugerindo que estas alterações genéticas não sejam responsáveis pelo padrão de expressão proteica aberrante observado em nosso estudo.

Outro mecanismo que poderia contribuir para a saída de DSG1 da membrana para o citoplasma é a clivagem por proteases. A clivagem de proteínas de adesão é um processo fisiológico que ajuda a manter a homeostase tecidual, está envolvido na descamação epitelial e é mediado por proteínas da família Kalikreína (KLK). Isto permite que as células, depois de alcançarem o nível máximo de diferenciação, consigam se desprender do epitélio (CAUBET et al., 2004). Já foi observada uma superexpressão de Kalikreína 5 no carcinoma escamoso oral, causando aumento de clivagem de DSG1, sendo associados a um fenótipo mais agressivo do tumor (JIANG et al., 2011). Entretanto, essa clivagem acontece no domínio extracelular da proteína, responsável pela ligação heterofílica com desmocolina, sugerindo que essa clivagem desestabilize a adesão mediada por desmossomos, mas pode não explicar o fenótipo citoplasmático encontrado em nossos casos.

Finalmente, isoformas de *DSG1*, geradas por *splicing* alternativo, poderiam contribuir para diferentes padrões de expressão da proteína. Em camundongos, este gene possui uma isoforma alfa e uma isoforma beta, com menor homologia na região extracelular (PULKKINEN et al., 2003). Em humanos, Desmocolina 1 tem duas isoformas menores geradas por *splicing* 'a' e 'b', em que a isoforma menor 'b' não consegue se ligar à Placoglobina, o que pode ser um indício de uma fração citoplasmática de DSC1 (TSELEPIS et al., 1998). No contexto de *DSG1*, foi depositada no Human Protein Atlas (UHLEN et al., 2015) uma isoforma menor predita deste gene, sem o peptídeo sinal e sem a região transmembrana, que explicaria nossos achados de expressão citoplasmática de DSG1. No presente estudo, fomos capazes de detectar, por PCR, a presença desta isoforma em amostras de tecido normal adjacente e tumoral de pacientes com CEE. Entretanto, seus níveis de expressão se mostraram baixos e não foi possível avaliar se esta isoforma é predominante em amostras tumorais com predomínio de expressão citoplasmática de DSG1.

Conforme citado anteriormente, alterações do padrão de expressão de moléculas de adesão são eventos comuns ao longo do desenvolvimento tumoral e podem tanto ser indicadores de transformação celular quanto contribuir ativamente para a tumorigênese. Nosso trabalho sugere que, em CEE, a Desmogleína 1 pode ser uma dessas moléculas, uma vez que seus níveis de expressão gênica e proteica, além de seu padrão de metilação, foram encontrados alterados. Além disso, nossos dados sugerem uma complexa regulação da expressão de DSG1 que pode envolver não só mecanismos epigenéticos, mas também mediadores inflamatórios e até mesmo reguladores do processo de *splicing*. Entretanto, mais estudos são agora necessários para compreender se estas alterações são uma causa ou uma consequência da carcinogênese esofágica.

6. CONCLUSÕES

- Nossos dados mostraram uma redução significativa da expressão gênica de *DSG1* em carcinoma epidermóide de esôfago quando comparado ao tecido adjacente não tumoral do mesmo paciente;

- Neste estudo, foi corroborada a hipermetilação da região promotora de *DSG1* em CEE em comparação à mucosa adjacente não tumoral pareada, previamente demonstrada;

- Foi encontrada uma correlação inversa e estatisticamente significativa entre os níveis de metilação da região promotora de *DSG1* e seus níveis de expressão gênica em tecidos de pacientes com CEE;

- O epitélio esofágico não tumoral de pacientes com CEE mostrou um padrão de expressão proteica de *DSG1* característico de epitélios estratificados: expressão citoplasmática na camada basal e expressão predominantemente membranar nas camadas mais diferenciadas do epitélio. Por outro lado, os tumores apresentaram um padrão de expressão alterado, com áreas sem imunomarcação para *DSG1*, áreas com marcação exclusivamente citoplasmática e regiões que mantiveram a expressão membranar, sendo esta geralmente observada em células mais diferenciadas. De uma maneira geral, os tumores apresentaram uma baixa frequência de *DSG1* na membrana acompanhada de uma elevada frequência desta proteína no citoplasma. Foi observada ainda marcação nuclear e perinuclear em casos isolados.

- Não foram observadas diferenças de expressão de *DSG1* de acordo com as características clínico-patológicas dos pacientes com CEE. Entretanto, a metilação da região promotora de *DSG1* foi menor em indivíduos com idade superior à mediana em comparação àqueles com idade inferior, e foi também menor em tumores moderadamente diferenciados quando comparados a tumores pouco diferenciados.

- O nível de metilação da região promotora de *DSG1* no tumor se mostrou um fator de prognóstico independente da idade em CEE. Indivíduos com níveis de metilação acima da mediana apresentaram uma sobrevida média de 6 meses, enquanto indivíduos com níveis abaixo da mediana apresentaram uma sobrevida média de 15,5 meses.

- A desmetilação induzida pelo agente 5-Aza-2'-desoxicitidina levou a um aumento de expressão gênica e proteica desta caderina desmossomal na linhagem celular de CEE OE-21.

- A isoforma predita de *DSG1* foi detectada em carcinoma epidermóide de esôfago e tecido adjacente não tumoral.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar se a isoforma predita de *DSG1*, agora confirmada, é diferencialmente expressa entre o tumor e o tecido adjacente não tumoral de pacientes com CEE;
- Avaliar *in vitro* se a metilação da região promotora de *DSG1* tem impacto sobre a expressão da isoforma menor deste gene;
- Avaliar *in vitro* as consequências da superexpressão e do silenciamento da isoforma menor de *DSG1* em termos de proliferação, viabilidade, migração e invasão celular;
- Avaliar *in vitro* as consequências da superexpressão e do silenciamento da isoforma completa de *DSG1* em termos de proliferação, viabilidade, migração e invasão celular.

8. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Physiology and function of the tight junction. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 2, p. a002584, ago. 2009.

APLIN, J. D.; JONES, C. J. P.; HARRIS, L. K. Adhesion molecules in human trophoblast - a review. I. Villous trophoblast. **Placenta**, v. 30, n. 4, p. 293–8, abr. 2009.

AYED, M. B. et al. Tunisian endemic pemphigus foliaceus is associated with desmoglein 1 gene polymorphism. **Genes and immunity**, v. 3, n. 6, p. 378–9, set. 2002.

BABA, Y.; WATANABE, M.; BABA, H. Review of the alterations in DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma. **Surgery today**, v. 43, n. 12, p. 1355–64, dez. 2013.

BARBER, A. G. et al. Striate palmoplantar keratoderma resulting from a frameshift mutation in the desmoglein 1 gene. **Journal of dermatological science**, v. 45, n. 3, p. 161–6, mar. 2007.

BAZZI, H. et al. Desmoglein 4 is Regulated by Transcription Factors Implicated in Hair Shaft Differentiation. **Differentiation**, v. 78, n. 5, p. 292–300, 2009.

BERGMAN, R. et al. Disadhesion of epidermal keratinocytes: a histologic clue to palmoplantar keratodermas caused by DSG1 mutations. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, n. 1, p. 107–13, jan. 2010.

BERX, G.; VAN ROY, F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a003129–a003129, 23 set. 2009.

BLANCHARD, C. et al. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 120, n. 6, p. 1292–300, dez. 2007.

BROOKE, M. A.; NITOIU, D.; KELSELL, D. P. Cell-cell connectivity: desmosomes and

disease. **The Journal of pathology**, v. 226, n. 2, p. 158–71, jan. 2012.

Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_52/v02/pdf/revisao3.pdf>. Acesso em: 27 fev. 2016.

CARNEIRO, P. et al. E-cadherin dysfunction in gastric cancer--cellular consequences, clinical applications and open questions. **FEBS letters**, v. 586, n. 18, p. 2981–9, 31 ago. 2012.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. **International journal of cancer Journal international du cancer**, v. 82, n. 5, p. 657–664, 1999.

CASTELLSAGUÉ, X. et al. Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. **International journal of cancer Journal international du cancer**, v. 88, n. 4, p. 658–664, 2000.

CAUBET, C. et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. **The Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 5, p. 1235–44, maio 2004.

CHEN, C. et al. Genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, 14 dez. 2015a.

CHEN, L. Q. et al. Early detection of esophageal squamous cell carcinoma and its effects on therapy: an overview. **Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E**, v. 12, n. 3, p. 161–7, jan. 1999.

CHEN, Y. et al. Screening aberrant methylation profile in esophageal squamous cell carcinoma for Kazakhs in Xinjiang area of China. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 2, p. 457–64, fev. 2015b.

CHIDGEY, M.; DAWSON, C. Desmosomes: a role in cancer? **British journal of cancer**, v. 96, n. 12, p. 1783–7, 18 jun. 2007a.

CHIDGEY, M.; DAWSON, C. Desmosomes: a role in cancer? **British journal of cancer**,

v. 96, n. 12, p. 1783–7, 18 jun. 2007b.

CHITAEV, N. A. et al. The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential. **The Journal of cell biology**, v. 133, n. 2, p. 359–69, abr. 1996.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5483–95, 12 ago. 2002.

CIRILLO, N. 150th anniversary series: desmosomes in physiology and disease. **Cell communication & adhesion**, v. 21, n. 2, p. 85–8, abr. 2014.

COHEN, D. J.; AJANI, J. An expert opinion on esophageal cancer therapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 12, n. 2, p. 225–39, fev. 2011.

COOPER, G. M.; PETERS, G. **Oncogenes**. 2. ed. [s.l.] [Amsterdam]: Published for the International Union of Biochemistry, 1995.

CUI, T. et al. Diagnostic and prognostic impact of desmocollins in human lung cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 65, n. 12, p. 1100–6, dez. 2012.

DA COSTA, N. M. et al. The potential of molecular markers to improve interventions through the natural history of oesophageal squamous cell carcinoma. **Bioscience reports**, v. 33, n. 4, jan. 2013.

DONETTI, E. et al. Desmocollin 1 and desmoglein 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa: a comparative immunohistochemical and molecular study. **Archives of dermatological research**, v. 297, n. 1, p. 31–8, jul. 2005.

DUA-AWEREH, M. B. et al. Mutations in the desmoglein 1 gene in five Pakistani families with striate palmoplantar keratoderma. **Journal of dermatological science**, v. 53, n. 3, p. 192–7, mar. 2009.

EGGER, G. et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457–463, 27 maio 2004.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148–59, 13 mar. 2008.

FALK, G. W. Risk factors for esophageal cancer development. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 18, n. 3, p. 469–85, jul. 2009.

FANG, W.-K. et al. Altered expression and localization of desmoglein 3 in esophageal squamous cell carcinoma. **Acta histochemica**, v. 116, n. 5, p. 803–9, jun. 2014.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–86, 13 set. 2012.

FORREST, A. **Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds. Cambridge Monographs on Cancer Research**BMJ Group, , 1 jan. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC501130/>>. Acesso em: 27 fev. 2016

GARROD, D.; CHIDGEY, M. Desmosome structure, composition and function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 572–587, mar. 2008.

GETSIOS, S. et al. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. **The Journal of cell biology**, v. 185, n. 7, p. 1243–58, 29 jun. 2009a.

GETSIOS, S. et al. Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. **The Journal of cell biology**, v. 185, n. 7, p. 1243–58, 29 jun. 2009b.

GETSIOS, S.; HUEN, A. C.; GREEN, K. J. Working out the strength and flexibility of desmosomes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 4, p. 271–81, abr. 2004.

GONZAGA, I. M. et al. Alterations in epidermal growth factor receptors 1 and 2 in esophageal squamous cell carcinomas. **BMC cancer**, v. 12, p. 569, 2012.

GREEN, K. J. et al. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 2, p. a000125, fev. 2010.

GREEN, K. J.; SIMPSON, C. L. Desmosomes: New perspectives on a Classic. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 2499 – 2515, 2007.

HAMMERS, C. M.; STANLEY, J. R. Desmoglein-1, differentiation, and disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 4, p. 1419–22, 1 abr. 2013.

HARTSOCK, A.; NELSON, W. J. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1778, n. 3, p. 660–9, mar. 2008.

HARUKI, S. et al. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 6, p. 1027–36, jun. 2010.

HATZFELD, M.; WOLF, A.; KEIL, R. Plakophilins in desmosomal adhesion and signaling. **Cell communication & adhesion**, v. 21, n. 1, p. 25–42, fev. 2014.

HÉCTOR PEINADO, FRANCISCO PORTILLO, A. C. **Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis**. Disponível em: <<http://www.ijdb.ehu.es/web/paper.php?doi=10.1387/ijdb.041794hp>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

HEIKINHEIMO, K. et al. Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. **Journal of dental research**, v. 94, n. 1, p. 101–11, 1 jan. 2015.

HERSHKOVITZ, D. et al. Novel mutations in DSG1 causing striate palmoplantar keratoderma. **Clinical and experimental dermatology**, v. 34, n. 2, p. 224–8, mar. 2009.

HERVÉ, J.-C.; DERANGEON, M. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. **Cell and tissue research**, v. 352, n. 1, p. 21–31, abr. 2013.

HOLOCH, D.; MOAZED, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression.

Nature reviews. Genetics, v. 16, 2 jan. 2015.

HONGO, M.; NAGASAKI, Y.; SHOJI, T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 24, n. 5, p. 729–35, maio 2009.

HUBER, O.; PETERSEN, I. 150th Anniversary Series: Desmosomes and the Hallmarks of Cancer. **Cell communication & adhesion**, v. 22, n. 1, p. 15–28, jan. 2015.

HUMPHRIES, B.; WANG, Z.; YANG, C. The role of microRNAs in metal carcinogen-induced cell malignant transformation and tumorigenesis. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, 18 fev. 2016.

HUNT, D. M. et al. Spectrum of dominant mutations in the desmosomal cadherin desmoglein 1, causing the skin disease striate palmoplantar keratoderma. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 9, n. 3, p. 197–203, mar. 2001.

IARC. **IARC Monographs- Monographs available in PDF format**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol83/>>. Acesso em: 27 fev. 2016.

ISHII, K. et al. Isolation of Pathogenic Monoclonal Anti-Desmoglein 1 Human Antibodies by Phage Display of Pemphigus Foliaceus Autoantibodies. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, p. 939–948, 2008.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JIANG, R. et al. Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 11, p. 9127–35, 18 mar. 2011.

JOHNSON, J. L.; NAJOR, N. A.; GREEN, K. J. Desmosomes: regulators of cellular signaling and adhesion in epidermal health and disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 11, p. a015297, nov. 2014.

JOHNSTONE, R. W. HISTONE-DEACETYLASE INHIBITORS: NOVEL DRUGS FOR THE TREATMENT OF CANCER. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 4, p. 287–299, abr. 2002.

KIM, S. A. et al. Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis. **British journal of cancer**, v. 114, n. 2, p. 199–206, 19 jan. 2016.

KISHINO, T. et al. Integrated analysis of DNA methylation and mutations in esophageal squamous cell carcinoma. **Molecular carcinogenesis**, 12 jan. 2016.

KITAJIMA, Y. 150(th) anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus. **Cell communication & adhesion**, v. 21, n. 6, p. 269–80, dez. 2014.

KOMATSU, M.; SASAKI, H. DNA methylation is a key factor in understanding differentiation phenotype in esophageal squamous cell carcinoma. **Epigenomics**, v. 6, n. 6, p. 567–9, jan. 2014.

KOTTKE, M. D.; DELVA, E.; KOWALCZYK, A. P. The desmosome: cell science lessons from human diseases. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 5, p. 797–806, 1 mar. 2006.

KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA methylation and cancer. **Advances in genetics**, v. 70, p. 27–56, jan. 2010.

LAYKE, J. C.; LOPEZ, P. P. Esophageal cancer: a review and update. **American family physician**, v. 73, n. 12, p. 2187–94, 15 jun. 2006.

LEHRBACH, D. M.; NITA, M. E.; CECCONELLO, I. Molecular aspects of esophageal squamous cell carcinoma carcinogenesis. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 40, n. 4, p. 256–261, dez. 2003.

LI, J. Alterations in cell adhesion proteins and cardiomyopathy. **World journal of cardiology**, v. 6, n. 5, p. 304–13, 26 maio 2014.

LI, X. et al. Identification of a DNA methylome profile of esophageal squamous cell

carcinoma and potential plasma epigenetic biomarkers for early diagnosis. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103162, jan. 2014a.

LI, X. et al. Identification of a DNA methylome profile of esophageal squamous cell carcinoma and potential plasma epigenetic biomarkers for early diagnosis. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103162, jan. 2014b.

LIMA, S. C. S. et al. Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. **Epigenetics official journal of the DNA Methylation Society**, v. 6, n. 10, p. 1217–1227, 2011.

LING, Z.-Q. et al. Hypermethylation-modulated down-regulation of CDH1 expression contributes to the progression of esophageal cancer. **International journal of molecular medicine**, v. 27, n. 5, p. 625–35, maio 2011.

MARTEL, P. et al. A polymorphic variant of the gene coding desmoglein 1, the target autoantigen of pemphigus foliaceus, is associated with the disease. **Genes and immunity**, v. 2, n. 1, p. 41–3, fev. 2001.

MCLARTY, A. J. et al. Esophageal resection for cancer of the esophagus: long-term function and quality of life. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 63, n. 6, p. 1568–72, 1997.

MENG, W.; TAKEICHI, M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, p. a002899, dez. 2009.

MÜLLER, M. et al. Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 22, p. 10952–62, 15 dez. 2015.

NAKANO, S. et al. Detection of lymph node metastasis using desmoglein 1 expression in superficial esophageal cancer in relation to the endoscopic mucosal resection. **Diseases of the esophagus: official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E**, v. 11, n. 3, p. 157–61, jul. 1998.

NAKASHIMA, S. et al. Biological properties of biopsy specimens are useful for predicting

lymph node micrometastasis in esophageal carcinoma. **Anticancer research**, v. 22, n. 5, p. 2951–6, jan. .

NATSUGOE, S. et al. Expression of desmoglein I in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Journal of surgical oncology**, v. 57, n. 2, p. 105–10, out. 1994.

NATSUGOE, S. et al. Biologic and imaging diagnosis of lymph node metastasis in esophageal carcinoma. **Journal of surgical oncology**, v. 81, n. 1, p. 25–32, set. 2002.

NIKLAS, K. J. The evolutionary-developmental origins of multicellularity. **American journal of botany**, v. 101, n. 1, p. 6–25, 1 jan. 2014.

NIWA, Y. et al. Epithelial to mesenchymal transition correlates with tumor budding and predicts prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of surgical oncology**, v. 110, n. 6, p. 764–9, nov. 2014.

OHASHI, S. et al. Recent Advances From Basic and Clinical Studies of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 149, n. 7, p. 1700–15, dez. 2015.

OTSUBO, T. et al. Aberrant DNA hypermethylation reduces the expression of the desmosome-related molecule periplakin in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer medicine**, v. 4, n. 3, p. 415–25, mar. 2015.

PALII, S. S. et al. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 2, p. 752–71, jan. 2008.

PARKIN, D. M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74–108, 2005.

PASTORE, F.; LEVINE, R. L. Epigenetic regulators and their impact on therapy in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 3, p. 269–78, 1 mar. 2016.

PAYNE, A. S. et al. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 5, p. 536–43, out. 2004.

PEĆINA-SLAUS, N. Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. **Cancer cell international**, v. 3, n. 1, p. 17, 14 out. 2003.

PULKKINEN, L. et al. Novel member of the mouse desmoglein gene family: Dsg1-beta. **Experimental Dermatology**, v. 12, n. 1, p. 11–19, fev. 2003.

RIBEIRO PINTO, L. F. et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians. **Mutation Research**, v. 544, n. 2-3, p. 365–373, 2003.

SAMUELOV, L. et al. Desmoglein 1 deficiency results in severe dermatitis, multiple allergies and metabolic wasting. **Nature genetics**, v. 45, n. 10, p. 1244–8, out. 2013.

SCHOCK, F.; PERRIMON, N. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 18, p. 463–93, 2002.

SEPEHR, A. et al. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. **Oncogene**, v. 20, n. 50, p. 7368–74, 1 nov. 2001.

SHERRILL, J. D. et al. Desmoglein-1 regulates esophageal epithelial barrier function and immune responses in eosinophilic esophagitis. **Mucosal immunology**, v. 7, n. 3, p. 718–29, maio 2014.

SI, H. X. et al. E-cadherin expression is commonly downregulated by CpG island hypermethylation in esophageal carcinoma cells. **Cancer letters**, v. 173, n. 1, p. 71–8, 8 nov. 2001.

SINGH, V. et al. Esophageal Cancer Epigenomics and Integrome Analysis of Genome-Wide Methylation and Expression in High Risk Northeast Indian Population. **Omics : a journal of integrative biology**, v. 19, n. 11, p. 688–99, nov. 2015.

SOLÍS, M.-T. et al. 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 472, jan. 2015.

SPECHLER, S. J. et al. Prevalence of metaplasia at the gastro-oesophageal junction. **Lancet (London, England)**, v. 344, n. 8936, p. 1533–6, 3 dez. 1994.

STANLEY, J. R. et al. A monoclonal antibody to the desmosomal glycoprotein desmoglein I binds the same polypeptide as human autoantibodies in pemphigus foliaceus. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 4, p. 1227–30, 15 fev. 1986.

SUN, D.; YI, S. V. Impacts of Chromatin States and Long-Range Genomic Segments on Aging and DNA Methylation. **PLoS one**, v. 10, n. 6, p. e0128517, jan. 2015.

THOMAS, R. M.; SOBIN, L. H. Gastrointestinal cancer. **Cancer**, v. 75, n. 1 Suppl, p. 154–70, 1 jan. 1995.

TOH, Y. et al. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. **International journal of clinical oncology**, v. 15, n. 2, p. 135–44, abr. 2010.

TSELEPIS, C. et al. Desmosomal adhesion inhibits invasive behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 8064–9, 7 jul. 1998.

TUYNS, A. J. Epidemiology of alcohol and cancer. **Cancer research**, v. 39, n. 7 Pt 2, p. 2840–3, jul. 1979.

UHLEN, M. et al. Tissue-based map of the human proteome. **Science**, v. 347, n. 6220, p. 1260419–1260419, 22 jan. 2015.

VAISSIÈRE, T. et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. **Cancer research**, v. 69, n. 1, p. 243–52, 1 jan. 2009.

VALLASTER, M.; VALLASTER, C. D.; WU, S. M. Epigenetic mechanisms in cardiac development and disease. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v. 44, n. 1, p. 92–102, jan. 2012.

WANG, Q. et al. Regulation of Desmocollin3 Expression by Promoter Hypermethylation is Associated with Advanced Esophageal Adenocarcinomas. **Journal of Cancer**, v. 5, n. 6, p. 457–64, jan. 2014.

WEX, T. et al. Gastro-oesophageal reflux disease is associated with up-regulation of desmosomal components in oesophageal mucosa. **Histopathology**, v. 60, n. 3, p. 405–15, fev. 2012a.

WEX, T. et al. Assessment of desmosomal components (desmoglein 1-3, plakoglobin) in cardia mucosa in relation to gastroesophageal reflux disease and *Helicobacter pylori* infection. **Human pathology**, v. 43, n. 10, p. 1745–54, out. 2012b.

WU, D.-L. et al. Methylation in esophageal carcinogenesis. **World journal of gastroenterology**, v. 12, n. 43, p. 6933–40, 21 nov. 2006.

ZHANG, W. et al. Epidermal growth factor receptor is a prognosis predictor in patients with esophageal squamous cell carcinoma. **The Annals of thoracic surgery**, v. 98, n. 2, p. 513–9, ago. 2014.

9. ANEXOS

Anexo 1: Carta de aprovação do projeto sob o número 116/11 pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA



Memo 440/11-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 5 de dezembro de 2011.

A(o): Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 116/11 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
CAAE – 0086.0.007.000-11
Título do Estudo – Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA **aprovou** após reanálise o estudo intitulado: **Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina versão 2**, bem como seu TCLE para estudo prospectivo CECP versão 3 e TCLE para estudo retrospectivo CECP e CEE versão 3, em 30 de novembro de 2011.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Atenciosamente,


Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dr. Luiz Augusto Maltoni – Direção Geral

Anexo 2: Termo de consentimento informado (INCA).



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO 1

Projeto de Pesquisa “Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapêutica de Rotina” (CEE)

Nome do Voluntário: _____

Você é um paciente matriculado no INCA com diagnóstico confirmado de câncer de esôfago e, em breve, será submetido a um tratamento que poderá ser cirúrgico ou não (Quimioterapia/Radioterapia). Para seu estudo e planejamento terapêutico será necessária a realização de uma Endoscopia Digestiva Alta (exame para avaliar características do seu tumor como tamanho, localização, etc.). Por isso está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa que envolve a coleta de uma biópsia do seu tecido tumoral, de tecido normal próximo ao tumor (quando possível) e uma amostra do seu sangue. Esta biópsia poderá ser realizada no momento em que for feita sua EDA e/ou no momento da cirurgia (caso seja indicado o tratamento cirúrgico). Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO DO PROJETO DE PESQUISA

Este projeto de pesquisa é um esforço conjunto entre pesquisadores para utilizar os recentes avanços na medicina na tentativa de diagnosticar precocemente casos de câncer de esôfago que surgem como segundos tumores primários (um segundo tumor que ocorre em alguns pacientes que já tiveram câncer de cabeça e pescoço). Tanto os tumores de esôfago quanto os de cabeça e pescoço são muito comuns em nosso país e frequentemente causam a morte desses indivíduos. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto de pesquisa, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVOS DO PROJETO DE PESQUISA

Os objetivos deste projeto são a comparação das alterações moleculares entre câncer de cabeça e pescoço e câncer de esôfago buscando descobrir marcadores moleculares com maior eficiência para o diagnóstico precoce do câncer de esôfago ou identificar os indivíduos que possuem um alto risco de desenvolver um segundo tumor.

PROCEDIMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Se concordar em participar deste projeto será necessário coletar amostras do tumor, e quando possível, do tecido normal próximo à lesão. Esta coleta poderá ser realizada na endoscopia digestiva alta e/ou durante o procedimento cirúrgico. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico e não irá interferir no tratamento. Além disto, será coletada uma pequena amostra de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa, para futuras pesquisas. Para realizar a endoscopia, todo paciente precisa que seja puncionada uma veia do braço com uma agulha para a aplicação de soro e medicamentos. Nesse momento aproveitaremos a punção para a coleta do sangue.

Ao concordar em participar deste projeto, os pesquisadores participantes consultarão seus registros do prontuário e poderão utilizar para pesquisas parte do material coletado que foi armazenado.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Caso você não deseje participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento, e nenhuma amostra será utilizada nem os seus registros médicos serão consultados.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste projeto de pesquisa. Não haverá risco adicional para a obtenção de amostras para o presente projeto.

BENEFÍCIOS

Não haverá benefícios imediatos a você, porém a sua participação nesse projeto de pesquisa poderá contribuir para o entendimento de casos como o seu no futuro. Este projeto poderá, no entanto, resultar em benefícios para outros pacientes que terão o diagnóstico de câncer de esôfago e que irão fazer o tratamento.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Durante o projeto você terá o acompanhamento normal junto ao seu médico do INCA que é responsável pela sua assistência. Além disso, a Dr^a Izabela Costa da Cirurgia de Cabeça e Pescoço (tel: 3207-6782), o Dr. Eduardo Pinto, da cirurgia abdominopélvica (tel: 3207-1161) e o pesquisador responsável pelo projeto, Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto (tel: 3207-6560), estarão disponíveis para esclarecer eventuais dúvidas.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e equipe de pesquisadores envolvidos. As amostras de tecido serão processadas de tal forma que sua privacidade e identidade sejam preservadas. Seu nome não será revelado ainda que as informações de seu registro médico

sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Caso haja a necessidade de atendimento médico, durante ou após este projeto, este ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste projeto de pesquisa.

CUSTOS

Se você concordar com o uso das amostras biológicas conforme escrito acima, é necessário esclarecer que você não terá qualquer custo ou forma de pagamento pela participação no projeto de pesquisa. A participação no projeto é voluntária e você não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a sua participação. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independente de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto de pesquisa é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de desistência, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento durante o andamento desse projeto de pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto no telefone (21) 3207-6560. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante desse projeto de pesquisa, também pode contar com uma

terceira pessoa imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, Rua André Cavalcanti 37, telefone (21) 3207-6551. Email: CEP@inca.gov.br



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer

Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT #### – Aprovado __/__/2011

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste projeto de pesquisa assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste projeto de pesquisa e:

- () Expresso que desejo ser reconvocato a oferecer um novo consentimento para cada projeto que venha a utilizar agora, ou no futuro, material biológico coletado pelo presente projeto de pesquisa, indicando as pessoas abaixo relacionadas como representantes em caso de incapacidade minha para prover tal consentimento:

_____ (NOME EM LETRA
FORMA)

_____ (GRAU DE PARENTESCO)

_____ (TELEFONE)

_____ (NOME EM LETRA
FORMA)

_____ (GRAU DE PARENTESCO)

_____ (TELEFONE)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer

Comitê de Ética em Pesquisa-INCA
PROT #### – Aprovado __/__/2011

() Não gostaria de ser reconvocato a oferecer um novo consentimento para cada projeto de pesquisa que venha a utilizar agora, ou no futuro, material biológico coletado pelo presente projeto de pesquisa.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste projeto.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____ / ____ / ____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Anexo 3: Prontuários – INCA.

REANÁLISE DE PRONTUÁRIOS – Câncer de Esôfago – INCA

CEE

ADE

Preenchedor: _____ Data: ____/____/____ Matrícula do Pcte: _____

Nome: _____		Data Matrícula: ____/____/____		Gênero: Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/>	
Nacionalidade: Brasil <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/>		Naturalidade (UF): _____		Residência: Cidade: _____ UF: _____	
Cor da pele: Branca <input type="checkbox"/> Não-branca <input type="checkbox"/>		Data Nascimento: ____/____/____		Idade: _____ Profissão: _____	
Escolaridade: Analfabeto <input type="checkbox"/> 1º Grau Incompleto <input type="checkbox"/> 1º Grau Completo <input type="checkbox"/> 2º Grau Incompleto <input type="checkbox"/> 2º Grau Completo <input type="checkbox"/> Superior Incompleto <input type="checkbox"/> Superior Completo <input type="checkbox"/> Pós-Graduação <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>					
Estado Civil: Casado <input type="checkbox"/> União Estável <input type="checkbox"/> Divorciado <input type="checkbox"/> Solteiro <input type="checkbox"/>		Hist Familiar de Câncer de Esôfago: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>			

HÁBITOS DO PACIENTE					
Tabagismo: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Ex <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>			Refluxo: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>		
Etilismo: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Ex <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>			Barret: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>		
Status Nutricional: Desnutrição Grave <input type="checkbox"/> Desnutrição Moderada <input type="checkbox"/> Desnutrição Leve <input type="checkbox"/> Eutrófico <input type="checkbox"/> Sobrepeso <input type="checkbox"/> Obeso <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>					

INFORMAÇÕES SOBRE A DOENÇA					
Data do Diagnóstico (Laudo DIPAT): ____/____/____			Esôfago é STP: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>		CID PTP: _____
Tto do PTP: Nenhum <input type="checkbox"/> Cirurgia <input type="checkbox"/> Rxt <input type="checkbox"/> QT <input type="checkbox"/> Rxt+QT <input type="checkbox"/> Rxt+BQT <input type="checkbox"/> Rxt+QT+BQT <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Outro: _____					
Localização: C15.0 Esôfago Cervica; <input type="checkbox"/> C15.1 Esôfago Torácico <input type="checkbox"/> C15.2 Esôfago Abdominal <input type="checkbox"/> C15.3 Esôfago Torácico 1/3 Sup <input type="checkbox"/> C15.4 Esôfago Torácico 1/3 Med <input type="checkbox"/> C15.5 Esôfago Torácico 1/3 Inf <input type="checkbox"/> C15.8 Lesão Invasiva <input type="checkbox"/> C15.9 Não especificado <input type="checkbox"/>					
Grau de Diferenciação: I (Bem dif) <input type="checkbox"/> II (Mod dif) <input type="checkbox"/> III (Pouco dif) <input type="checkbox"/>			Uso de Sonda NasoEntérica: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Informa <input type="checkbox"/>		
TNM (Abdome): cT: 1a <input type="checkbox"/> 1b <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4a <input type="checkbox"/> 4b <input type="checkbox"/> is <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> cN: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> cM: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/>					
Estadiamento (Abdome): IA <input type="checkbox"/> IB <input type="checkbox"/> IIA <input type="checkbox"/> IIB <input type="checkbox"/> IIIA <input type="checkbox"/> IIIB <input type="checkbox"/> IIIC <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/>					

TRATAMENTO					
Tto Inicial: Nenhum <input type="checkbox"/> Cirurgia <input type="checkbox"/> Rxt <input type="checkbox"/> Rxt+QT <input type="checkbox"/> Rxt+BQT <input type="checkbox"/> Rxt+QT+BQT <input type="checkbox"/> Suporte <input type="checkbox"/>					
Local Tto inicial: For a do INCA <input type="checkbox"/> No INCA <input type="checkbox"/> Início Tto inicial: ____/____/____ Fim do Tto inicial: ____/____/____					
Doença Residual após Tto inicial: Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>					
Tto Adjuvante: Nenhum <input type="checkbox"/> Radioterapia <input type="checkbox"/> Rxt+QT <input type="checkbox"/> Tto Resgate: Cirurgia <input type="checkbox"/> Suporte <input type="checkbox"/> Nenhum <input type="checkbox"/> Tto Resgate: ____/____/____					

RXT: Curativa <input type="checkbox"/> Neoadjuvante <input type="checkbox"/> Paliativa <input type="checkbox"/>	Completou? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>
QT: Curativa <input type="checkbox"/> Neoadjuvante <input type="checkbox"/> Paliativa <input type="checkbox"/>	Completou? Não <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/>

INFORMAÇÕES SOBRE CIRURGIA (ESOFAGECTOMIA)										
Cirurgia:	VLP <input type="checkbox"/>	Transhiatal <input type="checkbox"/>	Transtorácica <input type="checkbox"/>	Linfadenectomia:	2 Campos <input type="checkbox"/>	3 Campos <input type="checkbox"/>	Não Realizada <input type="checkbox"/>	Não Informa <input type="checkbox"/>		
Reconstrução Trato Alimentar:	Cólon Direito <input type="checkbox"/>		Cólon Esquerdo <input type="checkbox"/>		Cólon Transverso <input type="checkbox"/>		Estômago <input type="checkbox"/>			
Margens Livres:	Não <input type="checkbox"/>	Sím <input type="checkbox"/>	Sím, após ampliação <input type="checkbox"/>		Não avaliado <input type="checkbox"/>					
TNM (Abdome):	cT:	1a <input type="checkbox"/>	1b <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4a <input type="checkbox"/>	4b <input type="checkbox"/>	is <input type="checkbox"/>	X <input type="checkbox"/>	
	cN:	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	X <input type="checkbox"/>	cM:	0 <input type="checkbox"/>	1 <input type="checkbox"/>	X <input type="checkbox"/>
Estadiamento (Abdome):	IA <input type="checkbox"/>	IB <input type="checkbox"/>	IIA <input type="checkbox"/>	IIB <input type="checkbox"/>	IIIA <input type="checkbox"/>	IIIB <input type="checkbox"/>	IIIC <input type="checkbox"/>	IV <input type="checkbox"/>		

ACOMPANHAMENTO										
Remissão Completa:	Não <input type="checkbox"/>	Sím <input type="checkbox"/>	Recidiva Presente:	Não <input type="checkbox"/>	Sím <input type="checkbox"/>	Data Recidiva:	____/____/____			
Local Recidiva:	Local <input type="checkbox"/>	LNFD <input type="checkbox"/>	Distância <input type="checkbox"/>	Última Consulta:	____/____/____		C/ Evid. de doença <input type="checkbox"/>	S/ Evid. de doença <input type="checkbox"/>		
Data HCIV:	____/____/____		Data Óbito:	____/____/____		Causa Óbito: _____				
Apresentou STP:	Não <input type="checkbox"/>	Sím <input type="checkbox"/>	Deteção STP:	____/____/____		Sincrônico:	Não <input type="checkbox"/>	Sím <input type="checkbox"/>	CID STP: _____	
Metástase a distância:	Não <input type="checkbox"/>	Sím <input type="checkbox"/>	Sítio de Metástase: _____							