



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

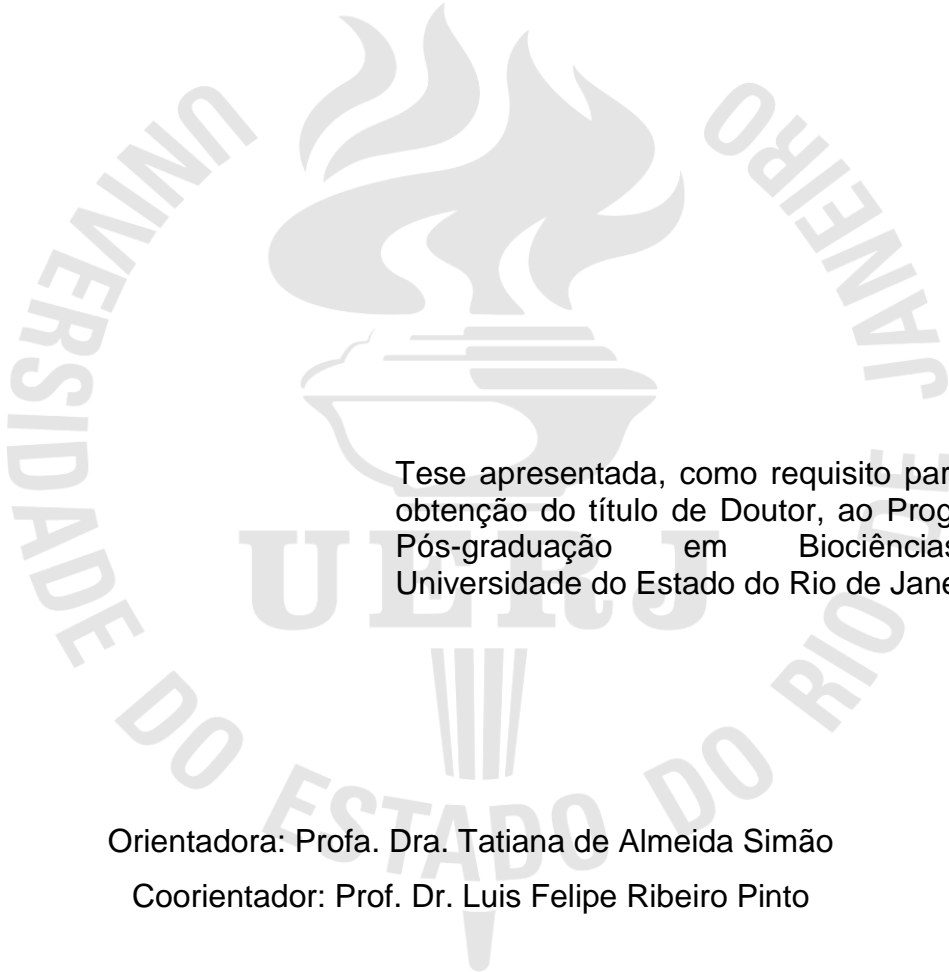
Lilian Brewer Lisboa

**Avaliação de mecanismos de regulação de *SPRR3* em carcinoma  
epidermoide de esôfago**

Rio de Janeiro  
2018

Lilian Brewer Lisboa

**Avaliação de mecanismos de regulação de *SPRR3* em carcinoma epidermoide  
de esôfago**



Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor, ao Programa de  
Pós-graduação em Biociências, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana de Almeida Simão

Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

L769 Lisboa, Lilian Brewer.

Avaliação de mecanismos de regulação de SPRR3 em carcinoma epidermoide de esôfago / Lilian Brewer Lisboa. – 2018.

142 f.

Orientadora: Tatiana de Almeida Simão.

Coorientador: Luís Felipe Ribeiro Pinto.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Carcinoma de células escamosas - Teses. 2. Esôfago – Câncer - Teses. 3. Metilação de DNA. 4. Decitabina. 5. MicroRNAs. I. Simão, Tatiana de Almeida. II. Pinto, Luis Felipe Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.329-006.6

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Lilian Brewer Lisboa

**Avaliação de mecanismos de regulação de *SPRR3* em carcinoma epidermoide de esôfago**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de abril de 2018.

Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto  
Instituto Nacional de Câncer

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Tatiana de Almeida Simão (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. André Luiz Mencialha  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Dra. Nathalia de Oliveira Meireles da Costa  
Instituto Nacional de Cancer

---

Prof. Dr. Luiz Eurico Nasciutti  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2018

Dedico este trabalho à minha amada família.

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo, agradeço à Deus por ter me amparado e por ter renovado minha forças ao longo de toda minha vida. Obrigada por me permitir vivenciar a experiência de realizar um doutorado e por não me abandonar nos momentos difíceis!!

À professora Tatiana Simão, pela confiança e apoio ao longo desses anos. Agradeço a oportunidade de poder trabalhar ao seu lado e ser sua orientanda. Obrigada pela sua dedicação, pelo constante aprendizado e por estar sempre aberta às discussões. Obrigada pela amizade conquistada, por dividir comigo momentos de alegrias e tristezas. Tudo isso contribuiu para que eu me tornasse uma pessoa melhor!

Ao professor Luis Felipe, obrigada por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pelo aprendizado ao longo dos anos. O convívio e as experiências vividas ao longo dos últimos anos me impulsionaram a me tornar uma pessoa mais crítica, assim como também contribuíram (e continuam contribuindo grandemente) para meu crescimento profissional e pessoal;

À Dra. Sheila Coelho pelo apoio, incentivo e amizade ao longo desses anos. Obrigada pela importante ajuda na realização deste projeto, pelas discussões científicas que me estimulavam a querer explorar mais e mais, e por todo aprendizado.

À professora Ana Rossini, que também me acolheu no laboratório e esteve sempre disposta a me ajudar com as reações de PCR. Obrigada por também confiar em mim e pela amizade conquistada!

À professora Susan Gibbs por me permitir realizar meu doutorado sanduíche (PDSE) em seu grupo de pesquisa (DermaLab). Esta experiência significou muito para meu crescimento profissional e pessoal;

Aos integrantes da banca examinadora que aceitaram prontamente em colaborar e enriquecer este trabalho;

Ao Professor André Mencialha por ser revisor deste manuscrito e por toda ajuda ao longo destes anos;

Aos meus amigos do laboratório LTBM por tornarem esses anos muito mais agradáveis, especialmente para Orlando (embora voce tenha sido motivo de terapia por muito tempo, você melhora os meus dias!), Marcele, Patrícia, Jennifer, Pedro e Francis (obrigada pela ajuda e também, pela glicose). Sou feliz com vocês! Muito obrigada pelas risadas, pelos cafés (Orlando, seu café é excelente), por confia em mim e por me deixarem colaborar para o crescimento profissional de voc Somos uma família “do lixão”! Em especial, agradeço à Patrícia por sempre ajudar prontamente em diversas situações, incluindo nossas queridas PCRs e géis de agarose!!

Ao Dr. Pedro Nicolau, por todas as vezes que você me apoiou e me incentivou! Obrigada pelas conversas científicas, e as não científicas! Agradeço por me ceder seu ombro e me aturar chorando, mesmo ficando sem paciência!

À todos os colegas do PCM pela convivência, aprendizado e ajuda ao longo destes anos, em especial Dra.Nathalia Meireles e Diego Camuzi.

À Marina Nicolau pelo apoio e estímulo em todos os momentos. Agradeço por estar ao meu lado e me encorajar à correr atrás do meu sonho, dedico meu PDSE também à você!!

À Isabela Gonzaga pela ajuda nos experimentos, pelas discussões científicas e por me estimular no momento em que mais precisei ao longo de todos esses anos! Aquela conversa será lembrada daqui a vinte anos!!

Ao Dr. Paulo Thiago pela ajuda ao longo destes anos. Obrigada também pela sinceridade, por vezes excessiva e sarcástica, mas que será lembrada com muito carinho;

À Flávia Carvalho pela ajuda e paciência com as análises estatísticas, assim como pela nossa amizade que vem desde antes do PCM;

À Dra. Mariana Severo pelo auxílio com as análises de miRNA.

À Fernanda, Andréia pelos anos de amizade, companheirismo e apoio. Vocês foram importantíssimas ao longo desses anos;

À Monique, Amada Naja, obrigada pela sincera amizade e ajuda com as reações de pirosequenciamento. Nossas discussões sobre a vida me tornou uma pessoa melhor!

À Luiza Aguirre, pela ajuda com as imagens de patologia e pela amizade conquistada;

À Marcele Rozeno e Priscilla Valverde, DIPAT, pela disponibilidade em me ajudar com as imunos;

À Mayra Carneiro, filha, pela grande amizade, companheirismo, discussões científicas e auxílio em diversos momentos ao longo do meu doutorado. Obrigada pelas conversas divertidas, pela troca de experiências e pelo constante apoio, principalmente durante meu PDSE;

Aos pacientes que cederem gentilmente suas amostras para a realização deste projeto;

Ao Programa de pós-graduação em Biociências, em especial aos secretários que sempre me ajudaram;

À minha família que muito amo. À minha avó que dedicou anos de sua vida a cuidar e nossa família. À minha mãe pelo amor e esforço imensurável para prover o melhor para nossa família. À minha irmã pelo companheirismo, apoio e amor incondicional ao longo de nossas vidas. Agradeço à vocês todas as minhas conquistas!

À amiga Camilla Andrade, pelo companheirismo e amizade ao longo de muitos anos, você já foi incluída na família. Obrigada por cuidar dos meus maiores bens (minha família e minhas cachorras) enquanto eu estava fora, obrigada pela imensa ajuda e paciência na formatação desta tese. Obrigada por me acalmar e aguentar meu choro em momentos difíceis, assim como dividir momentos felizes!!

À amiga Juliana Guedes pelo apoio mais que importante durante PDSE, pela maravilhosa amizade que construímos neste período e por toda as mudanças que você me estimulou a fazer. Sou uma pessoa muito melhor após o seu tsunami! Obrigada por me “segurar” diante às “adversidades holandesas” e por termos compartilhado vários dos melhores momentos de minha vida.

Às amigas Aline Masson e Vivian Assunção pela amizade de vida, pela importante parceria que criamos ao longo dos nossos vinte anos de amizade. Obrigada por estarem sempre comigo. Obrigada pelos momentos felizes e pelo suporte nas horas difíceis.

Ao Carlos pelo apoio e paciência ao longo dos nossos onze anos de parceria. Obrigada por aguentar meus ataques de estresse, e por vezes tentar me acalmar, e por relevar minha impulsividade. Agradeço por toda palavra de estímulo e carinho neste período.



Não é o mais forte que sobrevive,  
nem o mais inteligente,  
mas o que melhor se adapta às mudanças

*Charles Darwin*

## RESUMO

LISBOA, Lilian Brewer. **Avaliação de mecanismos de regulação de SPRR3 em carcinoma epidermoide de esôfago**. 2018. 142f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Câncer de esôfago (CE) é o oitavo tumor mais frequente e representa a sexta causa de morte relacionada ao câncer, sendo o carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) correspondente a 80% dos casos. SPRR3 é uma proteína associada à diferenciação epitelial terminal, e a perda gradual da expressão, tanto gênica quanto proteica, de SPRR3 na transformação maligna das células escamosas da mucosa do esôfago saudável já foi vista em alguns trabalhos. No entanto, estudos sobre os mecanismos moleculares envolvidos na regulação de SPRR3 são limitados. Logo, o alvo desse estudo foi investigar possíveis mecanismos relacionados à regulação deste gene. Inicialmente, após identificarmos a diminuição da expressão gênica de SPRR3 em 35 amostras de CEE quando comparadas as respectivas mucosas adjacentes não tumorais, avaliamos os níveis de metilação de DNA em 3 regiões (A e B – região promotora e C – região 5'UTR) desse gene por pirosequenciamento nessas mesmas amostras. Os resultados mostraram uma correlação inversa entre níveis de metilação de SPRR3 e sua expressão gênica nas 3 regiões analisadas. Em seguida avaliamos a expressão das três principais DNA metil-transferases (DNMTs), nesse mesmo grupo de amostras, e observamos correlação negativa entre a expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B com expressão gênica de SPRR3 e correlações positivas em relação aos níveis de metilação de SPRR3, com exceção de DNMT3A e sítio C. A partir desses dados, fizemos o tratamento das linhagens celulares de CEE (OE21, TE1, TE13) com agente inibidor das DNMTs (decitabina). Este tratamento induziu demetilação nas células e aumento de expressão gênica de SPRR3. Em seguida avaliamos o envolvimento de miRNAs no silenciamento de SPRR3 e, analisando dados depositados no banco de dados TCGA, identificamos que miR-21 e miR-503 apresentaram correlação inversa com expressão de SPRR3. MiR-503 possui SPRR3 como alvo predito, enquanto que miR-21 parece atuar de forma indireta, conforme análise preditiva utilizando site MiRWalk. Este estudo também identificou, por meio de análise *in silico* utilizando os programas MatInspector e JASPAR, 24 fatores de transcrição que poderiam afetar a regulação da expressão de SPRR3. Dentre estes, 13 genes apresentaram correlação significativa com a expressão de SPRR3 em amostras de CEE. Identificamos o fator transcricional MEIS1 como possível alvo do miR-21 e que este poderia atuar na regulação de SPRR3. Como conclusão, podemos relacionar a redução da expressão de SPRR3 em CEE com a metilação do DNA mediada pelas DNMTs, assim como podemos sugerir o envolvimento de outros mecanismos no silenciamento deste gene, como a influência de fatores de transcrição e a ação direta e indireta de miRNAs.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de esôfago. SPRR3. DNMTs. Metilação do DNA. miRNA.

## ABSTRACT

LISBOA, Lilian Brewer. **Evaluation of *SPRR3* regulatory mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma.** 2018. 142f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Esophageal cancer (EC) is the eighth most frequent tumor and represents a sixth cancer-related death cause, with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) accounting for 80% of cases. *SPRR3* is a protein associated with terminal epithelial differentiation and a gradual loss of both *SPRR3* gene and protein expression in the malignant transformation of healthy esophagus into ESCC has been seen in some studies. However, studies on the molecular mechanisms involved in the regulation of *SPRR3* are limited. Therefore, the objective of the study was to investigate possible mechanisms related to the regulation of this gene. Initially, after identifying the decrease of *SPRR3* gene expression in 35 ESCC samples in comparison to their respective tumor surrounding mucosa, we evaluated DNA methylation levels in 3 gene regions (A, B and C) by pyrosequencing in these samples. The results showed a negative correlation between methylation levels of *SPRR3* and its gene expression in the 3 regions analyzed. Then, we evaluated an expression of the three major DNA methyl transferases (*DNMTs*), enzymes involved in DNA methylation process, using the same group of samples, and we observed correlation between expression of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* with genetic expression and methylation levels of *SPRR3*, with the exception of *DNMT3A* and site C. After this, we performed the treatment of ESCC cell lines (OE21, TE1, TE13) with *DNMT* inhibitor (decitabine). Treatment with decitabine induced cell demethylation and increased *SPRR3* gene expression. Next, we evaluated the involvement of miRNAs in the silencing of *SPRR3* and, analyzing data deposited in the TCGA database, we identified that miR-21 and miR-503 presented an inverse correlation with *SPRR3* expression. MiR-503 has *SPRR3* as the predicted target, while miR-21 appears to act indirectly, according to predictive analysis using MiRWalk site. Therefore, our results suggest a direct regulation by miR-503 and an indirect action of miR-21 on the silencing of *SPRR3*. This study also identified, through *in silico* analysis using the MatInspector and JASPAR programs, 24 transcription factors that could affect the regulation of *SPRR3* expression. Among these, 13 genes showed a significant correlation with *SPRR3* expression in ESCC samples. We identified the transcriptional factor *MEIS1* as a possible target of miR-21 and that it could act in the regulation of *SPRR3*. Thus, our data together suggest that epigenetic mechanisms are involved in the silencing of *SPRR3* in ESCC. As conclusion, we can relate the reduction of *SPRR3* expression in ESCC with DNA methylation mediated by *DNMTs*, as well as we can suggest the involvement of other mechanisms in the silencing of this gene, such as the influence by transcription factors and the direct and indirect action of miRNAs .

Keywords: Esophageal squamous cell carcinoma. *SPRR3*. *DNMTs*. DNA methylation. microRNA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Anatomia do esôfago com visão do órgão ampliada.....	20
Figura 2 –	Distribuição geográfica mundial da incidência do câncer de esôfago....	21
Figura 3 –	Fotos representativas de cromoendoscopia utilizando marcação com lugol.....	23
Figura 4 –	História natural do CEE .....	24
Figura 5 –	Gráfico representando as taxas de incidência e mortalidade por sexo, dos tumores mais incidentes no mundo .....	25
Figura 6 –	Representação gráfica do estadiamento do câncer de esôfago .....	26
Figura 7 –	Tipos de epitélio e seus correspondentes sistemas fisiológico .....	28
Figura 8 –	Estrutura do epitélio estratificado (A) queratinizado e (B) não-queratinizado.....	29
Figura 9 –	Camadas do tecido epitelial estratificado e as diferentes proteínas expressas em cada uma delas ao longo da diferenciação epitelial.....	31
Figura 10 –	Representação esquemática da região gênica EDC no cromossomo 1 (1q21) .....	32
Figura 11 –	Expressão gênica e proteica de SPRR3 em esôfago humano.....	35
Figura 12 –	Mecanismos epigenéticos relacionados à regulação da expressão gênica.....	37
Figura 13 –	Biogênese dos miRNAs e mecanismos de regulação pós-transcricionais.....	39
Figura 14 –	Octâmero de histonas e nucleossomo.....	40
Figura 15 –	Interação de modificações nas caudas de histonas e efeitos na cromatina .....	42
Figura 16 –	Metilação do DNA .....	43
Figura 17 –	Padrões de metilação alterados na tumorigênese .....	45
Figura 18 –	Análogos de citidinas .....	46
Figura 19 –	Representação gráfica da localização dos sítios CpGs avaliados.....	55
Figura 20 –	Perfil de expressão gênica de SPRR3 em pacientes com CEE.....	64
Figura 21 –	Análise da metilação de SPRR3 utilizando dados do metiloma de carcinoma epidermoide e esôfago .....	67
Figura 22 –	Análise do perfil de metilação dos três sítios de <i>SPRR3</i> em pacientes	

	com CEE.....	68
Figura 23 –	Curva ROC exibindo poder discriminativo entre tecido tumoral e mucosa adjacente ao tumor utilizando os níveis de metilação.....	69
Figura 24 –	Correlação entre expressão gênica e metilação de <i>SPRR3</i> em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	70
Figura 25 –	Perfil de expressão gênica de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	73
Figura 26 –	Correlação entre os níveis de expressão de <i>SPRR3</i> e <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	74
Figura 27 –	Correlação entre a expressão gênica de <i>DNMT1</i> e a metilação dos 3 sítios de <i>SPRR3</i> em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	75
Figura 28 –	Correlação entre a expressão gênica de <i>DNMT3A</i> e a metilação dos 3 sítios de <i>SPRR3</i> em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	76
Figura 29 –	Correlação entre a expressão gênica de <i>DNMT3B</i> e a metilação dos 3 sítios de <i>SPRR3</i> em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	77
Figura 30 –	Curva de sobrevida global para os indivíduos incluídos no estudo.....	78
Figura 31 –	Curva de sobrevida global em relação à expressão de <i>SPRR3</i> em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	79
Figura 32 –	Curva de sobrevida global em relação à metilação do Sítio A de <i>SPRR3</i> em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	80
Figura 33 –	Curva de sobrevida global em relação à metilação do Sítio B de <i>SPRR3</i> em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	81
Figura 34 –	Curva de sobrevida global em relação à metilação do Sítio C de <i>SPRR3</i> em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.....	82
Figura 35 –	Perfil de expressão de <i>SPRR3</i> em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago.....	83
Figura 36 –	Viabilidade celular e perfil de metilação dos sítios B e C de <i>SPRR3</i> em linhagem celular de carcinoma epidermoide de esôfago .....	84
Figura 37 –	Viabilidade celular em linhagem celular de carcinoma epidermoide de	

	esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina .....	85
Figura 38 –	Perfil de metilação dos sítios B e C de <i>SPRR3</i> em linhagem de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina .....	86
Figura 39 –	Expressão de <i>SPRR3</i> em linhagem de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina.....	87
Figura 40 –	Viabilidade celular em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina.....	88
Figura 41 -	Variação da expressão de <i>SPRR3</i> em linhagens celulares de CEE tratadas com diferentes doses de 5-Aza-2'-desoxicitidina.....	89
Figura 42 –	Variação da expressão de <i>SPRR3</i> em linhagens celulares de CEE tratadas com 5-Aza-2'-desoxicitidina .....	90
Figura 43 –	Perfil de metilação dos sítios A e B de <i>SPRR3</i> em linhagens de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina .....	91
Figura 44 –	Correlação entre expressão de dois miRNAs super-expressos em CEE e expressão gênica de <i>SPRR3</i> .....	92
Figura 45 –	Número de potenciais fatores de transcrição de <i>SPRR3</i> identificados pelos programas MatInspector e JASPAR .....	93
Figura 46 –	Correlações entre expressão de <i>SPRR3</i> e 13 fatores de transcrição....	95
Figura 47 –	Perfil de expressão de <i>MEIS1</i> utilizando valores gerados pela análise de transcriptoma .....	96
Figura 48 –	Correlação entre expressão gênica de <i>SPRR3</i> e <i>MEIS1</i> em CEE.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores as reações de qPCR	51
Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões contendo sítios CpGs no gene <i>SPRR3</i> pela técnica de pirosequenciamento.....	54
Tabela 3 – Descrição das linhagens celulares .....	56
Tabela 4 – Descrição das características sociodemográficas e clinicopatológicas da população do estudo.....	63
Tabela 5 - Análise dos fatores sociodemográficos e clinicopatológicos em relação à <i>fold change</i> de expressão de <i>SPRR3</i> no tumor.....	65
Tabela 6 – Mediana de $\Delta$ de metilação nos sítios A, B e C e valores mínimo e máximo de acordo com as categorias das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas .....	71
Tabela 7 – Relação dos treze fatores de transcrição identificados e sua variação na expressão gênica em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago.....	94

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ADE	Adenocarcinoma de esôfago
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
AKT	Proteína quinase B (PKB)
AMP	Monofostado de adenosina
APS	adenosina 5' fosfosulfato
ATP	Adenosina trifosfato
BNT	Banco Nacional de Tumores – INCA
cDNA	DNA complementar
CE	Câncer de Esôfago
CEE	Carcinoma epidermoide de esôfago
CK5/14	Par de queratinas 5 e 14
CMLVs	Células musculares lisas vasculares
CpG	Regions of DNA where a cytosine nucleotide is followed by a guanine nucleotide in the linear sequence of bases along its 5' → 3' direction.
C <sub>T</sub>	→ 3' direction.
Curva ROC	Ciclo de threshold Receiver Operating Characteristic – eficiência do operador de recepção de sinais
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
DNMT	DNA metiltransferases
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol – molécula redutor
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético – agente quelante
EDC	Complexo de diferenciação epidermal
EE	Equivalentes de Esôfago
EGF	Fator de crescimento epidermal
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma
FI	Filamentos intermediários
FLG	Filagrina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA6	GATA binding Protein 6



HATs	Histona acetil-transferases
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HDACs	Enzimas histona desacetilases
HER2	Epidermal growth factor receptor 2
HET-1A	Linhagem celular de esôfago normal imortalizada com SV40
HGIN	Neoplasia intra-epitelial de alto grau
HMT	Enzima histona metiltransferase
h-TERT	Human telomerase reverse transcriptase
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Nacional de Pesquisa em Câncer)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
JNK	Proteína quinase n-terminal JUN
KYSE450	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermoide de esôfago
LEPs	Late envelope proteins
LGIN	Neoplasia intra-epitelial de baixo grau
LINEs	Long interspersed nuclear elements
lncRNA	Long non-coding RNA
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Mdm2	Murine double minute 2
Meio DMEM	Meio Dulbecco MEM - É uma mistura de sais enriquecidos com aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular
Meio RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute – É um meio contendo uma série de sais, aminoácidos e outros componentes essenciais para o crescimento celular
miRNAs	MicroRNA
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
ncRNAs	RNA não codificante
NSCLC	Câncer de pulmão de não pequenas células
OE-21	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermoide de esôfago

pb	Pares de base
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PKC	Proteína quinase C
PPI	pirofosfato
RLT	Tampão de Lise celular contendo guanidina tiocianato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RPE	Tampão no qual é adicional etanol para uso
RT	Reação de transcrição reversa
RW1	Tampão contendo sais de guanidina e etanol
SAM	S-adenosil metionina
SCLC	Câncer de pulmão de pequenas células
SFB	Soro Fetal Bovino
SINEs	short interspersed nuclear elements
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SPRRs	Proteínas pequenas ricas em prolina
SPRR3	Esofagina
sRNA	small RNA
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TE-1	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermoide de esôfago
TE-13	esôfago
Th2	Linhagem celular derivada de carcinoma epidermoide de esôfago
TP53	esôfago
TPA	Linfócito T helper 2
TRDMT1	Gene que codifica a proteína p53 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate tRNA-aspartic acid methyltransferase 1
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>47</b>
1.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>47</b>
1.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>47</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
2.1	<b>Amostras de Pacientes.....</b>	<b>48</b>
2.1.1	<u>Amostras Recém-Obtidas.....</u>	<b>48</b>
2.1.2	<u>Extração do RNA.....</u>	<b>48</b>
2.1.3	<u>Quantificação do RNA.....</u>	<b>49</b>
2.1.4	<u>Reação de Transcriptase Reversa.....</u>	<b>49</b>
2.1.5	<u>Reação Em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR).....</u>	<b>50</b>
2.1.6	<u>Extração do DNA.....</u>	<b>52</b>
2.1.7	<u>Quantificação do DNA.....</u>	<b>53</b>
2.1.8	<u>Modificação Por Bissulfito de Sódio.....</u>	<b>53</b>
2.1.9	<u>Reação de PCR para Pirosequenciamento.....</u>	<b>53</b>
2.1.10	<u>Pirosequenciamento.....</u>	<b>55</b>
2.2	<b>Experimentos <i>In Vivo</i>.....</b>	<b>56</b>
2.2.1	<u>Características das Linhagens Celulares.....</u>	<b>56</b>
2.2.2	<u>Cultivo das Linhagens Celulares.....</u>	<b>57</b>
2.2.3	<u>Extração de RNA.....</u>	<b>57</b>
2.2.4	<u>Tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina.....</u>	<b>58</b>
2.2.5	<u>Ensaio de Viabilidade Celular.....</u>	<b>59</b>
2.2.6	<u>Extração de DNA.....</u>	<b>59</b>
2.3	<b>Análise <i>In Silico</i> de miRNAs.....</b>	<b>60</b>
2.4	<b>Análise <i>In Silico</i> de Fatores de Transcrição.....</b>	<b>60</b>
2.5	<b>Análises Estatísticas.....</b>	<b>61</b>
3	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
3.1	<b>Casuística.....</b>	<b>62</b>
3.2	<b>Análise da Expressão Gênica de <i>SPRR3</i>.....</b>	<b>63</b>
3.3	<b>Avaliação da Associação Entre a Metilação do DNA e Silenciamento Gênico de <i>SPRR3</i>.....</b>	<b>66</b>

3.3.1	<u>Análises do Perfil de Metilação de <i>SPRR3</i>.....</u>	66
3.3.2	<u>Análises da Expressão Gênica das <i>DNMTs</i>.....</u>	72
3.3.3	<u>Impacto da Expressão e Metilação de <i>SPRR3</i> no Prognóstico de Pacientes com CEE.....</u>	78
3.3.4	<u>Linhagem Celular.....</u>	82
3.4	<b>Identificação de Potenciais miRNAs Ligantes à <i>SPRR3</i>.....</b>	92
3.5	<b>Identificação de Potenciais Fatores de Transcrição Associados à Expressão de <i>SPRR3</i>.....</b>	93
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	99
	<b>CONCLUSÕES.....</b>	108
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	109
	<b>ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética.....</b>	123
	<b>ANEXO B - Cultura Organotípica Utilizando Célula de Mucosa Esofágica Imortalizada por hTERT.....</b>	124

## INTRODUÇÃO

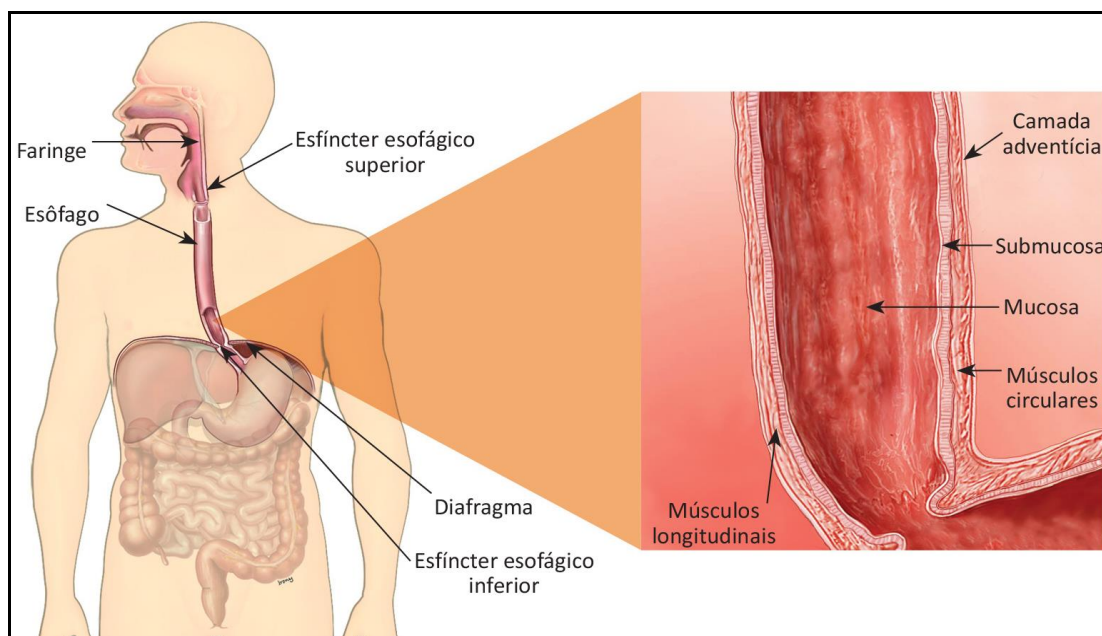
### Câncer de Esôfago

#### Anatomia do Esôfago

O esôfago é um canal tubular, de anatomia muscular complexa, medindo aproximadamente 25 cm, conectando a faringe ao estômago, permitindo desta forma, a passagem da comida mediante a uma série de contrações musculares bem coordenadas da musculatura da parede do esôfago (movimentos peristálticos) (BRASSEUR *et al.*, 2007).

Este órgão transpassa por três planos anatômicos (pescoço, tórax e abdômen) e é dividido em esfíncter esofágico superior, corpo do esôfago e esfíncter esofágico inferior (FISICHELLA & PATTI, 2002). O esôfago é constituído por quatro camadas teciduais: a mucosa, a submucosa, a camada muscular externa (muscular própria), sendo esta subdividida em musculatura longitudinal e musculatura circular, e a camada adventícia. Apresenta três diferentes tipos celulares, células epiteliais escamosas, fibroblastos e células musculares (ZHU & ONG, 2009) (Figura 1). A mucosa esofágica consiste de uma camada de células epiteliais escamosas não queratinizadas, e sua principal função é atuar na defesa tecidual contra os possíveis danos causados pela passagem do bolo alimentar (BECKSTEAD *et al.*, 2005).

Figura 1 - Anatomia do esôfago com visão do órgão ampliada

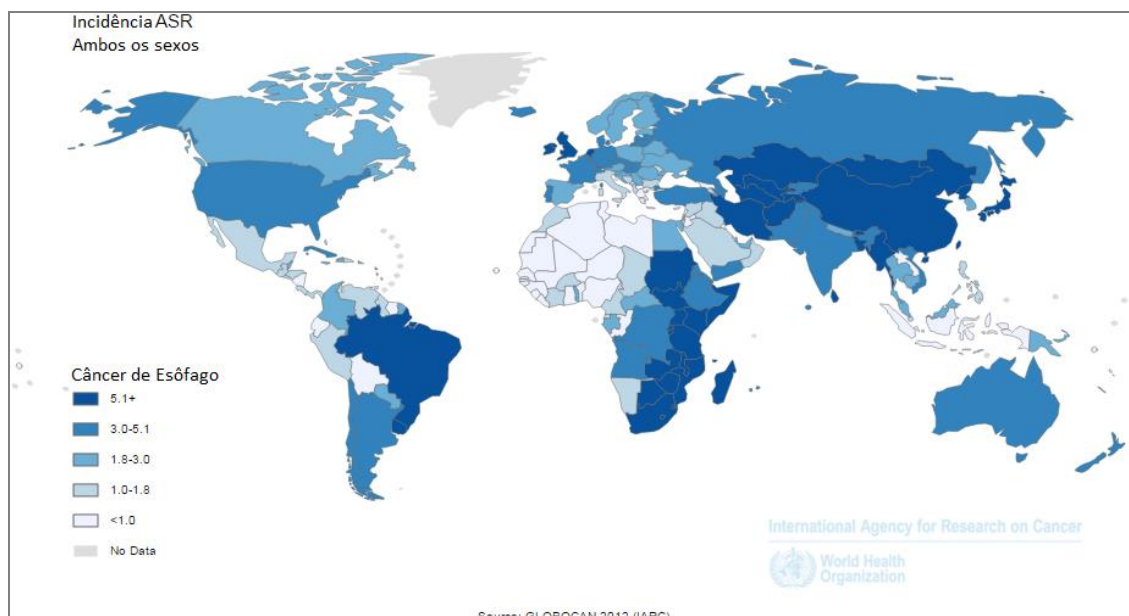


Fonte: <https://www.vencercancer.org.br>

## Epidemiologia do Câncer de Esôfago

O câncer de esôfago (CE) corresponde à sétima neoplasia mais incidente em todo o mundo e a sexta causa mais comum de morte por câncer (BRAY *et al.*, 2018). Foram estimados 456 mil novos casos no ano de 2012, em todo o mundo (FERLAY *et al.*, 2015), o que torna esta doença um problema de saúde pública. Este tumor acomete três vezes mais homens que mulheres e aproximadamente 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2015). A incidência deste câncer varia amplamente conforme localização geográfica mundial (PICKENS & ORRINGER *et al.*, 2003). Esta diferença pode variar em até centenas de vezes entre regiões de alta e baixa incidência, sendo leste da África, centro sul da Ásia, Japão e sul da América do Sul (destacando-se Brasil e Uruguai) regiões que apresentam maiores taxas de incidência desta doença (PICKENS & ORRINGER *et al.*, 2003; PARKIN *et al.*, 2009; JEMAL *et al.*, 2011) (Figura 2). As variações de incidência deste tumor dentro de uma mesma área geográfica evidenciam uma relação da gênese da doença com uma etiologia multifatorial, muitas vezes relacionada a hábitos culturais de consumo e exposição à carcinógenos, bem como relacionada a fatores socioeconômicos (LAYKE & LOPEZ, 2006).

Figura 2 - Distribuição geográfica mundial da incidência do câncer de esôfago



Legenda: Tom de azul escuro corresponde às regiões com alta incidência, enquanto que azul claro corresponde à baixa incidência.

Fonte: Modificado de GLOBOCAN, 2012 – IARC.

Como visto na figura 2, o Brasil possui destaque por sua alta taxa de incidência de CE. Conforme publicação realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima-se para o Brasil no biênio 2018-2019, 8.240 novos casos de câncer de esôfago em homens e 2.550 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 7,99 casos novos a cada 100 mil homens e 2,38 para cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de esôfago corresponde ao sexto tumor mais incidente entre homens e o décimo quinto entre as mulheres (INCA, 2018).

Existem dois subtipos histológicos prevalentes de CE: o adenocarcinoma de esôfago (ADE) e o carcinoma de células escamosas do esôfago ou carcinoma epidermoide do esôfago (CEE), que diferem entre si, consideravelmente, quanto aos fatores etiológicos e incidência geográfica (PARKIN *et al.*, 2009; DA COSTA *et al.*, 2013). Embora atualmente observa-se um aumento progressivo da incidência de ADE em países desenvolvidos, o CEE ainda assim predomina, com cerca de 80% dos casos de CE diagnosticados no mundo (VIZCAINO *et al.*, 2002; HUR *et al.*, 2013). O aumento do número de casos de ADE pode estar relacionado, principalmente, a mudanças nos hábitos alimentares destas populações, refletindo aumento no consumo de alimentos gordurosos e pobres em nutrientes (FALK *et al.*,

2009), levando ao excesso de peso e obesidade, que são fatores de risco para o desenvolvimento de ADE (EL-SERAG *et al* 2007; POST *et al.* 2007).

Estudos do tipo caso-controle e coorte já indicaram que refluxo gastroesofágico, fumo e obesidade são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do ADE (RUBENSTEIN & TAYLOR, 2010). Embora o risco seja maior para desenvolvimento do ADE entre fumantes ativos do que em indivíduos não fumantes, o fumo é um fator de risco muito mais forte e incontestável para o CEE do que para o ADE (TRAMACERE *et al.*, 2011), assim como o consumo de álcool, e o risco relativo aumenta em mais de 30 vezes com o uso concomitante do cigarro (*American Cancer Society*, 2008; KUBO *et al.*, 2010; PRABHU, OBI & RUBENSTEIN, 2014). Também são propostos como fatores de risco para desenvolvimento do CEE, baixo consumo de vegetais e frutas; deficiência de selênio, zinco ou vitamina E; alto consumo de carnes vermelhas, gorduras e alimentos processados (SECRETAN *et al.*, 2009; COLEMAN *et al.*, 2013; PENNATHUR *et al.*, 2013). Adicionalmente, a contaminação de alimentos por nitrosaminas, que são carcinógenos com alto tropismo pelo aparelho gastroesofágico (FORREST, 1993), a desnutrição e o consumo de chá quente estão envolvidos na etiologia deste tumor em alguns países, como a China e a Índia. No Irã, além da desnutrição e da ingestão de chá quente, o consumo de ópio representa um importante fator de risco para o desenvolvimento do CEE. Enquanto que no Japão, apenas o consumo de chá quente parece ter relação direta ao desenvolvimento do CE (SEPEHR *et al.*, 2001). O Sul do nosso país representa a região com maior taxa de incidência de CE em todo território nacional e além do consumo de bebidas alcoólicas e tabaco, destaca-se o consumo do “chimarrão” (chá da erva mate consumido em temperatura em torno de 70°C) como fator importante ao desenvolvimento do CEE (CASTELLSAGUÉ *et al.*, 1999, 2000).

### **História Natural do Carcinoma Epidermoide de Esôfago e Seu Tratamento**

O CEE se desenvolve via um processo multi-etapas que se inicia no epitélio escamoso esofágico normal que progride para uma neoplasia intraepitelial de baixo grau (LGIN), seguida de uma neoplasia intra-epitelial de alto grau (HGIN) e por fim, no carcinoma invasivo (BOSMAN *et al.*, 2010). Em todas essas etapas é possível



detectar o CEE com auxílio da cromoendoscopia com lugol (*Schiller test*) (Figura 3). A aplicação de lugol no esôfago, em uma endoscopia de rotina, resulta na coloração diferencial do tecido, possibilitando a detecção de displasias e lesões neoplásicas em estágios iniciais, uma vez que o lugol é um composto de marcação que apresenta afinidade pelo glicogênio presente no epitélio escamoso não queratinizado, o mesmo encontrado na mucosa esofágica saudável. Em tumores, o processo de diferenciação celular é alterado e observamos um perfil de células pouco diferenciadas (“desdiferenciação” tecidual) no epitélio esofágico, com isso a reserva de glicogênio deste tecido é perdida e conseqüentemente não há marcação por lugol desse epitélio (Figura 3) (DAWSEY *et al.*, 1998).

Figura 3 - Fotos representativas de cromoendoscopia utilizando marcação com lugol

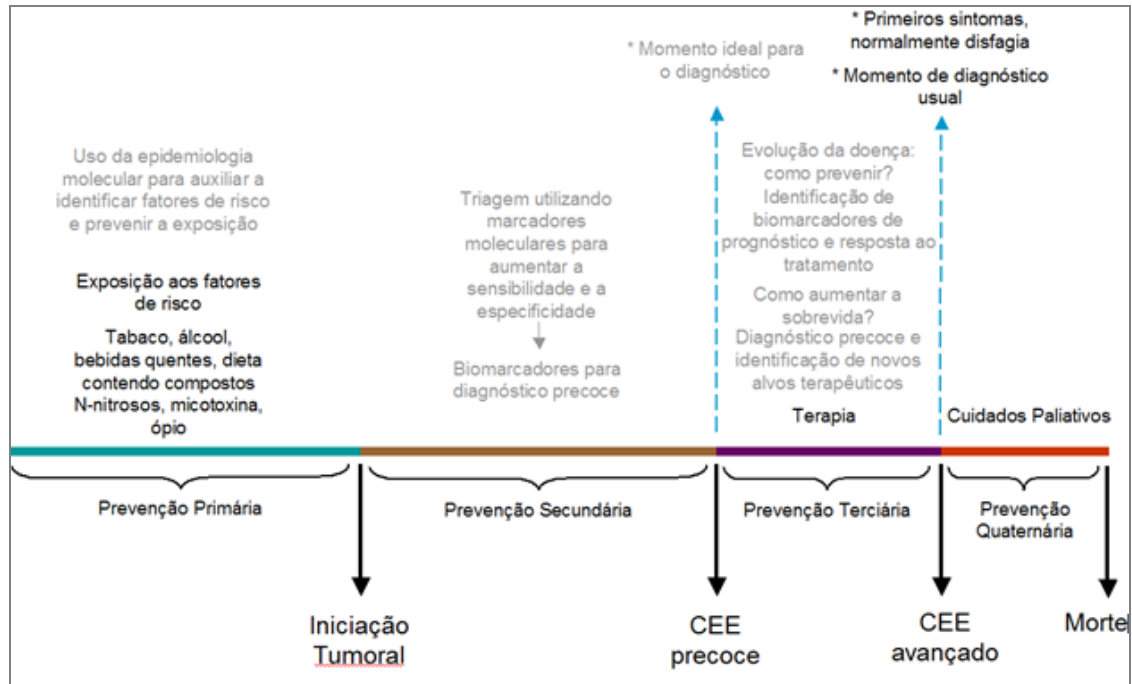


Legenda: A seta indica área não corada (iodo clara) com lugol.

Fonte: Modificado de Ohashi *et al.*, 2015.

A história natural do CEE é proposta conforme modelo comumente utilizado para outras doenças, em que descreve os diferentes estágios através dos quais seria possível intervir ao longo da progressão da doença (Figura 4). Este modelo parte do princípio de que após uma exposição crônica a agentes etiológicos, a transformação neoplásica ocorre na mucosa esofágica e dificilmente é detectada em estágios mais precoces do desenvolvimento. Neste caso, restando como possíveis terapias, a quimiorradioterapia neoadjuvante seguida por esofagectomia (DA COSTA *et al.*, 2013).

Figura 4 - História natural do CEE

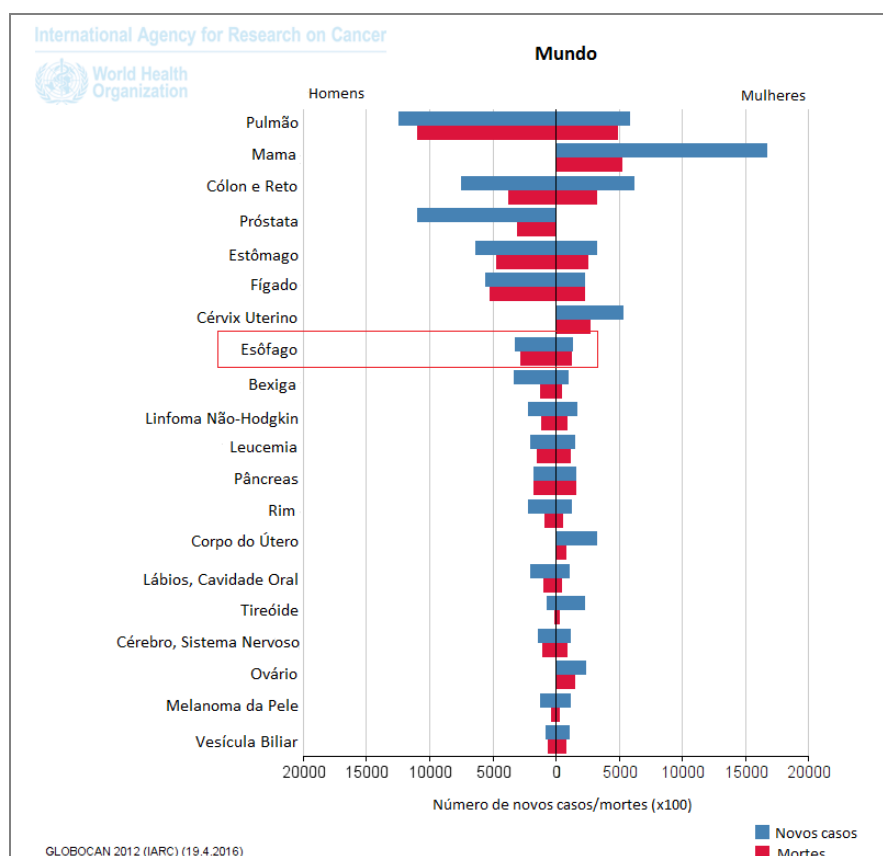


Legenda: Evolução temporal do carcinoma epidermoide de esôfago e destaque aos diferentes momentos de intervenção para a prevenção e diagnóstico da doença.

Fonte: Modificado de da Costa *et al.*, 2013.

O CEE é uma doença altamente letal, e observamos esta característica ao avaliarmos a similaridade entre as taxas de incidência e mortalidade deste tumor (Figura 5). O tratamento do CEE representa grande desafio, uma vez que seu diagnóstico é frequentemente definido em estádios mais avançados da doença (T3 e T4), em geral quando o paciente já apresenta disfagia por conta de obstrução (que pode acometer de 50 a 75% da luz esofágica). Desta forma, o diagnóstico feito tardiamente dificulta o tratamento adequado e torna o prognóstico do paciente bastante desfavorável (STEIN *et al.*, 2001). Além disso, no momento do diagnóstico cerca de 40% dos pacientes apresentam metástases, o que inviabiliza o tratamento cirúrgico curativo e culmina na piora das taxas de sobrevida (JEMAL *et al.*, 2006).

Figura 5 - Gráfico representando as taxas de incidência e mortalidade por sexo, dos tumores mais incidentes no mundo



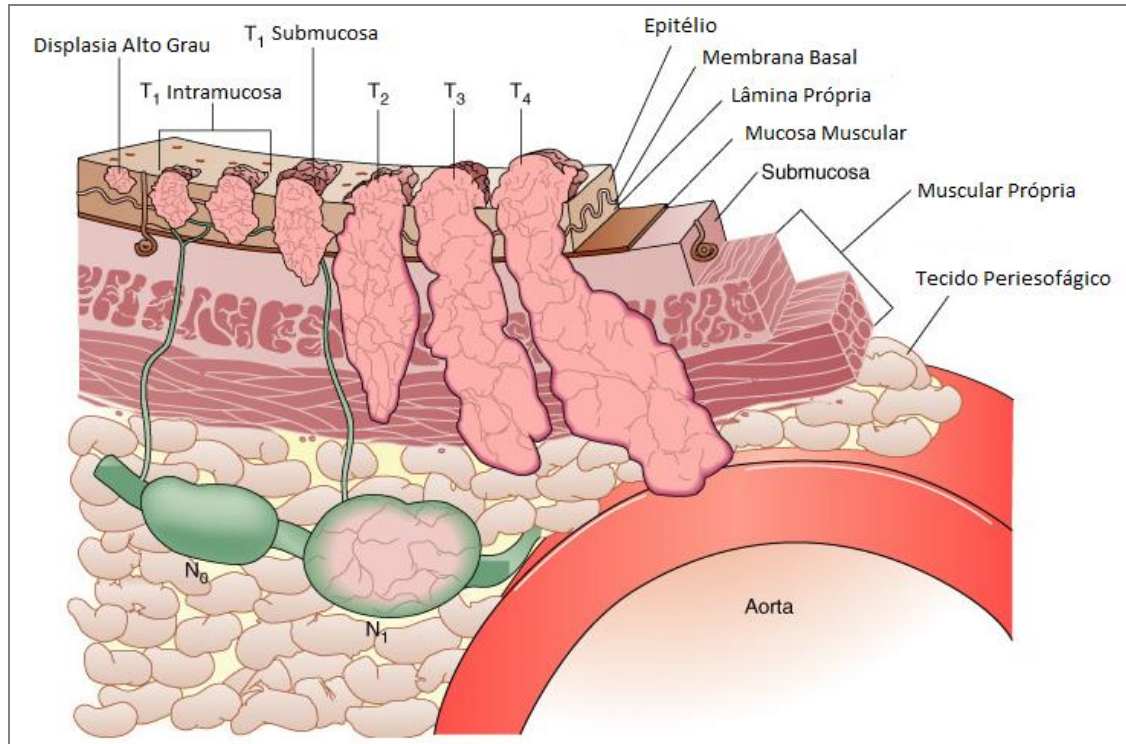
Legenda: As barras azuis correspondem às taxas de incidência, enquanto que as vermelhas correspondem à mortalidade. Taxas ajustadas por idade e por 100.000 habitantes.

Fonte: Modificado de GLOBOCAN, 2012 – IARC.

O estadiamento tumoral é importante para determinação de estratégias terapêuticas. A classificação TNM, atualmente na oitava edição, é o sistema de estadiamento preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC - *Union for International Cancer Control*) para auxiliar a classificação do estadiamento de diferentes tumores, incluindo CEE. O “T” é definido como extensão do tumor primário e é classificado em cinco categorias: Tis (carcinoma *in situ* ou displasia de alto grau), T1 (tumor confinado à lâmina própria, podendo invadir submucosa); T2 (tumor invade camada muscular); T3 (tumor invade tecidos adjacentes) e T4 (tumor invade estruturas adjacentes, como outros órgãos) (Figura 6). O “N” refere-se ao comprometimento linfonodal, definido pelo número de linfonodos envolvidos. As categorias são: N0 (sem metástase linfonodal); N1 (metástase em 1 ou 2 linfonodos regionais); N2 (metástase em 3 a 6 linfonodos regionais) e N3 (metástase em mais de 7 linfonodos regionais). Quanto ao “M”, os tumores são classificados como M0

(sem metástase à distância) e M1 (com metástase à distância) (NICHOLSON *et al.*, 2018).

Figura 6 - Representação gráfica do estadiamento do câncer de esôfago



Fonte: Modificado de Rice, 2015.

Além da classificação TNM, o grau histopatológico do tumor também é utilizado para determinar prognóstico (SOBIN, GOSPODAROWICZ & WITTEKIND, 2009). A análise histopatológica do CEE é definida baseada na atividade mitótica, atipia nuclear e no nível de diferenciação (BOSMAN *et al.*, 2010). Sendo os tumores então, classificados como: G1 (bem diferenciado); G2 (moderadamente diferenciado); G3 (pouco diferenciado) e G4 (indiferenciado) (SOBIN, GOSPODAROWICZ & WITTEKIND, 2009). Por conta desta característica marcante que é a diferenciação alterada, algumas proteínas associadas à diferenciação epitelial podem ser utilizadas como marcadores de diferenciação. Um exemplo disto é a proteína involucrina, que é expressa em ninhos de células bem diferenciadas do tumor, mas que não é expressa em CEE pouco diferenciado (NOZOE *et al.*, 2006).

## Diferenciação Epitelial

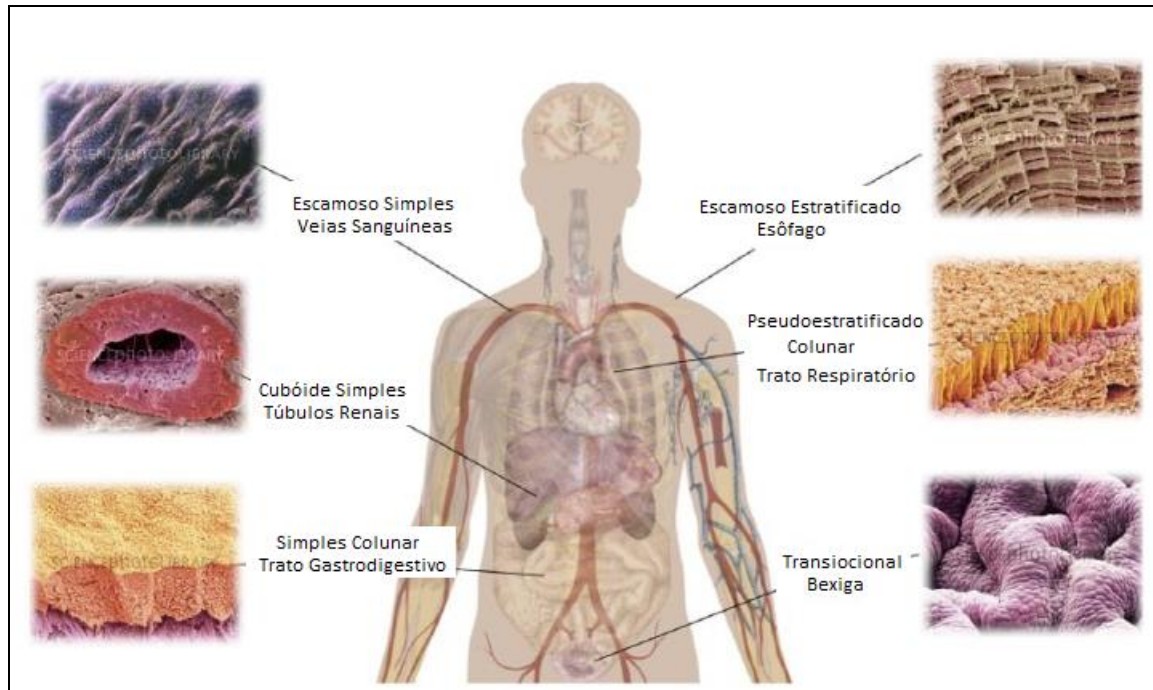
Os tecidos dos vertebrados são tradicionalmente divididos em dois grandes grupos: os tecidos epiteliais, de origem ectodérmica ou endodérmica, e geralmente com pouca substância intercelular; e os tecidos mesenquimais, de origem mesodérmica, que possuem maior conteúdo de material extracelular (BANKS, 1993).

Os tecidos epiteliais recobrem superfícies internas e externas do corpo, separando compartimentos (BRAGULLA & HOMBERGER, 2009), desempenhando funções extremamente relevantes para a homeostase, tais como: criar uma barreira protetora por envolver determinados órgãos, absorção de conteúdos luminiais, secreção de substâncias no lúmen, assim como também desempenham função de controle da passagem de substâncias pela superfície do corpo através de difusão seletiva (MCHUGH, TAO & SAINT-GENIEZ, 2013). As células epiteliais costumam ser observadas como uma lâmina de células em alguns órgãos, mas em muitos outros são encontradas na forma de camadas. Estas células residem sobre uma membrana basal, a qual demarca o limite entre as células epiteliais e as outras células que residem abaixo destas. Ainda, a membrana basal não é penetrada por compartimentos sanguíneos, portanto, as células do epitélio contam com difusão para seu suprimento de oxigênio e nutrientes (JOSHI & DAVIDSON, 2012).

Os tecidos epiteliais consistem de células escamosas, cuboides ou colunares ligadas entre si por meio de estruturas de adesão, que podem variar conforme função desempenhada (BANKS, 1993, FRAPPIER, 2006). Os tecidos epiteliais podem ser classificados em simples, um tipo intermediário chamado transicional ou estratificado (FRAPPIER, 2006) (Figura 7). Resumidamente, o primeiro deles pode ser de dois tipos, o de camada única, em que todas as células são ligadas à camada basal e se estendem à superfície do epitélio, e o de multicamadas (aspecto pseudoestratificado), em que todas as células estão em contato com a membrana basal, mas nem todas, necessariamente, se estendem até a superfície do epitélio. No epitélio transicional, algumas células estão ligadas à membrana basal e também se estendem à superfície epitelial. No epitélio estratificado, somente as células das camadas inferiores estão ligadas à membrana basal e são mitoticamente ativas, enquanto as células mais apicais formam a superfície do epitélio. As células do estrato intermediário do epitélio estratificado passam por processo de diferenciação.

Em epitélio queratinizado, a camada córnea é composta por células cornificadas pela adição de uma camada proteica na superfície da membrana celular (BRAGULLA & HOMBERGER, 2009).

Figura 7 - Tipos de epitélio e seus correspondentes sistemas fisiológicos

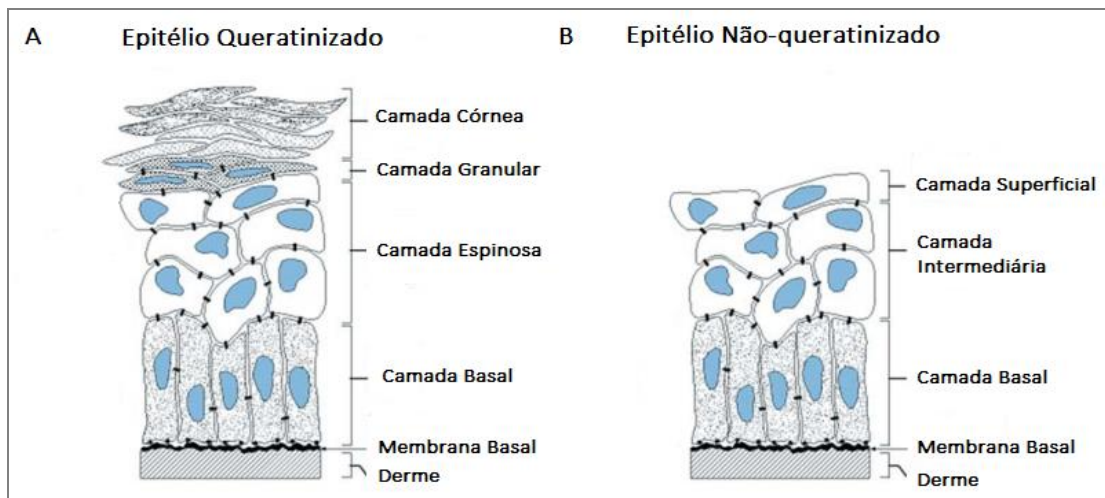


Fonte: Modificado de SAKSENA *et al.*, 2016.

Um dos tecidos epiteliais mais conhecidos e estudados é a epiderme, que consiste em um epitélio estratificado queratinizado composto por células chamadas queratinócitos, ancoradas à membrana basal (Figura 8 e Figura 9) (ALONSO & FUCHS, 2003). Ao longo da evolução, este tecido desempenhou papel importante na conquista do ambiente terrestre, uma vez que este houve especialização para defender o organismo de insultos externo (PROKSCH, 2008). No entanto, diferentemente da epiderme, nem todos os tecidos epiteliais estratificados são queratinizados. Estes não queratinizados revestem a superfície interna do corpo, incluindo esôfago, cavidade oral e trato anogenital, e não estão submetidos ao mesmo grau de trauma mecânico que a pele (MCLEAN & IRVINE, 2007) (Figura 8).



Figura 8 - Estrutura do epitélio estratificado (A) queratinizado e (B) não-queratinizado



Legenda: Representação ilustrando diferença entre epitélio queratinizado, a exemplo da pele, e epitélio não-queratinizado, a exemplo do epitélio esofágico. Em epitélio não-queratinizado não observamos presença de camada córnea, assim como ausência de camada granular.

Fonte: Modificado de Presland & Jurevic, 2002.

A epiderme está organizada em quatro diferentes camadas celulares, camada basal, espinosa, granular e a córnea (Figuras 8 e 9). Apenas os queratinócitos da camada basal são capazes de se dividirem e se apresentam com perfil não diferenciado. Ao passo que se tornam comprometidos com o processo de diferenciação, estes cessam a divisão celular e são deslocados em direção ao estrato córneo, composto por células anucleadas que são constantemente liberadas no meio ambiente. Este processo acontece, pois conforme as células ancoradas na membrana basal se dividem de forma assimétrica, esta população de células se expande e algumas destas se desprendem da camada basal e são deslocadas em direção à superfície da pele, as quais passam por mudanças fenotípicas características de diferentes estágios de maturação e camadas epiteliais, a fim de completar o processo de queratinização. A primeira mudança é o enrijecimento da rede de filamentos intermediários (FI) de queratinas presentes nestas células, e isto se deve à síntese de novos conjuntos de queratinas, as quais se agregam aos filamentos já existentes, formando cabos que se ancoram aos desmossomos, a fim de distribuir tensão em todo tecido e não somente à unidade celular (FUCHS & CLEVELAND, 1998). Conforme o conjunto de células que se desprenderam da camada basal se move pelas camadas do epitélio se diferenciando, proteínas são depositadas formando uma rede sob a membrana celular, a fim de formar o

envelope córneo. Estas células também produzem grânulos lamelares de lipídios, os quais são distribuídos de forma a impermeabilizar a pele e impedir perda de fluidos desreguladamente (KALININ, KAJAVA & STEINNERT, 2002; ALONSO & FUCHS, 2003). Após produção de todos os componentes necessários ao longo do processo de diferenciação epidermal, a célula cessa suas atividades metabólicas e transcricionais e entram em processo de morte celular, descamando da superfície da pele (ALONSO & FUCHS, 2003; CANDI, 2005; KYPRIOTOU, HUBER & HOHL, 2012).

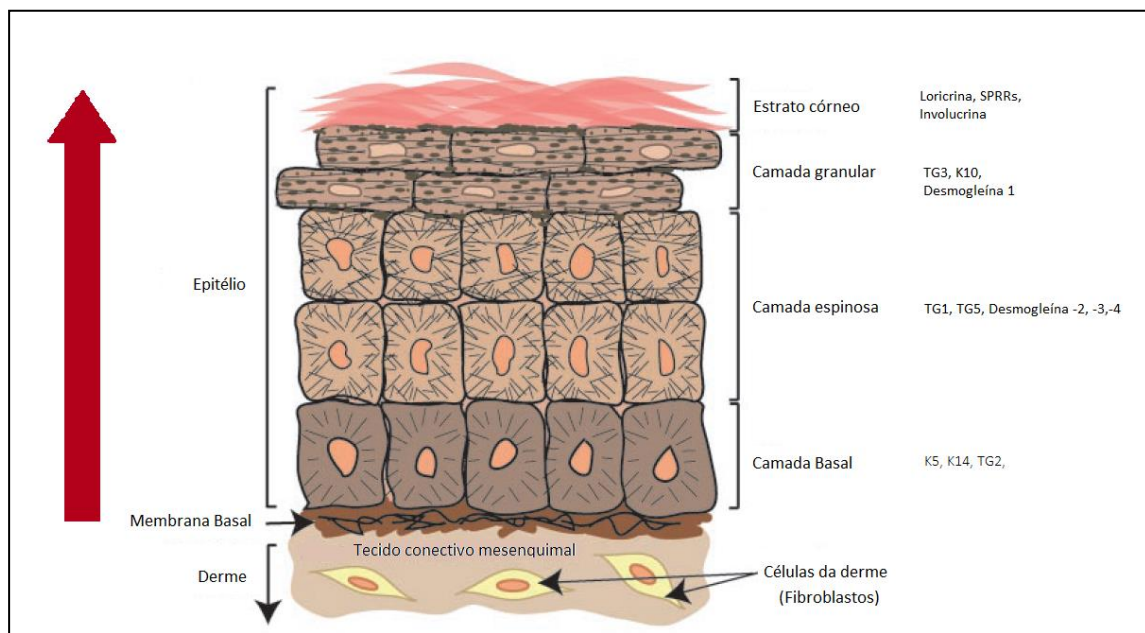
Ao longo do processo de diferenciação epidermal, pode-se identificar diferentes estágios caracterizados pela expressão de diferentes proteínas (CANDI, 2005), como as citoqueratinas, que são proteínas predominantes do citoesqueleto em todos os epitélios. Essas proteínas se reúnem em pares específicos, dependendo do tipo de célula e do estágio da diferenciação, para compor filamentos que se estendem do núcleo até a membrana, a fim de formar estruturas que suportam estresse e mantêm o formato e a viabilidade celular (STEINERT, 2001). A maioria dos epitélios expressam o par de queratinas 5 e 14 (CK5/14) na camada basal proliferativa, enquanto nas camadas suprabasais, em que se encontram células pós-mitóticas e em processo de diferenciação, há expressão de outros pares, como o par de queratinas 1 e 10 (CK1/10) (BRAGULLA & HOMBERGER, 2009).

Em paralelo à expressão das citoqueratinas, ocorre síntese de outras proteínas. Em estágios avançados da diferenciação epitelial, as células adquirem grânulos querato-hialinos com profilagrina, precursor da filagrina, proteína que é responsável pela agregação de filamentos de queratina. Essa agregação é importante, pois promove um colapso da célula em uma forma mais achatada característica das camadas superficiais e inicia o processo de cornificação com a síntese de diferentes proteínas (CANDI, SCHMIDT & MELINO, 2005). Entre elas estão a loricrina, involucrina, as proteínas pequenas ricas em prolina (*small proline-rich protein* - SPRR) e as LEPs (*late envelope proteins*) (KALININ *et al.*, 2001; MARSHALL *et al.*, 2001). Estas proteínas unem-se por meio de ligações dissulfeto e isopeptídicas, catalisadas por proteínas transglutaminases dependentes de cálcio resultando num complexo proteico insolúvel (envelope córneo) (STEINERT & MARCKOV, 1995) (Figura 8). Os genes que codificam as proteínas exclusivas do envelope córneo (loricrina, involucrina, SPRRs e LEPs) possuem uma organização



similar e estão mapeados em uma região cromossômica conhecida como “complexo de diferenciação epidermal” (EDC-*epidermal differentiation complex*) (Figura 9) (MISCHKE *et al.*, 1996; MARTIN *et al.*, 2004). A estrutura destas proteínas possui semelhanças, como o alto conteúdo de lisina e glutamina. Por conta disto, Backendorf & Kohl sugeriram em trabalho publicado em 1992 que este grupo gênico evoluiu de um único gene ancestral comum após várias duplicações.

Figura 9 - Camadas do tecido epitelial estratificado e as diferentes proteínas expressas em cada uma delas ao longo da diferenciação epitelial



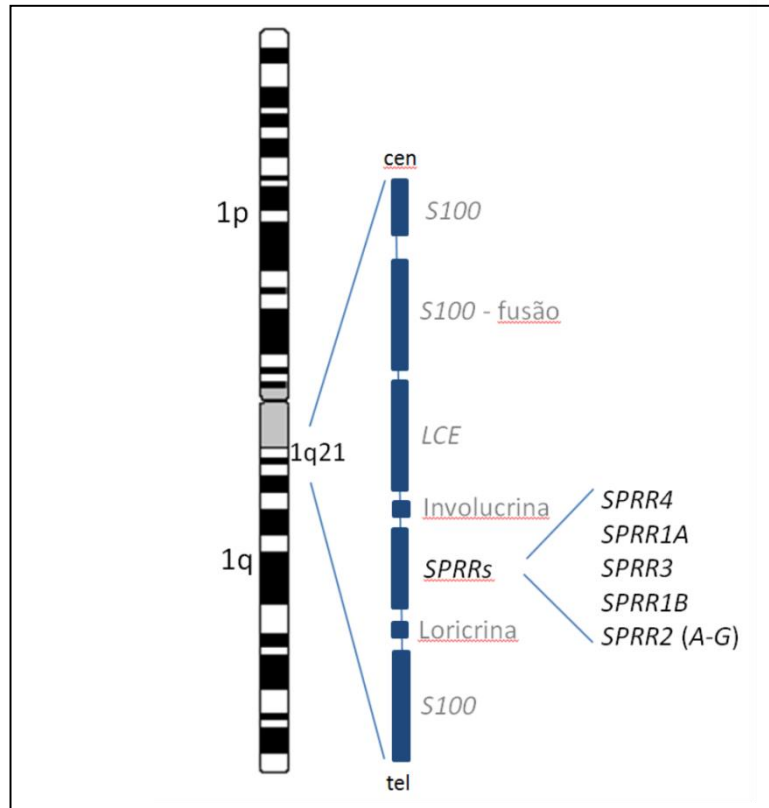
Legenda: A seta indica deslocamento das células ao longo da diferenciação epitelial. K= Citoqueratina, TG= Transglutaminase, SPRR= Proteínas Pequenas Ricas em Prolina.  
Fonte: Modificado de Candi, Schmidt & Melino, 2005.

### Esofagina (SPRR3)

Esofagina ou SPRR3 (*small proline-rich protein 3*) é membro da família das proteínas pequenas ricas em prolina (SPRR), que compreende uma subclasse de proteínas precursoras do envelope córneo, codificadas por uma família multigênica mapeada no complexo de diferenciação epidermal (EDC) no cromossomo humano 1q21 (GIBBS *et al.*, 1993) (Figura 10). A família SPRR compreende onze membros, são eles: dois genes *SPRR1* (A e B), sendo que o *SPRR1A* possui duas isoformas; seis genes *SPRR2* (A, B, D, E, F e G); um gene *SPRR3* com duas isoformas; e um *SPRR4*, além de um pseudogene *SPRR2* (GIBBS *et al.*, 1993; FISCHER & BACKENDORF, 2007). Embora existam duas isoformas para o gene *SPRR3*, os

produtos proteicos gerados são idênticos; o mesmo é válido para as duas isoformas de *SPRR1A* (GIBBS *et al.*, 1993; DE HELLER-MILEV *et al.*, 2000;).

Figura 10 - Representação esquemática da região gênica EDC no cromossomo 1 (1q21)



Legenda: Ilustração representativa da região do EDC, contendo a família *SPRR* e outros genes importantes para o processo de diferenciação epitelial.

Fonte: Modificado de De Heller – Milev *et al.*, 2000.

*SPRR* é uma família, como já dito anteriormente, associada à diferenciação epitelial e expressão restrita às células mais diferenciadas. Já foi visto que a ativação destes genes pode ser modulada *in vitro* por fatores indutores de diferenciação como forbol, retinóides, monofostado de adenosina (AMP) cíclico e interferon  $\gamma$  (CANDI, 2005). Também já foi observada em seus promotores a presença de sítios de ligação para OCT-11, ETs, AP-1, ATF, ISRE, TER, além de elementos GC Box que podem atuar como sítios para ligação de diferentes fatores de transcrição (FISCHER *et al.*, 1996; SARK *et al.*, 1998; FISCHER *et al.*, 1999; REDDY *et al.*, 2003). Fischer e colaboradores em 2007 observaram a presença de elementos responsivos a cálcio no promotor de *SPRR3*, o que reforça a ideia de que estes íons possuem papel na regulação da expressão deste gene, por conseguinte,

na diferenciação de queratinócitos. Além destes fatores, mecanismos epigenéticos podem influenciar a expressão de *SPRR3*, como foi sugerido por trabalho publicado por Sen e colaboradores em 2010. Neste trabalho foi visto que DNMT1 (DNA metiltransferase 1), enzima que possui papel crucial no mecanismo de metilação do DNA, desempenha importante papel na manutenção do estado proliferativo das células epiteliais. Após a supressão de sua expressão, foi observada a entrada precoce de células no processo de diferenciação tecidual com conseguinte aumento de expressão de *SPRR3* (SEN *et al.*, 2010). Este estudo sugeriu um relevante papel da metilação do DNA na regulação da expressão de *SPRR3*.

Segundo o banco de dados UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>), existem sequências tag (*Expressed Sequence Tags* - ESTs) expressas para *SPRR3* em diferentes sítios anatômicos, especialmente em sítios do trato aerodigestivo superior como esôfago, laringe, cavidade oral e faringe, bem como na glândula adrenal, fígado, pulmão, músculo, pâncreas, placenta, próstata e útero. Alguns trabalhos já mostraram expressão gênica e/ou proteica de *SPRR3* em diferentes sítios corporais, como em saliva de neonatos prematuros (MANCONI *et al.*, 2010), em fluído vaginal de mulheres saudáveis (IGOH, DOI & SAKURADA, 2015) e em células do músculo liso vascular (CMLVs) de artérias, mas não em veias (YOUNG *et al.*, 2005). Entretanto, o aumento da expressão de *SPRR3* já foi associado a algumas patologias, como dermatite atópica (ELIAS *et al.*, 2014; LIANG *et al.*, 2015), aterosclerose (SEGEDY *et al.*, 2014), eczema (MARENHOLZ *et al.*, 2011) e esofagite eosinofílica (BLANCHARD *et al.*, 2010).

### **SPRR3 e Câncer**

Alguns autores já investigaram o perfil de expressão da *SPRR3* em diferentes tipos tumorais, como cólon, mama, glioblastoma, dentre outros (CHO *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2014). Já foi observada a expressão diferencial de genes da família *SPRR*, incluindo *SPRR3*, em amostras de pacientes com câncer anal e em linhagem celular deste mesmo tumor, em que foi visto maiores níveis de expressão de *SPRR3* em relação aos outros membros da família avaliados neste estudo (ZUCCHINI *et al.*, 2001). Isto também foi observado em amostras de carcinoma de células escamosas da pele e em lesões precursoras, como papiloma benigno e queratoacantoma (De HELLER-MILEV *et al.*, 2000; KOIZUMI *et al.*, 1996).

Já foi observado em linhagens celulares derivadas de câncer de pulmão de células não pequenas, em um modelo analisando os três estágios de progressão da carcinogênese (imortalização, tumorigênese e metástase), que *SPRR3* poderia exercer um papel pro-oncogênico. Foi identificado alto nível proteico de *SPRR3* na linhagem metastática e após seu silenciamento gênico observou-se a diminuição da migração celular. Já em amostras de pacientes diagnosticados com este tumor, observou-se associação entre a alta expressão de *SPRR3* e pior prognóstico destes pacientes (HU *et al.*, 2016).

Em análise de expressão global de RNAm de câncer colorretal, Kim e colaboradores (2008) destacaram o *SPRR3* dentre outros genes desregulados, por observarem uma associação entre a sua superexpressão e mutações no gene *TP53*. Em posterior estudo do mesmo grupo, foi observado que a superexpressão de *SPRR3* resulta, *in vitro*, no aumento da proliferação das células tumorais de cólon, devido à ativação da via de sinalização de AKT e na ativação da proteína MDM2, culminando em posterior degradação de p53 (Cho *et al.*, 2010).

Em tumores de mama, a superexpressão de *SPRR3* foi observada em tumores em estádios iniciais e está associada à superexpressão de HER2. Neste trabalho, foi demonstrado que *SPRR3* promove a proliferação das células tumorais de mama mediante o aumento da degradação de p53 pelas vias de AKT e MAPK. Sendo, portanto, considerada como um potencial alvo terapêutico para tumores de mama em estádios precoces (KIM *et al.*, 2012).

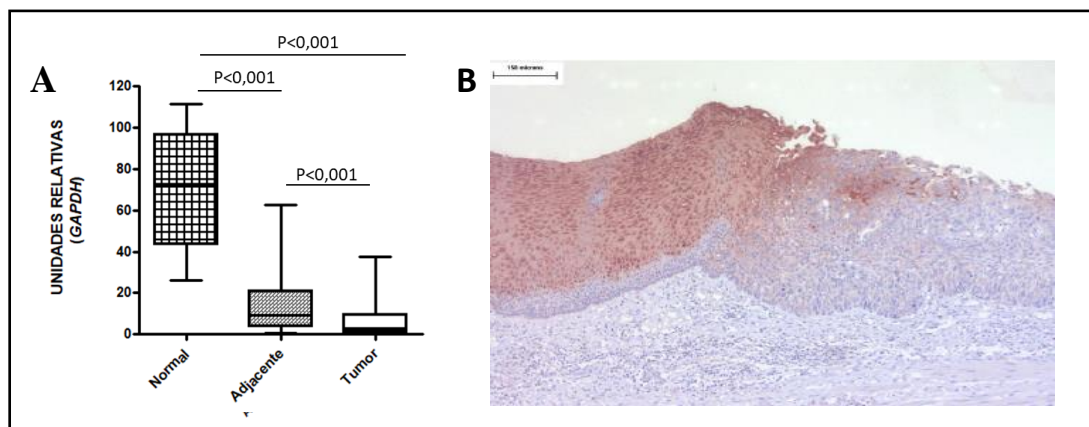
Em câncer de esôfago, diferentemente dos tumores anteriormente citados, *SPRR3* parece desempenhar um papel de supressor tumoral. Já foi descrito que pacientes diagnosticados com CEE ou ADE possuem de maneira geral perda da expressão de *SPRR3* em comparação à mucosa normal, bem como já foi observado um decréscimo da expressão gradual em displasias de alto e baixo grau, e em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago, sugerindo diminuição da expressão prematura na transformação neoplásica (Abraham *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2000; KIMOS *et al.*, 2004). Complementando estes achados, já foi demonstrado que a expressão diferencial de *SPRR3* e *GATA6* pode ser útil em discriminar epitélios provenientes de tecido esofágico normal, de displasia de Barrett e de adenocarcinoma de esôfago (KIMCHI *et al.*, 2005). Igualmente, a diminuição da expressão de *SPRR3*, combinada com perfil de expressão de outros dois genes *PERP* e *S100A1*, foi capaz de distinguir pacientes com CE com diferentes respostas

ao tratamento (resposta patológica completa ou não), podendo este gene ser considerado então, um indicador de resposta clínica (LUTHRA *et al.*, 2006).

Ainda, já foi demonstrado que a indução da expressão de *SPRR3* parece estar envolvida na diminuição da tumorigenicidade e na indução da apoptose em linhagens de CEE (Zhang *et al.*, 2008). Em adição, uma associação entre a superexpressão induzida de *SPRR3* e maior sensibilidade à morte por apoptose induzida por danos ao DNA via perda do potencial de membrana mitocondrial já foi relatada. Um intrigante achado deste trabalho em CEE foi a localização de *SPRR3* na mitocôndria e sua interação com a proteína Bcl-2, o que facilitou a translocação de Bax e liberação do citocromo c (Luo *et al.*, 2013).

Em 2011, trabalho publicado pelo nosso grupo, caracterizou expressão gênica e proteica de *SPRR3* em CEE, tendo sido o primeiro a avaliar quantitativamente a expressão das variantes (*SPRR3-v1* e *SPRR3-v2*) de *SPRR3* e distribuição proteica em amostras de CEE. Foi observado maior nível de expressão de *SPRR3-v1* em mucosa esofágica de indivíduos controle sem neoplasia, com uma perda significativa e gradual de expressão gênica e proteica na mucosa adjacente tumoral e em tumores de pacientes com CEE (Figura 11) (SIMAO *et al.*, 2011).

Figura 11 - Expressão gênica e proteica de *SPRR3* em esôfago humano



Legenda: A: Expressão de *SPRR3-v1* por qPCR, mostrando perda gradual da expressão gênica na mucosa adjacente tumoral e em tumores de pacientes com CEE comparadas ao tecido de indivíduos sem doença. B: Imuno-histoquímica de *SPRR3*. Essa imagem representa a transição entre um epitélio morfologicamente normal (esquerda) e um carcinoma *in situ* de esôfago (direita). Uma clara redução na expressão de *SPRR3* foi observada na área tumoral (barra de escala -150  $\mu$ m).

Fonte: Modificado de Simão *et al.*, 2011.

Apesar de diferentes trabalhos já terem mostrado a redução da expressão de *SPRR3* em CEE, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não foram bem

estabelecidos. Em glioblastoma multiforme, já foi demonstrado que a hipermetilação da região promotora de *SPRR3* está associada à menor expressão gênica (LIU *et al.*, 2014). Além disso, foi mostrado menor nível de metilação em amostras de pacientes diagnosticados com hepatocarcinoma quando comparados a pacientes com cirrose e indivíduos saudáveis (AMMERPOHL *et al.*, 2012; MAYOL *et al.*, 2012). Portanto, estes trabalhos mostraram um possível papel da metilação do DNA, um dos principais mecanismos epigenéticos, na regulação de *SPRR3*, evidenciando a importância da elaboração de estudos acerca deste tema, o que ainda é pouco explorado.

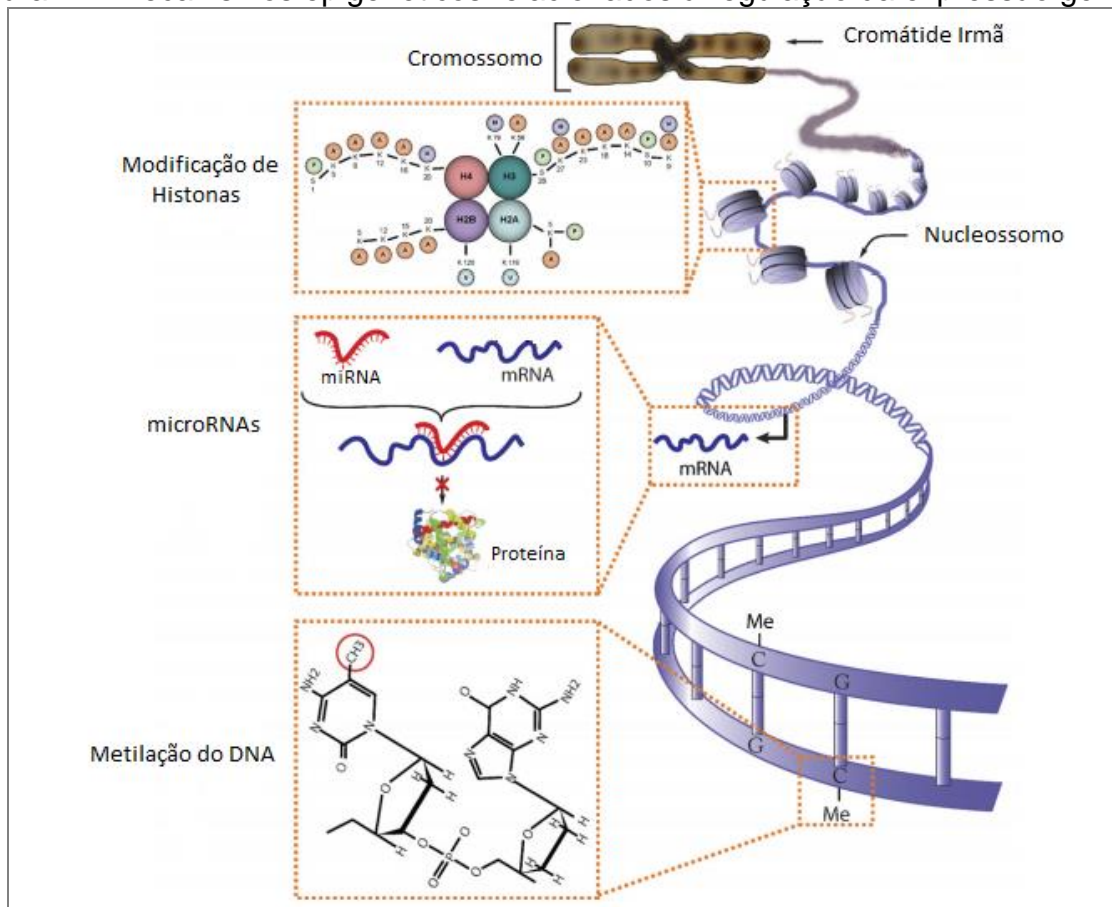
### **Mecanismos Epigenéticos no Controle da Expressão Gênica**

A genética clássica sozinha não é capaz de explicar a diversidade de fenótipos dentro de uma população, tampouco explicar fenótipos distintos e susceptibilidades diferentes a doenças, em gêmeos homocigóticos ou em animais clonados (ESTELLER, 2008). O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddington em 1939 para descrever “as interações causais entre os genes e seus produtos que permitem a expressão fenotípica” (HOLLIDAY, 1987; STERN, 2000). Atualmente o termo é utilizado para as modificações mitótica e/ou meioticamente herdáveis que resultam em alterações da expressão gênica e organização da cromatina, sem, no entanto, alterar a sequência de bases do DNA (WOLFFE & MATZKE, 1999; JAENISCH & BIRD, 2003; HOLLIDAY, 2006).

A herança epigenética representa um mecanismo crucial que permite a propagação estável da atividade gênica ao longo de gerações celulares. É notável sua importância e, portanto, este campo de estudo tem recebido bastante atenção, uma vez que processos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento e processos celulares, tais como transcrição gênica, diferenciação e proteção antiviral. Em adição, mecanismos epigenéticos são versáteis e adaptados a específicas funções celulares, não apenas durante o desenvolvimento do organismo, mas ao longo de toda sua vida. Consistente com a grande importância relacionada a estes mecanismos, desregulação nestes está intimamente relacionada a doenças humanas, destacando-se o câncer (SAWAN *et al.*, 2008).

Existem três mecanismos epigenéticos conhecidos que levam à regulação da expressão gênica que são: RNAs não codificante, modificações de histonas e metilação do DNA que é o mecanismo mais bem estudado dentre os três citados (HERCEG, Z, 2007; SAWAN, VAISSIÈRE & HERCEG, 2008) (Figura 12). No entanto, diferentes mecanismos epigenéticos estão intimamente relacionados, atuando de forma conjunta na regulação de diversos processos celulares.

Figura 12 - Mecanismos epigenéticos relacionados à regulação da expressão gênica



Legenda: Modificações de histonas, silenciamento gênico mediado por RNAs e metilação do DNA constituem os principais mecanismos epigenéticos regulatórios.

Fonte: Modificado de SAWAN *et al.* 2008.

## RNAs Não-Codificantes

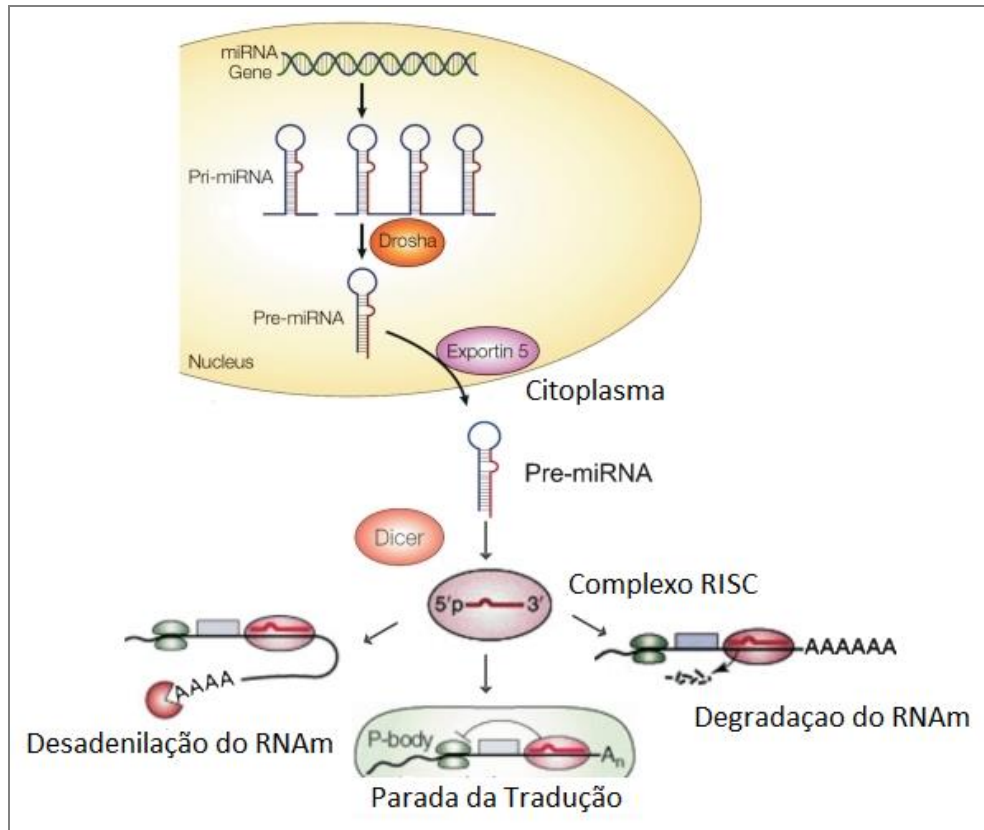
Desde a última década, tem se discutido muito sobre o papel funcional das moléculas de RNA que vai além de seu papel tradicional como mensageiros do DNA. Diferentes classes de RNAs, como os longos RNAs não codificantes (lncRNA - *long non-coding RNA*, transcritos com mais de 200 nucleotídeos) e os pequenos

RNAs (sRNA – *small RNA*, transcritos com menos de 200 nucleotídeos), atuam na regulação da expressão gênica, na manutenção da estabilidade genômica, defesa contra elementos genéticos exógenos, entre outras funções (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).

A classe de ncRNAs mais estudada são os microRNAs (BHARTIYA & SCARIA, 2016; LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2012). Estes são pequenos RNAs regulatórios, transcritos a partir de sequências codificantes e não codificantes (MOLNAR *et al.*, 2008). Possuem tamanho aproximado de 20 nucleotídeos, e regulam negativamente a expressão proteica mediante sua ligação ao RNAm, resultando assim, na clivagem direta ou a inibição da tradução, conforme o pareamento estabelecido (HUMPHRIES; WANG; YANG, 2016) (Figura 13).



Figura 13 - Biogênese dos miRNAs e mecanismos de regulação pós-transcricionais



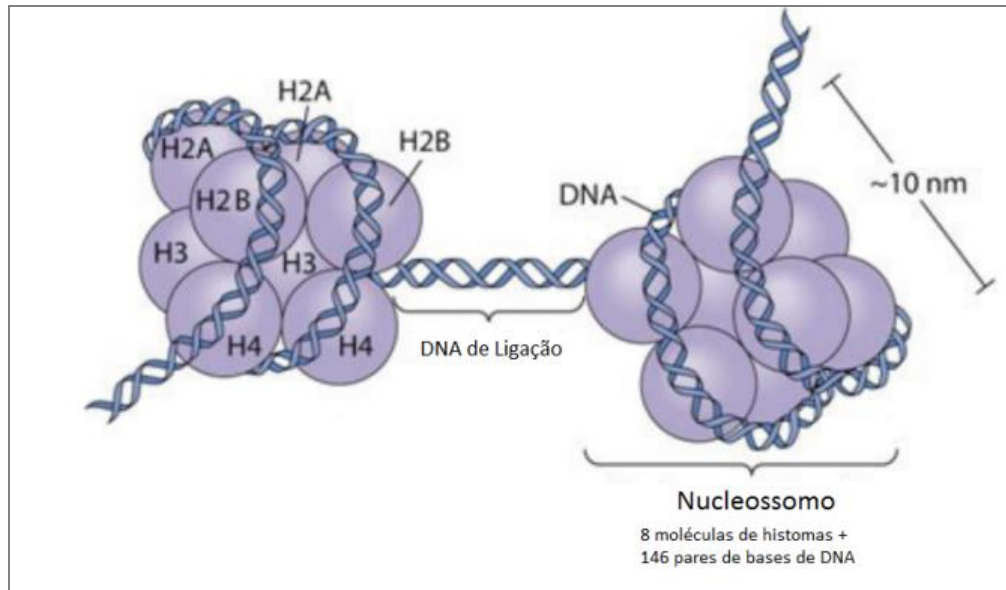
Legenda: A RNA Polimerase II (PolII) produz um transcrito que varia de tamanho de 500 a 3000 nucleotídeos, chamado RNA primário (pri-RNA). Este é então editado a fim de formar uma estrutura *hairpin* pré-RNA por um complexo multi-protéico que inclui a enzima Drosha. A estrutura *hairpin* dupla fita formada é exportada para fora do núcleo pelo complexo RAN GTPase e Exportina 5 (XPO5). Por fim, este pré-RNA é clivado pela enzima DICER1 a fim de produzir miRNA dupla fita (miRNA maduro), com aproximadamente 20 nucleotídeos de tamanho, que posteriormente, são separadas e uma das fitas é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-inducing silencing complex* – RISC). O complexo RISC/miRNA se liga à sequência alvo no RNAm resultando na clivagem ou desadenilação do ácido nucleico ou à repressão da tradução. AA-cauda poli-A; m7G – cap 7-metilguanossina; ORF – open reading frame.

Fonte: Modificado de MUHONEN & HOLTFOFER, 2009.

## Modificações em Histonas

As histonas são os principais componentes proteicos da cromatina. As histonas centrais - H2A, H2B, H3 e H4 – compõem os nucleossomos. Cada nucleossomo é circundado por cerca de 146 pares de bases de DNA enroladas ao redor de um octâmero de histonas e estão conectados por um DNA de ligação (DNA *linker*), que é o segmento do DNA genômico (ESTELLER, 2008; LUGER *et al.*, 1997) (Figura 14). Ainda há a histona H1 que não compõe o octâmero, mas tem função de fixação do nucleossomo (GRIGORYEV, 2012).

Figura 14 - Octâmero de histonas e nucleossomo



Fonte: Modificado de Pearson Education.

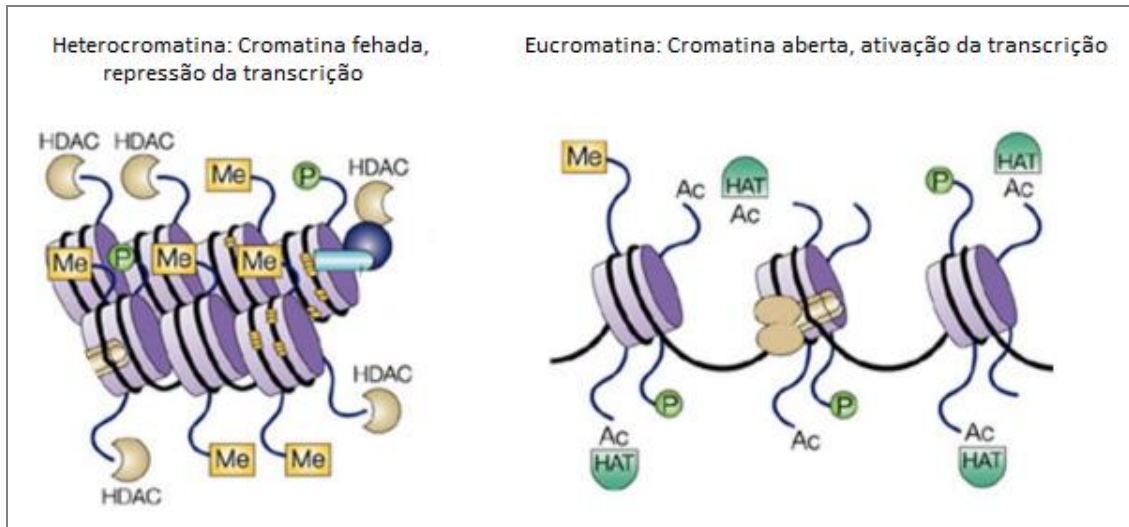
As histonas são proteínas responsáveis pelo empacotamento do DNA no núcleo das células. Porém as histonas não são simplesmente proteínas empacotadoras do DNA, mas sim, estruturas que participam na regulação da expressão gênica e armazenam a informação epigenética através de modificações pós-transducionais, como acetilação de resíduos de lisinas, metilação de resíduos de argininas e lisinas, e fosforilação de resíduos de serinas (JENUWEIN & ALLIS, 2001). Estas modificações envolvem alterações da carga positiva das histonas que provocam perda de afinidade do octâmero pela cromatina, culminando no afrouxamento da cromatina para subsequente ligação dos fatores de transcrição e regulação gênica (BOWMAN, 2010) (Figura 15). De maneira geral, elas afetam a transcrição gênica e o reparo do DNA. Logo, foi proposto que estas diferentes modificações compõem o que foi chamado de “Código das Histonas” (JENUWEIN & ALLIS, 2001).

As modificações influenciam o perfil conformacional da cromatina conforme a alteração ocorrida, por exemplo: a acetilação e metilação das histonas têm efeito direto em diversos processos celulares, incluindo transcrição gênica, reparo do DNA, replicação do DNA e organização dos cromossomos (ESTELLER, 2008). Geralmente, acetilação das histonas está associada com ativação transcricional, enquanto que o efeito da metilação depende de qual aminoácido e sua posição na cauda da histona (BERNSTEIN, MEISSNER & LANDER, 2007).

A acetilação das histonas é a modificação em histona mais bem estudada, é um mecanismo reversível realizado pelas histonas acetil-transferases (HATs), enquanto que a desacetilação de histonas é catalisada pelas enzimas histona desacetilases (HDACs), que em geral, atuam como coativadores e corepressores transcricionais, respectivamente (VAISSIÈRE, SAWAN & HERCEG, 2008; 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 há 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 configuração de eucromatina. Esta conformação da cromatina é mais acessível e está geralmente associada à transcrição gênica (BERNSTEIN, MEISSNER & LANDER, 2007). Além disto, a acetilação também participa da modulação da expressão gênica afetando a interação de proteínas reguladoras da transcrição ao DNA alvo (VAISSIÈRE, SAWAN & HERCEG, 2008; CAIRNS, 2001).

Outra modificação de histonas bem estudada é a metilação, como por exemplo, a metilação de arginina e de resíduos de lisinas. Este metilação é catalisada pelas enzimas histonas metiltransferases (HMT) e o este processo está envolvido na regulação de uma extensa variedade de atividades gênicas e da estrutura da cromatina. Em geral, a metilação das lisinas H3K9, H3k27 e H4K20 está associada ao silenciamento, enquanto que a metilação das lisinas H3K4, H3k36 e H3K79 está associada com ativação da transcrição genica (MULERO-NAVARRO & ESTELLER, 2008).

Figura 15 - Interação de modificações nas caudas de histonas e efeitos na cromatina



Legenda: A desacetilação promovida pelas HDACs resulta numa conformação de heterocromatina, uma vez que as histonas retomam sua carga positiva, o que permite forte interação com DNA que é negativamente carregado. 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. HDAC = Histona desacetilases; HAT = Histona Acetiltransferase; Ac = Radical Acetil; Me = Radical Metil; P = Fosfato.

Fonte: Adaptado de JOHNSTONE, 2002.

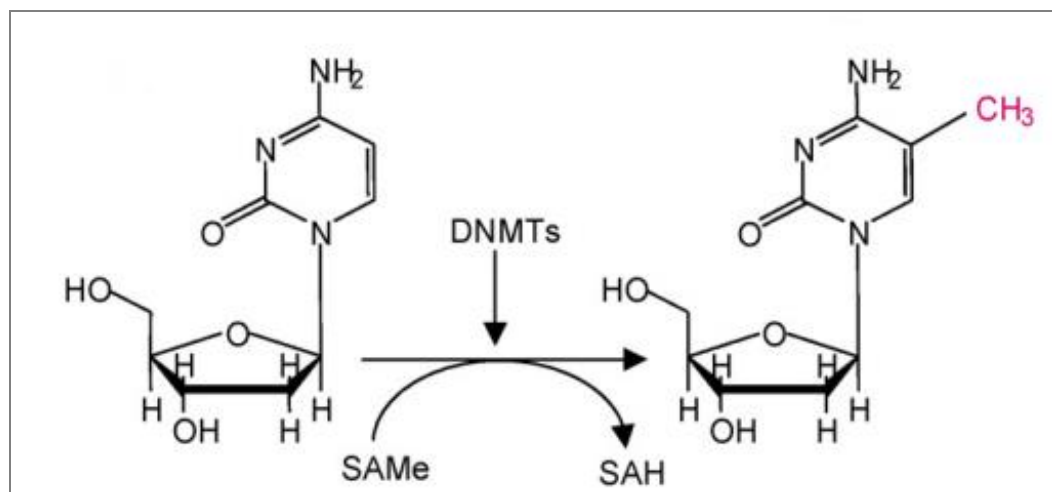
## Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo chave na formação e manutenção da estrutura da cromatina e está envolvido em processos importantes como a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico, além de atuar de forma crítica na manutenção da homeostase celular e na regulação da transcrição (BIRD, 2002; HERCEG, 2007; ESTELLER, 2008). Portanto, um padrão de metilação do DNA aberrante, tem sido relacionado ao desenvolvimento de uma série de doenças, incluindo o câncer (FEINBERG & TYCKO, 2004; ESTELLER, 2008).

A metilação do DNA é realizada pela ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) que adicionam um grupamento metil (-CH<sub>3</sub>), proveniente de uma S-adenosil metionina (SAM), ao carbono 5 da citosina seguida por uma guanina, chamados de dinucleotídeos CpG (Figura 16) (LEWANDOWSKA & BARTOSZEK, 2011) dando origem a 5-metilcitosina (5mC), sendo por muitos considerada a quinta base do DNA, (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2008). A metilação dessa base desempenha importantes atividades no estabelecimento dos padrões epigenéticos e sua relevância em algumas desordens humanas, como o

câncer (HEYN & ESTELLER, 2012). Os dinucleotídeos CpG estão, em grande parte, localmente enriquecidos em sequências do DNA conhecidas como ilhas CpG (BIRD, 2002). Estas estão frequentemente associadas às regiões de controle da expressão gênica, como a região promotora de um gene e estimou-se que 60% dos genes humanos contenham ilhas CpGs (ANTEQUERA & BIRD, 1993). Os dinucleotídeos CpG também são encontrados em sequências repetitivas, chamadas SINEs e LINEs (*short interspersed nuclear elements* e *long interspersed nuclear elements*), que em células normais, apresentam-se metiladas, impedindo assim, a expressão de retrotransposons e promovendo a estabilidade do genoma (BESTOR, 2000; REIK, 2007; LOPEZ *et al*, 2009).

Figura 16 - Metilação do DNA



Legenda: A metilação do DNA em mamíferos ocorre quase que exclusivamente em resíduos de citosina contidas em dinucleotídeos CpG. O padrão de metilação é copiado e mantido durante a replicação do DNA em um processo catalisado pelas DNA metiltransferases (DNMTs). As DNMTs utilizam S-adenosil-L-metionina (SAMe) como fonte de grupamentos metil, gerando S-adenosil homocisteína (SAH). As DNMTs catalizam a adição dos grupamentos metil no carbono 5.

Fonte: Modificado de ESPADA & ESTELLER, 2010.

A família das DNMTs é composta por 5 membros: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L (BESTOR, 2000; PRADHAN & ESTEVE, 2003). DNMT1 foi a primeira a ser descrita por Bestor e colaboradores em 1988. É amplamente expressa e age durante a replicação, tendo a função de manutenção do padrão de metilação do DNA durante as divisões celulares, através da adição de grupamentos metil às fitas de DNA recém-sintetizadas nos sítios CpG hemimetilados (GUIBERT & WEBER, 2013). Apesar de um estudo publicado em 1996 ter mostrado

que fibroblastos com superexpressão de DNMT1 apresentaram aumento da metilação de novo, indicando que esta enzima também é capaz de realizar esse tipo de metilação (VERTINO *et al*, 1996), a DNMT1 tem preferência 10-40 vezes maior por dinucleotídeos hemimetilados (BESTOR, 1992; PRADHAN S *et al*, 1999).

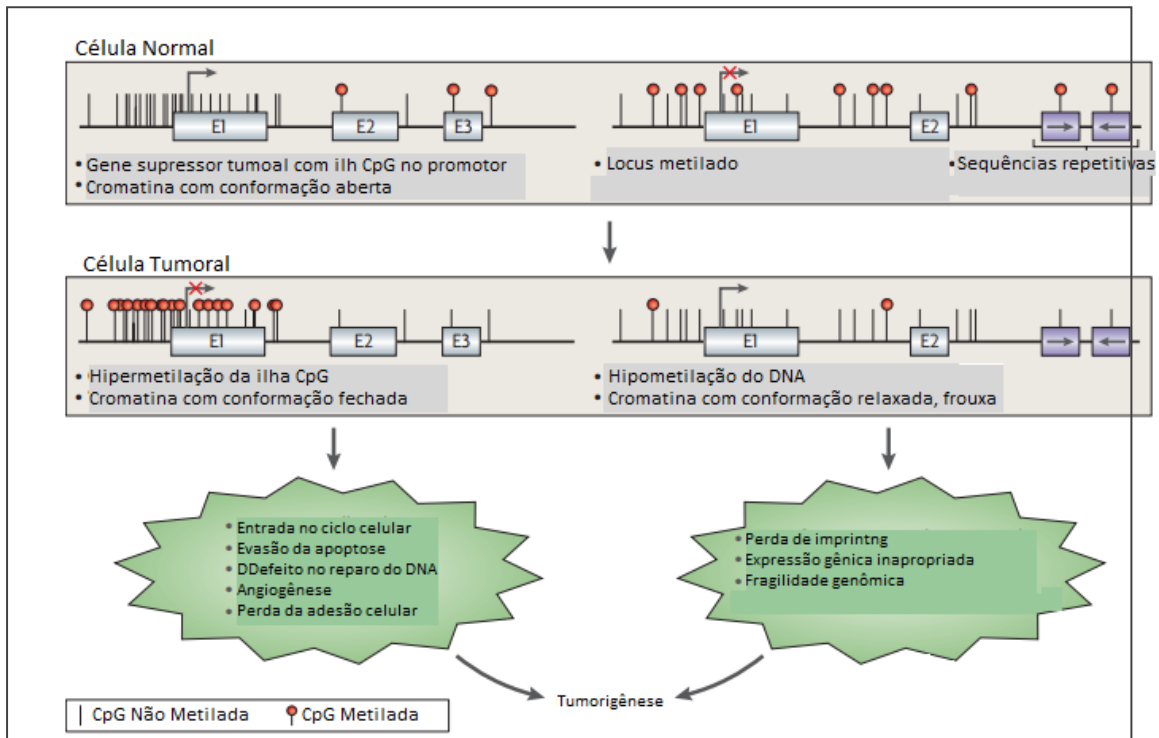
Outro membro identificado por homologia de sequência foi chamado DNMT2, no entanto, posteriormente, foi identificada sua função na metilação de RNA ao invés de DNA e é atualmente descrita como TRDMT1 (*tRNA-aspartic acid methyltransferase 1*) (GOLL *et al.*, 2006). É uma proteína altamente conservada em muitas espécies e que compartilha características estruturais e de sequência com a família das DNA metiltransferases, exceto por uma fenda que, acredita-se ser a ligação com o ácido nucleico, mas que não se liga facilmente ao DNA dupla fita (GOLL & BESTOR, 2005).

As DNA metiltransferases de classe três (DNMT3A, DNMT3B) são responsáveis por estabelecer a metilação *de novo*, ou seja, adicionam grupamentos metil a dinucleotídeos CpG do DNA sem a necessidade de uma fita-molde metilada (LUCZAK *et al*, 2006). Estas são altamente expressas em células embrionárias precoces, fase em que ocorre a maioria dos eventos programados de metilação *de novo*, e estão reguladas negativamente após a diferenciação em tecidos somáticos adultos. Entretanto, a DNMT3L, devido à falta de um aminoácido essencial para a atividade catalítica, não possui capacidade de metilação; porém, atua como um cofator para as enzimas DNMT3A e B (MÜLLER *et al.*, 2015; GUIBERT & WEBER, 2013; GOLL *et al.*, 2006).

Em diversos tumores, observa-se um padrão de hipometilação a nível global do genoma, incluindo elementos transponíveis como SINE e LINE, o que leva ao aumento da instabilidade genômica, predispondo o indivíduo a mutações, deleções, ampliações, inversões e translocações. A hipometilação do DNA pode também resultar na ativação de genes normalmente silenciados, ativando vias relacionadas a proliferação celular e escape da apoptose (EHRlich, 2002; ISSA, 2008).

Outra alteração observada é a hipermetilação de genes supressores tumorais (ESTELLER, 2008). Cerca de 3 a 6% de todas as citosinas do genoma são metiladas em humanos, e em câncer, a hipermetilação é uma marcação epigenética chave para o processo de tumorigênese, contribuindo com o desenvolvimento de todos os típicos *hallmark* do câncer que resultam na inativação de genes supressores tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 200) (Figura 17).

Figura 17 - Padrões de metilação alterados na tumorigênese



Legenda: A hipermetilação de ilhas CpG em genes supressores tumorais é considerada uma alteração comum em células transformadas e resulta na inativação transcricional destes genes e a perda de suas funções normais. Este mecanismo epigenético contribui para aquisição de muitos dos *hallmarks* do câncer. Simultaneamente, o genoma da célula tumoral passa por uma hipometilação global em sequências repetitivas, genes *imprinting* e em genes tecido-específicos. Em alguns casos, esta hipometilação é conhecida por contribuir para o ganho do fenótipo tumoral, como perda de *imprinting* e ganho de instabilidade genômica. E, exon.

Fonte: Modificado de ESTELLER, 2007.

O silenciamento gênico promovido por metilação é potencialmente reversível, tornando-se assim um potencial alvo terapêutico (KWA *et al.*, 2011). Há quase 50 anos, foram desenvolvidos dois análogos de citidina que inicialmente foram utilizados no combate a células tumorais (SORM *et al.*, 1964), mas que posteriormente descobriu-se que eram úteis para promover queda nos níveis de metilação global do DNA (JONES & TAYLOR, 1980). São eles: 5-azacitidina e 5-aza-2'-deoxicidina (decitabina) (Figura 18). Pelo seu papel em inibir a metilação do DNA são utilizados em estudos sobre o papel da metilação na regulação da expressão gênica (NERVI, DE MARINS & CODACCI-PISANELLI, 2015). Durante a replicação do dna, os análogos de citidinas são incorporados a nova fita, uma vez que são reconhecidos pelas DNMTs como substratos. No entanto, ao serem reconhecidos, estes análogos estabelecem uma ligação covalente irreversível com



as DNMTs, impedindo assim a função destas e resultando numa queda de metilação global do DNA sintetizado (SZYF, 2009; STRESEMANN & LYKO, 2008).

Figura 18 - Análogos de citidinas usados em estudos de regulação por metilação



Fonte: Modificado de NERVI, DE MARINS & CODACCI-PISANELLI, 2015.

Como dito anteriormente, poucos trabalhos mostram mecanismos relacionados à regulação da expressão de *SPRR3*. Portanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais há o decréscimo gradual da expressão de *SPRR3* durante a tumorigênese esofágica. Logo, é possível sugerir que a perda prematura desta proteína desempenhe papel na transformação neoplásica (Simão *et al.*, 2011). Ao considerarmos a alta agressividade característica do carcinoma epidermoide de esôfago, faz-se necessário entender os possíveis mecanismos pelos quais células normais adquirem alterações que facilitem a tumorigênese esofágica. A utilização da *SPRR3* como marcador de perda de diferenciação no epitélio esofágico pode tornar possível a detecção de tumores em estágios iniciais de desenvolvimento facilitando o tratamento da doença e o entendimento de sua contribuição para o mecanismo de carcinogênese esofágica pode gerar potenciais alvos terapêuticos. Neste sentido, este estudo foi desenvolvido a fim de conhecermos melhor os mecanismos por trás deste fenômeno.



## 1. OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis mecanismos envolvidos na regulação da expressão de *SPRR3* no carcinoma epidermoide de esôfago (CEE).

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil de expressão gênica de *SPRR3* em linhagens celulares de CEE, bem como em amostras pareadas de mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral de pacientes com CEE;
- b) Avaliar o perfil de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em amostras pareadas de mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral de pacientes diagnosticados com CEE;
- c) Avaliar o perfil de metilação de DNA de *SPRR3* em linhagens celulares de CEE tratadas ou não com agente demetilante, bem como em amostras pareadas de mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral de pacientes com CEE;
- d) Correlacionar as possíveis alterações de metilação com expressão dos genes *SPRR3* e *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes com CEE;
- e) Correlacionar o perfil de metilação e expressão gênica de *SPRR3* em linhagem celular de esôfago após tratamento com o agente demetilante;
- f) Avaliar o perfil de expressão e de metilação de *SPRR3* com os dados clínico-patológicos dos pacientes com CEE;
- g) Avaliar, por meio de análises *in silico*, possível associação de microRNAs na regulação da expressão de *SPRR3* em CEE;
- h) Avaliar, por meio de análises *in silico*, possível associação de fatores de transcrição na regulação da expressão de *SPRR3* em CEE;

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras de Pacientes

#### 2.1.1 Amostras Recém-Obtidas

O estudo inclui amostras cirúrgicas ou de biópsias de carcinoma epidermoide de esôfago e sua mucosa adjacente criopreservadas em RNA later, coletadas no Instituto Nacional de Câncer – INCA e armazenadas no Banco Nacional de Tumores – BNT. Os dados sócio-demográficos destes indivíduos foram obtidos a partir de questionário padronizado pelo grupo, colhidos no ato da coleta das biópsias. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa pelo número 116/11 (INCA).

#### 2.1.2 Extração do RNA

As amostras recém-obtidas de CEE e tecido normal adjacente foram processadas no Banco Nacional de Tumores (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 até sua utilização.

Um fragmento da biópsia de até 30 mg foi colocado em um microtubo de 1,5 mL junto com 200 µL do tampão RLT com beta-mercaptoetanol. Após macerar o tecido, foram adicionados mais 400 µL do tampão RLT e posteriormente foram centrifugados em microcentrífuga por 3 min à velocidade de 12.000 x g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 volume de etanol 70% foi adicionado. Após homogeneização, 700 µL da solução foram transferidas para uma coluna de purificação alocada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 15 s a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e o procedimento foi repetido até passar toda a solução pela coluna. Em seguida, 700 µL do tampão RW1

foram adicionados à coluna de purificação e centrifugados por 15 s a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e 500 µL do tampão RPE foram adicionados à coluna de purificação e, posteriormente, centrifugados por 2 min a 8.000 x g. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 1 min a 12.000 x g. Após essa centrifugação, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 30 µL de água livre de RNase foram adicionados no centro da membrana sem encostar a ponteira na mesma a fim de eluir o RNA total. Após 1 minuto à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por mais 1 min a 8.000 x g. A coluna foi descartada e posteriormente os tubos contendo o RNA total extraído foram armazenados à -80°C.

### 2.1.3 Quantificação do 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 absorvância em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, 1 µL de RNA total foi pipetado no leitor do aparelho. O aparelho calcula 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.

### 2.1.4 Reação de Transcriptase Reversa

A fim de analisarmos a expressão gênica por PCR (reação em cadeia de polimerase) quantitativo, foi realizada a conversão da fita simples de RNAm em fita dupla de DNA complementar (cDNA). A síntese de DNA complementar (cDNA) foi feita através da reação de transcrição reversa (RT), na qual o 500 ng de RNA total

extraído, foi incubado com a enzima transcriptase reversa SuperScript II® (Invitrogen, Estados Unidos). Posteriormente, 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 20 por 5 min 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. Logo 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 é feita incubando a reação a 70°C por 15 min. Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C até sua utilização.

#### 2.1.5 Reação Em Cadeia Da Polimerase Quantitativa (qPCR)

A técnica de PCR em tempo real foi utilizada para analisar a expressão dos RNAm correspondentes aos genes *SPRR3*, *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*. O *GAPDH* foi usado como *housekeeping* gene (ou gene de referência). As sequências dos oligonucleotídeos específicos para amplificação de segmento de cada gene e as demais informações sobre a reação de PCR em tempo real encontram-se na Tabela 1.

As reações foram realizadas na plataforma Rotor-gene (Qiagen). Em cada reação foi adicionado 5 µL de tampão *SYBR green FAST 2x* (Qiagen), 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos específicos da reação a 10 µM, 1 µL de cDNA diluídos 1:20 e 3,4 µL de água livre de nuclease. . A ciclagem consistiu de uma incubação a 95°C por 5 min, seguida de 40 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 (Curva de Melt) a fim de verificar a formação de produtos inespecíficos, formação de estruturas secundárias e contaminação na reação. Para a quantificação dos resultados e determinação da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene (Tabela 1) foi estabelecido uma curva padrão de expressão utilizando uma diluição seriada de cDNA de um controle positivo da reação.

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores as reações de qPCR

Gene	Identificação	Sentido	Sequência (5' - 3')	Produto Amplificado
<i>SPRR3</i>	NC_000001.11	Senso	CTC AGC TTC AAC AGC AGC AG	
		Anti-senso	TTG TGT TTC CAG GTT GTG GA	
<i>DNMT1</i>	NM_001379	Senso	AAC TCC AAG ACC CAC CCT CC	151 pb
		Anti-senso	CAG ACT CGT TGG CAT CAA AGA T	
<i>DNMT3A</i>	NM_175629	Senso	CAG AAG CGG GCA AAG AAC AGA	134 pb
		Anti-senso	CTG GAA GGT GAG CCT CGG CA	
<i>DNMT3B</i>	NM_006892	Senso	ATC AGG ATG GGA AGG AGT TT	163 pb
		Anti-senso	TCG GAG AAC TTG CCA TCG CC	
<i>GAPDH</i>	NM_002046	Senso	CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG CAA	124 pb
		Anti-senso	AGT GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT	

A quantificação relativa ao controle interno, *GAPDH*, de cada gene, foi possível pelo método de  $\Delta C_t$ . Um gráfico de amplificação, cujo eixo Y era o sinal de fluorescência e o eixo X era o número de ciclos, foi desenhado. No primeiro ciclo da reação de PCR há pouca mudança no sinal de fluorescência. Isso definiu a linha de base para o gráfico de amplificação. Um nível de fluorescência acima da linha de base indicou o acúmulo de produto de PCR, que é representado por meio de uma curva exponencial. Foi determinado, então, um limiar de detecção de fluorescência fixo acima da linha de base (*threshold*) durante a fase exponencial da PCR. 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. A diferença entre as médias (de três experimentos) do gene de interesse e do gene de referência, foi calculada pelo programa Microsoft Excel e o valor de quantificação relativa foi expresso como  $2^{-\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Como gene de referência, foi escolhido o *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), visto que foi observado que este gene se expressa homogeneamente em dados de transcriptoma gerados por microarranjo de DNA de amostras tumorais e amostras adjacentes ao tumor, em amostras de CEE.

### 2.1.6 Extração do DNA

As amostras de CEE e tecido normal adjacente foram processadas no laboratório do BNT-INCA, como determina o regimento da instituição. Foram utilizadas as mesmas amostras em que foi extraído RNA. 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 *SPRR3*.

As amostras provenientes de biópsias de CEE foram colocadas em microtubo de 1,5 mL contendo 150 µL de tampão ATL e maceradas com auxílio de pilão. Após esse processo, foram adicionados mais 150 µL de tampão ATL e a proteinase K, com posterior incubação à 56°C em agitação constante por 2 horas no equipamento Thermomixer Comfort (EPPENDORF®). A inativação da proteinase K foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante 10 minutos, seguida por centrifugação a 14000 rpm por 30 segundos e adição de 200 µL de tampão de ligação e 200 µL de etanol absoluto. Após a homogeneização das soluções, este conteúdo foi então transferido para a uma coluna com tubo coletor (contidos no kit) e centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Adicionou-se em seguida 500 µL de tampão de lavagem a coluna e esta foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foi adicionado em seguida 500 µL de um segundo tampão de lavagem a coluna e esta foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foi realizada uma centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos para a retirada de qualquer resíduo do tampão. O tubo coletor foi então descartado e substituído por um microtubo de 1,5 mL. Por fim, foram acrescentados 30 µL de tampão de eluição (contido no kit) ao centro da coluna seguida de uma centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto e o material coletado foi armazenado em refrigeração até seu uso.

### 2.1.7. Quantificação de DNA

Assim 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). Para a realização da quantificação, é necessário configurar os parâmetros do equipamento para mensurar ácidos nucleicos, determinados pela absorvância em comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, 1 µL de DNA total foi pipetado no leitor do aparelho. O aparelho 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.

### 2.1.8. Modificação Por Bissulfito de Sódio

A conversão por bissulfito de sódio tem como base a desaminação das citosinas não metiladas a uracila e a manutenção das citosinas metiladas na presença de NaOH e bissulfito de sódio (FROMMER *et al.*, 1992). Foi utilizado 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.

### 2.1.9. Reação de PCR para Pirosequenciamento

Para a determinação do nível de metilação da região promotora de *SPRR3*, foi necessária uma prévia amplificação das regiões de interesse. Para isso, um total de 25 ng de DNA genômico tratado com bissulfito de sódio foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para as regiões que contêm os sítios CpGs avaliados (Tabela 2). A figura 19 ilustra a localização dos sítios CpGs avaliados,

sendo Sítios A e B localizados na região promotora (TSS1500) e Sítio C localizado na região 5'UTR, com respectivas distâncias em relação ao ponto de início da transcrição gênica, assim como também inclui a identificação das sondas na Plataforma Infinium 450K. Vale ressaltar que o promotor de *SPRR3* não possui ilhas CpGs, mas sim, sítios CpGs. Logo, foram desenhados três pares de oligonucleotídeos que amplificam regiões que contemplam 3 sítios CpGs (Figura 19).

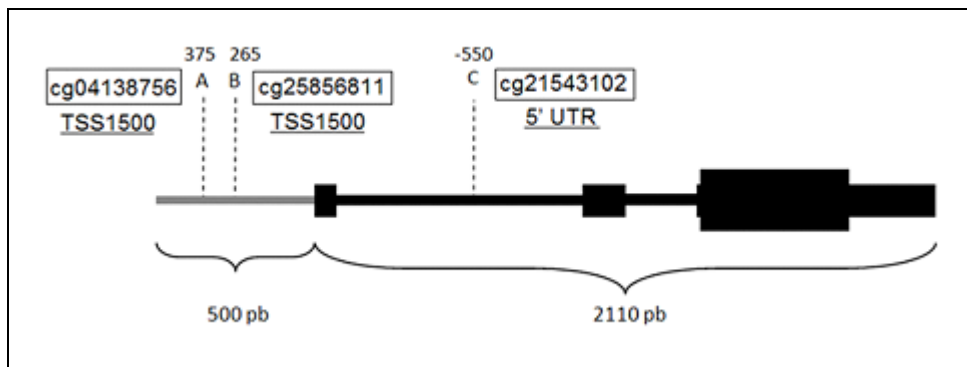
Para que posteriormente apenas uma das fitas amplificadas seja selecionada, um dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR deve ser marcado com biotina. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo Tampão 1X, 0,2 mM dNTP Mix, 0,2 mM de cada primer, (2,0mM para primer Sítio A, 2,0 mM para primer Sítio B e 1,5mM para primer Sítio C) de MgCl<sub>2</sub> 50mM 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 55°C para Sítio a, 57°C para Sítio b e 53°C para Sítio 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%.

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões contendo sítios CpGs no gene *SPRR3* pela técnica de pirosequenciamento

Sítio	Sentido	Sequência (5' - 3')	Produto Amplificado
A	Senso	GGT TGA GTT ATA ATG TTA TAT AGA	295 pb
	Anti-senso	AAC CAA ATT AAT CCT ATT AAA CTT	
	Sequenciamento	AAC AAT AAA CAT TTC	
B	Senso	TTT AAT TAT GAG GAA GTT TAA TAG G	175 pb
	Anti-senso	CTA ACT CAC TAT CCA CCC TTT AT	
	Sequenciamento	GGT TAA GAG GTT TGG	
C	Senso	GAG TAT TAG GAA GGA TAG TTA TG	115 pb
	Anti-senso	ACC TAA AAA CCT CTA TTC ACA CTA	
	Sequenciamento	GGG TAT GTG TGG G	



Figura 19 - Representação gráfica da localização dos sítios CpGs avaliados



Legenda: Esquema representando gene *SPRR3* e a distribuição ao longo do gene das regiões avaliadas neste estudo. Os retângulos da cor preta representam os éxons, sendo os éxons 1, 2 e 3, da esquerda para a direita. As letras A, B e C correspondem à identificação dos sítios analisados neste estudo. Os números acima das letras correspondem à localização dos sítios em relação ao ponto de início da transcrição.

Fonte: Genome Browser.

#### 2.1.10 Pirosequenciamento

Os produtos amplificados nas reações de PCR (Tópico 3.1.1.9) foram examinados por pirosequenciamento mediante seleção das fitas biotiniladas, por “beads” revestidas com estreptavidina, e posteriormente sequenciadas 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 se anela à fita simples do produto gerado na reação de PCR. São então adicionados tanto as enzimas responsáveis pela catálise da reação: DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase quanto os substratos da reação: adenosina 5' fosfosulfato 25 (APS) e luciferina. O sequenciamento se inicia pela adição sequencial de dNTPs à fita molde e, conforme há a incorporação, há também a liberação de pirofosfato (PPi) que é convertido então, em ATP pela enzima ATP sulfúrilase, na presença do substrato APS. O ATP produzido é utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina (catalisado 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, em 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 do gene *SPRR3* foram utilizados oligonucleotídeos de sequenciamento como descrito na Tabela 2.

## 2.2 Experimentos *In Vitro*

### 2.2.1 Características das Linhagens Celulares

A princípio, foram realizados testes a fim de detectarmos a expressão gênica de *SPRR3* em linhagens provenientes de epitélio esofágico normal e de CEE: HET-1A, OE-21, TE-1e TE-13 (Tabela 3).

Tabela 3 - Descrição das linhagens celulares

Linhagem	Histologia	Diferenciação	Estágio	<u>Tumorigenicidade</u>	Imortalização
HET-1A	Normal	-	-	-	SV40
OE-21	CEE	Moderado	IIA	+	-
TE-1	CEE	Bem	II	+	-
TE-13	CEE	Pouco	IV	+	-

FONTE: ATCC [HTTP://WWW.ATCC.ORG/](http://www.atcc.org/)

### 2.2.2 Cultivo das Linhagens Celulares

As linhagens celulares OE-21, TE-1 e TE-13 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% do coquetel de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A linhagem HET-1A foi cultivada em meio BEBM com adição de colágeno bovino tipo I à 1mg/mL, fibronectina 1mg/mL e 1% do coquetel de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Todas as células são testadas com MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Cambrex Bio Science, Estados Unidos) para a confirmação da ausência de contaminação por micoplasma.

### 2.2.3 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. A quantificação do RNA, a RT e a PCRq foram feitas nas mesmas condições das amostras humanas (itens 3.1.1.3, 3.1.1.4, 3.1.1.5).

#### 2.2.4 Tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina

A fim de determinarmos melhor dose para tratamento com o agente desmetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina, foi realizada uma curva com diferentes doses utilizando a linhagem celular OE21. Um total de  $2 \times 10^4$  foram plaqueadas em cada poço em placas de seis poços. 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  $\mu$ 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 120h na estufa a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo com o composto foi trocado a cada 48 horas. Também foi 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 10<sup>4</sup> células/poço para o tratamento por 24hs de exposição; 12,5 x10<sup>4</sup> células/poço para tratamento de 48h de exposição; 6,2 x10<sup>4</sup> células/poço para tratamento de 72h de exposição; 3,1 x10<sup>4</sup> células/poço para tratamento de 96h de exposição e 1,5 x10<sup>4</sup> células/poço para tratamento de 120h de exposição.

Após incubação por 24h, as linhagens celulares serão 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. Serão feitos mais dois experimentos independentes em triplicata de cada tratamento.

Para as linhagens TE-1 e TE-13, a curva de dose foi realizada com tratamento com o agente desmetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina nas concentrações de 0,5  $\mu$ M, 1,0  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M. Um total de  $1 \times 10^5$  foram plaqueadas em cada poço em placas de seis poços. 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 diferentes doses. 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 72h na estufa a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo com o composto foi trocado após 48 horas do início do tratamento.

### 2.2.5 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) que é amplamente utilizado para determinação da viabilidade celular. Este teste baseia-se na quantidade de MTT reduzida pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira, a quantidade de formazan medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Este teste foi primariamente sugerido por Mossman em 1983.

Inicialmente prepara-se a solução de meio com SFB com  $1 \times 10^4$  células/100  $\mu\text{L}$  e em seguida as células são plaqueadas em placas de 96 poços estéreis e colocar em estufa  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por quatro horas. Em seguida, em ambiente estéril, foi retirado o meio de cultura dos poços e adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio sem SFB e as placas permaneceram em estufa por 12-16h nas condições já citadas anteriormente. Após isto, em meio estéril, foi retirado o meio de cultura e os compostos foram adicionados, que devem estar diluídos em meio com SFB, aos poços, 200  $\mu\text{L}$ /poço. Em seguida, a placa foi colocada novamente em estufa por 24, 48 ou 72 horas. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução de MTT em cada poço e seguiu-se de incubação por 4h. Após isto, retirou-se o sobrenadante e os cristais precipitados foram diluídos com 100  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico por poço e prosseguiu-se com a leitura em leitor de placas a 540 nm.

### 2.2.6 Extração de DNA

O DNA genômico das células, foi extraído conforme descrito no item 3.1.1.6 para as amostras humanas assim como a quantificação, tratamento com bissulfito, PCR e pirosequenciamento serão realizados nas mesmas condições já descritas anteriormente (itens 2.1.8, 2.1.9, 2.1.10, 2.1.11).

### 2.3 Análise *in silico* de miRNAs

Foram utilizados dados de sequenciamento de RNA total provenientes de 94 amostras CEE e 3 amostras de tecido adjacente ao tumor depositados no TCGA (do inglês: The Cancer Genome Atlas; <https://gdc.nci.nih.gov/>) visando identificar os miRNA diferencialmente expressos no tumor em relação ao tecido não tumoral adjacente. Para esta análise foi utilizado o pacote DESeq2 do programa R e os parâmetros utilizados foram valores de  $>1$  e  $<-1$ , assim como  $FDR < 0.05$ . Uma vez determinados os miRNAs diferencialmente expressos no tumor, foi realizada a integração desses dados com os dados de transcriptomas também depositados de *Log fold change* no TCGA a fim de avaliarmos possível correlação entre expressão de *SPRR3* e miRNAs super-expressos encontrados. Para a análise destes dados foi utilizado programa DESeq2 do Software R.

### 2.4 Análise *in silico* de Fatores de Transcrição

Para a predição de sítios de ligação de fatores de transcrição (FT) ao promotor de *SPRR3*, foi utilizado a ferramenta MatInspector do software Genomatix e o programa JASPAR 2016. Foi feita a interseção dos dados gerados entre os dois programas e foram identificados 24 FT em comum (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Dentre estes FT foram identificados os que possuíam relação estatisticamente significativa com expressão de *SPRR3*, mediante análise utilizando programa R.

Os fatores transcricionais identificados foram submetidos a posterior análise para identificação de alvos pelo miR-21 utilizando site MiRWalk e MirTarBase. Após esta triagem, foi identificado o perfil diferencial de expressão conforme dados gerados pelas técnicas de RNA-Seq e microarranjo realizadas pelo nosso grupo.

## 2.5 Análises Estatísticas

Inicialmente, foi feita análise descritiva da população do estudo com frequências absoluta e relativa para as variáveis categóricas e medidas de tendência central (média ou mediana) e de dispersão (desvio padrão ou valores mínimo e máximo) para as variáveis contínuas. As análises estatísticas referentes à comparação da expressão gênica em diferentes grupos foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 5. 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 5. Quando os dados se enquadravam numa distribuição normal, foi feito o teste de Pearson, enquanto que a correlação de Spearman foi utilizada quando os dados não foram paramétricos.

Os fatores sócio-demográficos e clinicopatológicos foram avaliados pelo teste do  $\chi^2$  (qui-quadrado) em relação à *fold change* de expressão da SPRR3. Para a análise exploratória da sobrevida global, foi utilizado o método de Kaplan-Meier e para avaliar a diferença entre os grupos, foi aplicado o teste de *log-rank*. Para tanto, foi utilizado pacote estatístico SPSS, versão 20.0.

Para todas as análises utilizou-se  $p < 0,05$  como critério para determinar valores estatisticamente significativos.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Casuística

Foram incluídas neste estudo, 35 pares de amostras correspondentes à mucosa adjacente ao tumor e ao tecido tumoral de indivíduos diagnosticados com carcinoma epidermoide de esôfago entre os anos de 2012 e 2013 coletadas no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes de Souza – INCA e armazenadas no Banco Nacional de Tumores da instituição. As características clínico-patológicas dos pacientes listadas na tabela 4.

Conforme as informações disponíveis, os pacientes com CEE foram predominantemente do sexo masculino (71,4%), com idade mediana de 60 anos. Em relação aos hábitos de vida, 60,0% são fumantes ativos, 37,1% são ex-fumantes e apenas um indivíduo se declarou não fumante. A maior parte dos pacientes selecionados declarou consumir ativamente bebidas alcoólicas (60,0%), 31,4% dos pacientes avaliados neste estudo são ex-etilistas e apenas três pacientes se declararam não etilistas. Os tumores foram classificados em sua maioria como moderadamente diferenciados (80,0%) e com localização preferencialmente no terço médio (77,1%). Quanto ao estadiamento clínico, a maior parte dos tumores com informação disponível, foi classificada como III – IV (88,6%) (Tabela 4).



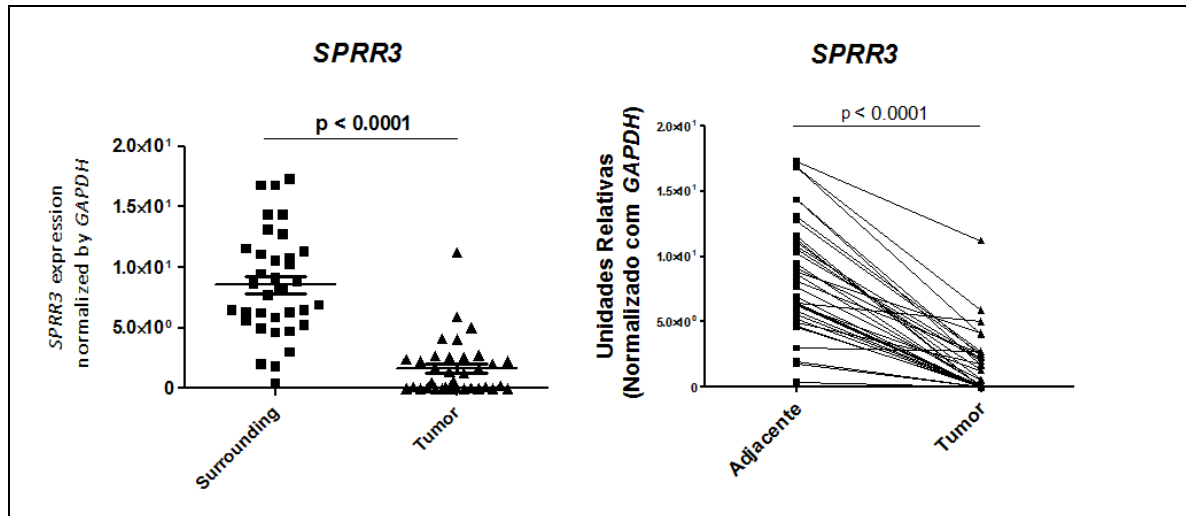
Tabela 4 - Descrição das características sociodemográficas e clinicopatológicas da população do estudo

<b>Características</b>		<b>n (%)</b>
<b>Idade</b>	< 60 anos	20 (57,1)
	≥ 60 anos	15 (42,9)
	Mediana (min. – max.)	60 (39 – 7)
<b>Gênero</b>	Masculino	25 (71,4)
	Feminino	10 (28,6)
<b>Tabagismo</b>	Não	1 (2,9)
	Sim	21 (60,0)
	Ex-tabagista	13 (37,1)
<b>Etilismo</b>	Não	3 (8,6)
	Sim	21 (60,0)
	Ex-etilista	11 (31,4)
<b>Subsítio</b>	Inferior	3 (8,6)
	Médio	27 (77,1)
	Superior	5 (14,3)
<b>Diferenciação</b>	Pouco diferenciado	7 (20,0)
	Moderadamente diferenciado	28 (80,0)
<b>Estadiamento clínico</b>	I-II (Precoce)	4 (11,4)
	III-IV (Avançado)	31 (88,6)

### 3.2 Análise da Expressão Gênica de *SPRR3*

Inicialmente identificamos o perfil de expressão de *SPRR3* em 35 pares de amostras de pacientes diagnosticados com CEE. Foi observada uma diminuição nos níveis de expressão gênica entre os grupos de amostras de tumor em relação às amostras de tecido adjacente ( $p < 0,0001$ ), sendo a mediana de expressão nas amostras adjacentes 5,66 vezes maiores do que nos tumores (Figura 20).

Figura 20 - Perfil de expressão gênica de *SPRR3* em pacientes com CEE



Legenda: A) Dotplot representando a comparação da expressão entre tecido adjacente ao tumor e tecido tumoral. B) Variação da expressão de *SPRR3* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. CEE - carcinoma epidermoide de esôfago. qPCR realizado em triplicata

A variação na expressão (*Fold Change*) de *SPRR3* foi estatisticamente associada a idade e ao gênero dos pacientes com CEE. Como podemos observar na tabela 5, considerando o *Fold Change* de expressão de *SPRR3*, pacientes com idade igual ou superior a 60 anos possuem maiores variações da expressão de *SPRR3*, assim como também foi observado maiores níveis de variação em pacientes do sexo feminino. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada para as comparações feitas utilizando o *Fold Change* de expressão e hábitos sociais (tabagismo e etilismo) e características do tumor (tamanho do tumor, subsítio esofágico e grau de diferenciação).

Tabela 5 - Análise de fatores sociodemográficos e clinicopatológicos em relação à *fold change* de expressão de *SPRR3*

Características	<i>Fold Change</i> de expressão <i>SPRR3</i>		p valor
	Baixa Variação n (%)	Alta Variação n (%)	
<b>Idade</b>			
< 60 anos	13 (76,5)	7 (38,9,0)	<b>0,02</b>
≥60 anos	4 (23,5)	11 (61,1)	
<b>Gênero</b>			
Masculino	15 (88,2)	10 (55,6)	<b>0,04</b>
Feminino	2 (11,8)	8 (44,4)	
<b>Tabagismo</b>			
Não	5 (29,4)	9 (50,0)	0,21
Sim	12 (70,6)	9 (50,0)	
<b>Etilismo</b>			
Não	8 (47,1)	6 (33,3)	0,41
Sim	9 (52,9)	12 (66,7)	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1-T2	–	1 (7,7)	0,45
T3-T4	16 (100,0)	12 (92,3)	
<b>Subsítio Esofágico</b>			
Superior	2 (11,8)	3 (16,7)	0,15
Médio	12 (70,6)	15 (83,3)	
Inferior	3 (17,6)	–	
<b>Grau de diferenciação</b>			
Pouco diferenciado	5 (29,4)	2 (11,1)	0,18
Moderadamente diferenciado	12 (70,6)	16 (88,9)	

Legenda: Os valores representados indicam a quantidade de pacientes em cada grupo avaliado e, entre parênteses o valor percentual correspondente. Valores inferiores à mediana foram classificados como “baixa variação de expressão”, ao passo que valores acima desta, foram classificados como alta variação de expressão”.

### 3.3 Avaliação da Associação entre a Metilação do DNA e Silenciamento Gênico de *SPRR3*

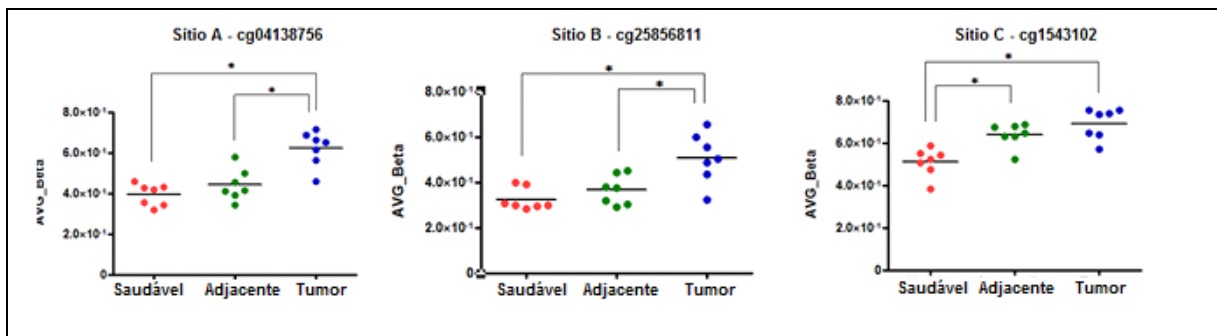
#### 3.3.1 Análises do Perfil de Metilação de *SPRR3*

Conforme descrito em tópico anterior, *SPRR3* apresenta perda de expressão em amostras de tumor em comparação ao tecido adjacente tumoral. Por conta disto, o próximo passo foi investigar quais seriam os possíveis mecanismos envolvidos na regulação da expressão de *SPRR3*.

Em análise preliminar dos resultados de metiloma obtidos no nosso grupo, utilizando a plataforma Infinium 450 k (Illumina), observamos regiões do tumor com maior taxa de metilação quando comparado ao seu tecido adjacente no gene *SPRR3*. Foram analisadas amostras pareadas de tecido adjacente ao tumor e tecido tumoral provenientes de sete pacientes diagnosticados com CEE e também amostras provenientes de mucosa esofágica de indivíduos livres de neoplasia. Foi observado para os Sítios A e B (na região promotora do gene), maiores níveis de metilação em amostras tumorais em relação ao tecido tumoral adjacente e tecido saudável. Já para o sítio C (5'UTR), foi observado aumento de metilação em amostras tumorais e em amostras de tecido adjacente ao tumor em relação à mucosa saudável (Figura 21).

Portanto, estes resultados sugeriram evidências que justifiquem uma possível associação entre a metilação do DNA e a expressão diminuída de *SPRR3* no CEE. A figura 6 contém a localização de cada sítio CpG avaliado neste estudo e sua localização no gene, assim como a identificação da sonda correspondente em cada sítio CpG no gene *SPRR3*.

Figura 21 - Análise da metilação de *SPRR3* utilizando dados do metiloma de carcinoma epidermoide de esôfago

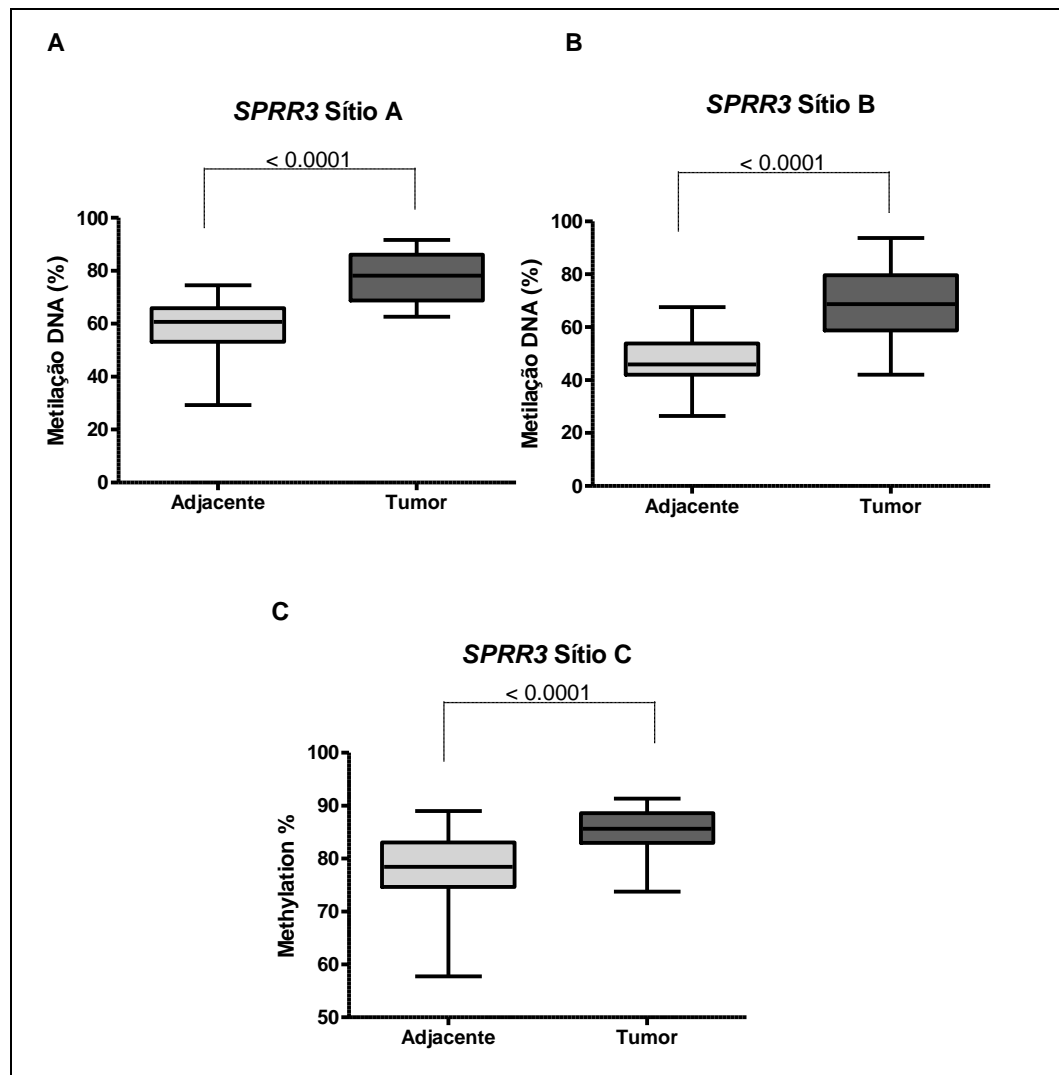


Legenda: (A) Análise dos resultados preliminares de dados obtidos do metiloma de CEE, utilizando a plataforma Infinium 450 k (Illumina) em que podem ser observadas amostras tumorais com maior taxa de metilação quando comparada ao seu tecido adjacente e/ou à mucosa esofágica saudável (amostras pareadas de sete mucosas de indivíduos com CEE e sete mucosas esofágicas de indivíduos sem neoplasia). Nesta análise foram identificadas três regiões de interesse que foram avaliados no presente estudo, duas na região promotora (A e B) e uma na região 5'UTR do gene (C). \*  $p < 0,05$ .

O próximo passo foi validar os resultados encontrados na análise de metiloma em um grupo maior de pacientes. Portanto, identificamos o perfil de metilação de *SPRR3* nas mesmas amostras pareadas de pacientes com CEE que tiveram a expressão desse gene avaliada. No entanto, por problemas técnicos, nem todas as amostras puderam ser analisadas para os três sítios identificados previamente, sendo validados os resultados de 29 pares analisados para Sítio A, 35 pares para o Sítio B e 34 pares para o Sítio C.

Para os três sítios avaliados foram observadas taxas de metilação significativamente maiores nos tecidos tumorais em comparação aos seus tecidos adjacentes correspondentes: 77,40 % vs. 58,47 %,  $p < 0,0001$  para Sítio A; 68,56 % vs. 47,49 %,  $p < 0,0001$  para Sítio B e 85,47 % vs. 77,56 %,  $p < 0,0001$  para Sítio C (Figura 22).

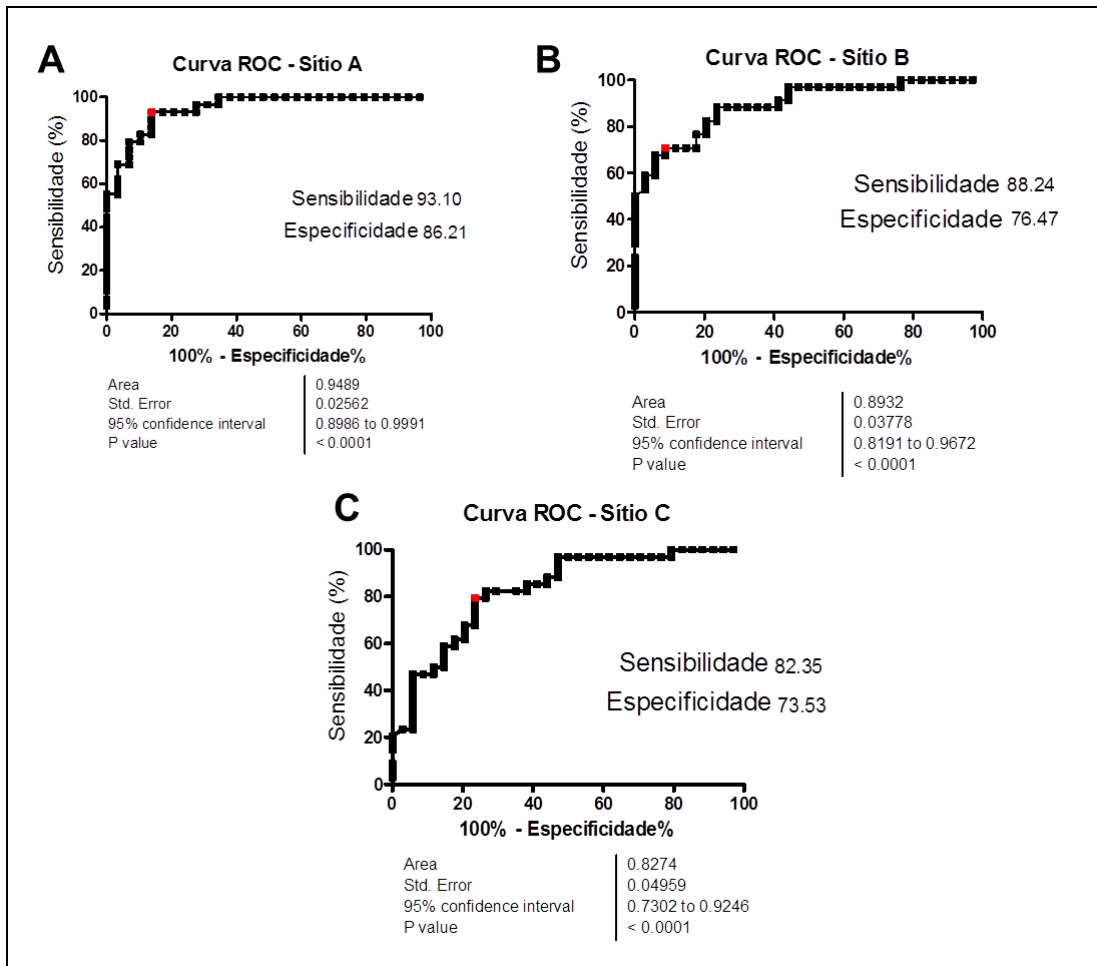
Figura 22 - Análise do perfil de metilação dos três sítios de *SPRR3* em pacientes com CEE



Legenda: Boxplot representando a comparação da metilação entre tecido adjacente e tumor para o Sítio A (A), Sítio B (B) e Sítio C (C)  $p < 0,0001$

A capacidade do perfil de metilação de *SPRR3* em discriminar mucosa adjacente de tecido tumoral foi estatisticamente significativa para todos os sítios analisados, com sensibilidade de 93,10% e especificidade de 86,21%,  $p < 0,0001$  para Sítio A; sensibilidade de 88,24% e especificidade de 76,47 %,  $p < 0,0001$  para Sítio B e sensibilidade de 82,35% e especificidade de 73,53 %,  $p < 0,0001$  para Sítio C, sendo acurácia de 94,90%, 89,32% e 82,74%, respectivamente. Assim esses dados mostram que estes tumores possuem padrões característicos de metilação de *SPRR3* a ponto de identificá-los em relação à mucosa adjacente ao tumor (Figura 23).

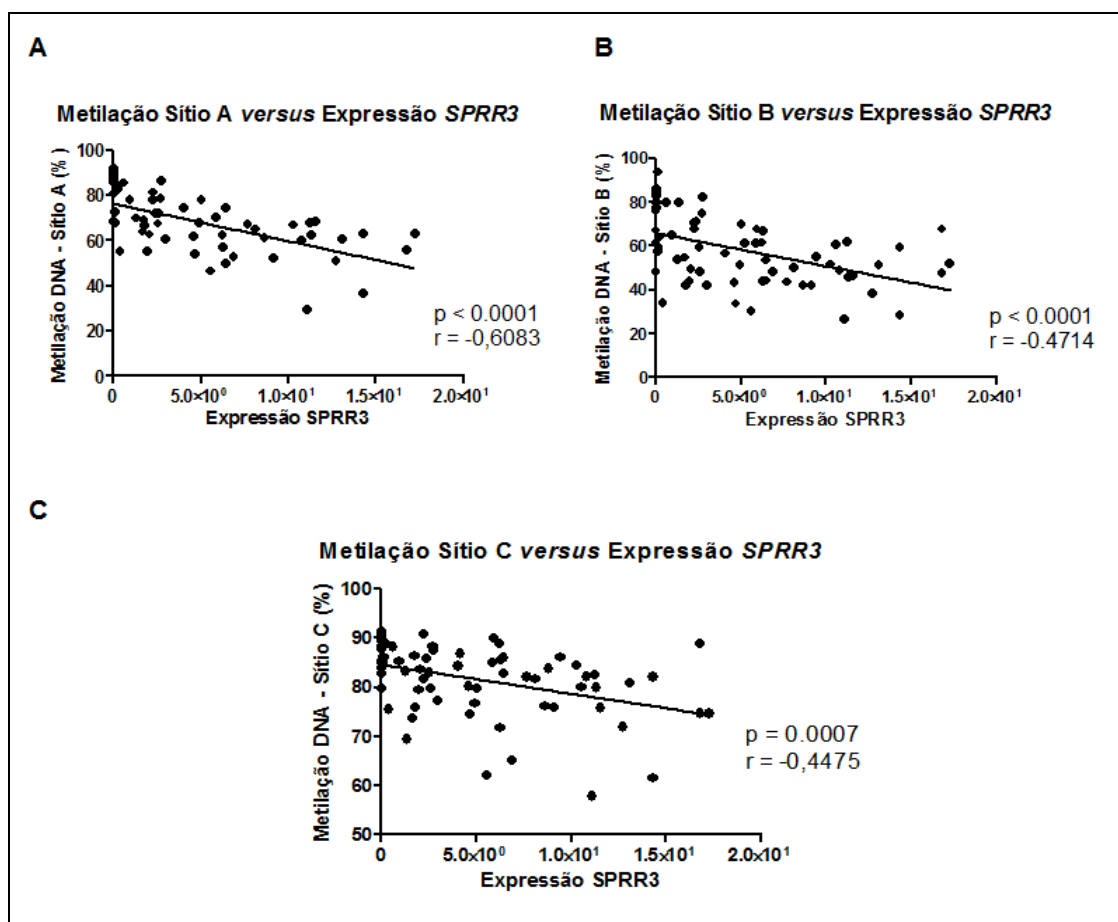
Figura 23 - Curvas ROC exibindo poder discriminativo entre tecido tumoral e mucosa adjacente ao tumor utilizando os níveis de metilação



Legenda: Os pontos em vermelho correspondem aos pontos de corte que possuem melhores valores de sensibilidade e especificidade para o Sítio A (A), Sítio B (B) e Sítio C (C).

Investigamos uma possível correlação entre a diminuição da expressão de *SPRR3* com o perfil de metilação encontrado nos três sítios analisados. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre a metilação de *SPRR3* e sua expressão, para todos os sítios avaliados ( $p < 0.0001$  para Sítio A;  $p < 0.0001$  para Sítio B e  $p = 0,0007$  para Sítio C). Para o Sítio A foi encontrado coeficiente de correlação de  $-0,6083$ , para o Sítio B  $r = -0,4714$  e  $r = -0,4475$  para o Sítio C (Figura 24).

Figura 24 - Correlação entre expressão gênica e metilação de *SPRR3* em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: Correlações entre expressão gênica de *SPRR3* e níveis de metilação do Sítio A (A), Sítio B (B) e Sítio C (C). Valores de  $p$  e de  $r$  estão no gráfico.

Em seguida, avaliamos se o perfil de metilação, utilizando o  $\Delta$  Delta de metilação, poderia estar associado com os dados clinico-patológicos dos pacientes com CEE, no entanto não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa em nenhuma dessas associações avaliadas (Tabela 6).



Tabela 6 - Mediana de  $\Delta$  de metilação nos sítios A, B e C e valores mínimo e máximo de acordo com as categorias das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas

Características	$\Delta$ de metilação sítio A Mediana (Min-Max)	Valor de p	$\Delta$ de metilação sítio B Mediana (Min-Max)	Valor de p	$\Delta$ de metilação sítio C Mediana (Min-Max)	Valor de p
<b>Idade</b>						
< 60	23,71 (0,74 - 56,21)	0,10	24,08 (-0,08 - 53,19)	0,06	0,20 (3,40E-05 - 11,24)	0,24
≥ 60	15,59 (1,10 - 35,69)		16,37 (2,33 - 44,44)		7,20 (-3,07 - 24,25)	
<b>Gênero</b>						
Masculino	18,34 (0,740 - 56,21)	0,46	18,18 (2,33 - 53,19)	0,16	8,34 (-3,07 - 87,79)	0,32
Feminino	21,02 (7,36 - 35,69)		24,81 (-0,08 - 42,66)		6,90 (0,10 - 24,25)	
<b>Etilismo</b>						
Nunca	17,10 (13,18 - 21,02)	0,74	9,92 (-0,08 - 17,22)	0,10	4,36 (1,25 - 7,87)	0,48
Sim, ex-consumidor.	18,43 (0,74 - 56,21)		21,53 (2,33 - 53,19)		8,12 (-3,07 - 87,79)	
<b>Sítio tumoral</b>						
Superior	25,89 (15,97-56,21)	0,11	28,32 (15,84 – 53,19)	0,30	18,68 (7,43 – 30,45)	0,06
Médio	18,43 (1,10 - 43,35)		19,07 (-0,08 - 49,46)		6,36 (-3,07 - 87,79)	
Inferior	NA		32,27 (4,50 – 37,79)		8,34 (7,62 – 15,90)	
<b>Grau de diferenciação</b>						
Pouco	26,25 (3,60 - 56,21)	0,27	18,18 (9,92 - 53,19)	0,47	7,87 (-3,07 - 87,79)	0,53
Moderadamente	18,25 (0,74 - 43,35)		20,15 (-0,08 - 49,46)		7,66 (-0,44 - 27,97)	

Legenda: Os valores de  $\Delta$  Delta de metilação para cada sítio CpG avaliado foram calculados subtraindo o vaalor encontrado na amostra de tecido adjacente ao tumoral, do valor observado na amostra tumoral, para cada indivíduo incluído neste estudo. NA: não aplicável.

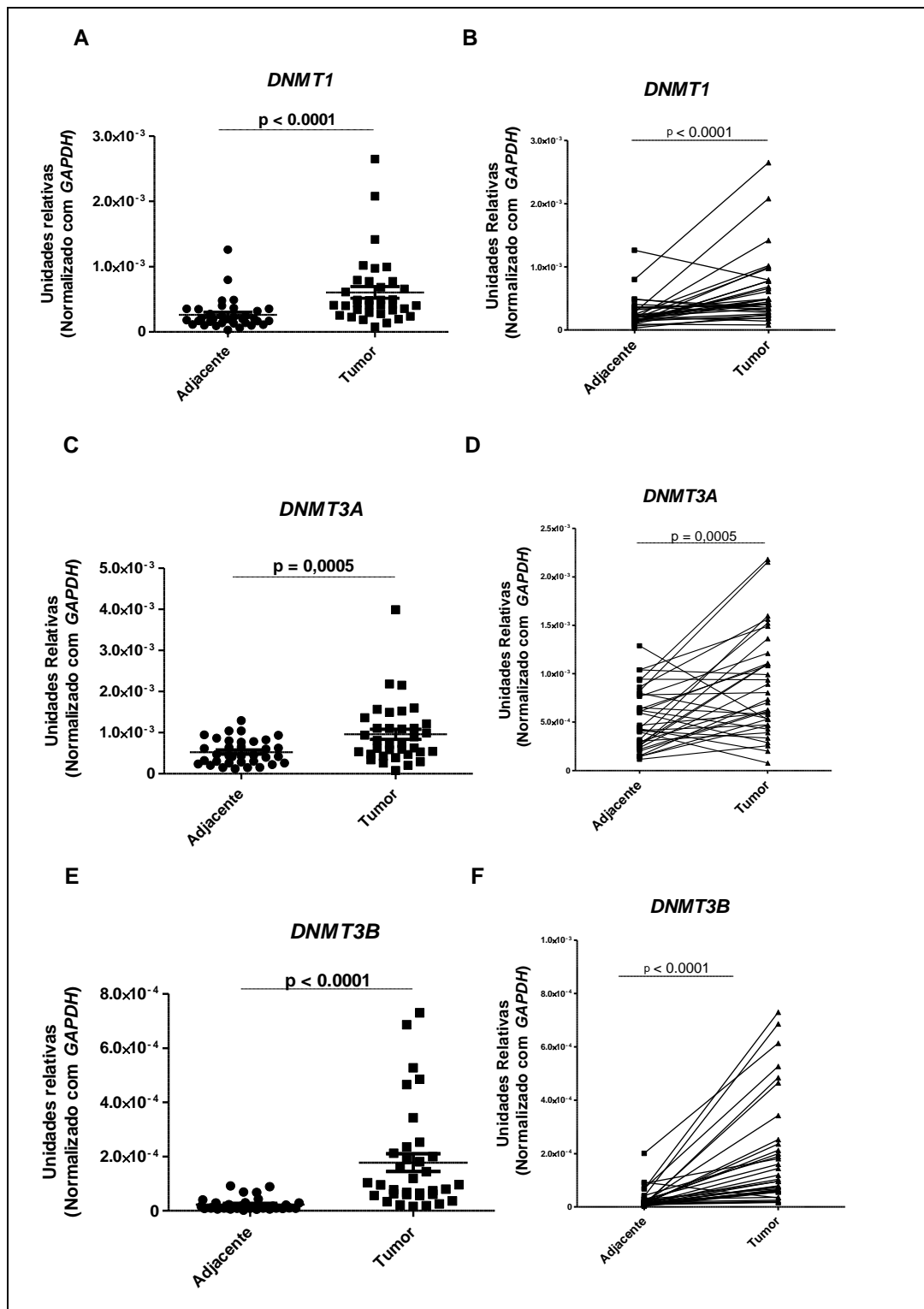
#### 4.3.2 Análises da Expressão Gênica das DNMTs

Nossos dados até aqui sugerem a participação da metilação do DNA na regulação da expressão de *SPRR3*, uma vez que observamos uma diminuição da expressão gênica correlacionada à hipermetilação de *SPRR3* em amostras tumorais, quando comparadas às amostras do tecido adjacente tumoral. O próximo passo foi identificar o perfil de expressão das *DNMTs* e possível correlação com a metilação de *SPRR3* em amostras de CEE.

A fim de avaliarmos o envolvimento das *DNMTs* no processo de perda da expressão de *SPRR3* no CEE, foi examinado o perfil de expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* nas amostras tumorais e adjacentes. *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* foram superexpressos em tumores, 3,7, 2,6 e 13 vezes, respectivamente, relativamente às mucosas adjacentes (valor de  $p < 0,0001$ ,  $p = 0,0005$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente) (Figura 25).

Posteriormente correlacionamos os níveis de expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* com a expressão de *SPRR3* no conjunto de amostras avaliadas e observamos uma correlação inversa, com menor expressão de *SPRR3* em pacientes com maior expressão de *DNMT1* ( $p = 0,0013$ ;  $r = -0,3761$ ), de *DNMT3A* ( $p = 0,0043$ ;  $r = -0,3369$ ) e de *DNMT3B* ( $p < 0,0001$ ;  $r = -0,5969$ ) (Figura 26).

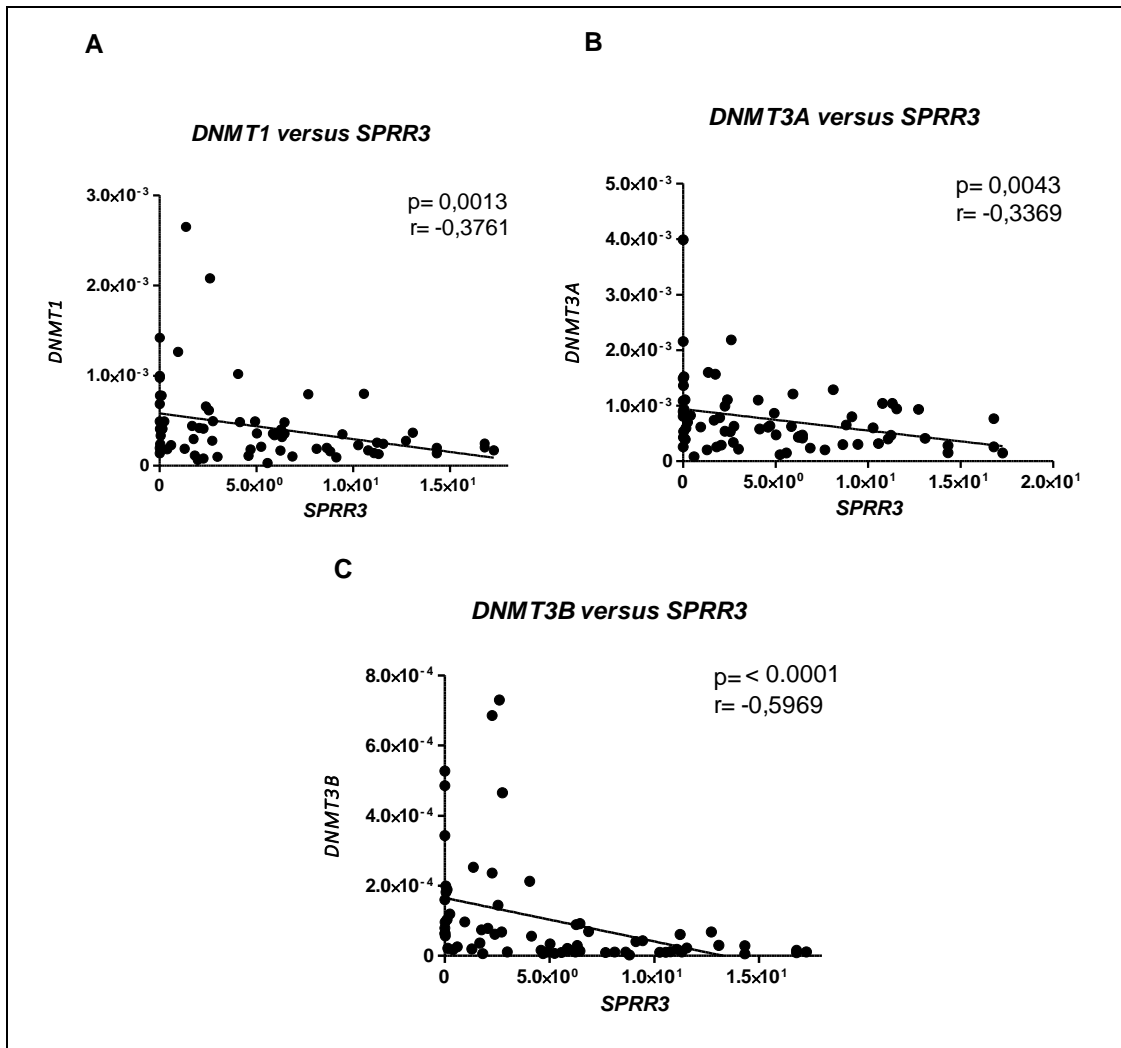
Figura 25 - Perfil de expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: A) Dotplot representando a comparação da expressão do gene *DNMT1* entre mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral. B) Variação da expressão de *DNMT1* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. C) Dotplot representando a comparação da expressão do gene *DNMT3A* entre mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral. D) Variação da expressão de *DNMT3A* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. E) Dotplot representando a comparação da expressão do gene *DNMT3B* entre mucosa adjacente ao tumor e tecido tumoral. F) Variação da expressão de

*DNMT3B* entre os pares de amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor. qPCR em triplicata.

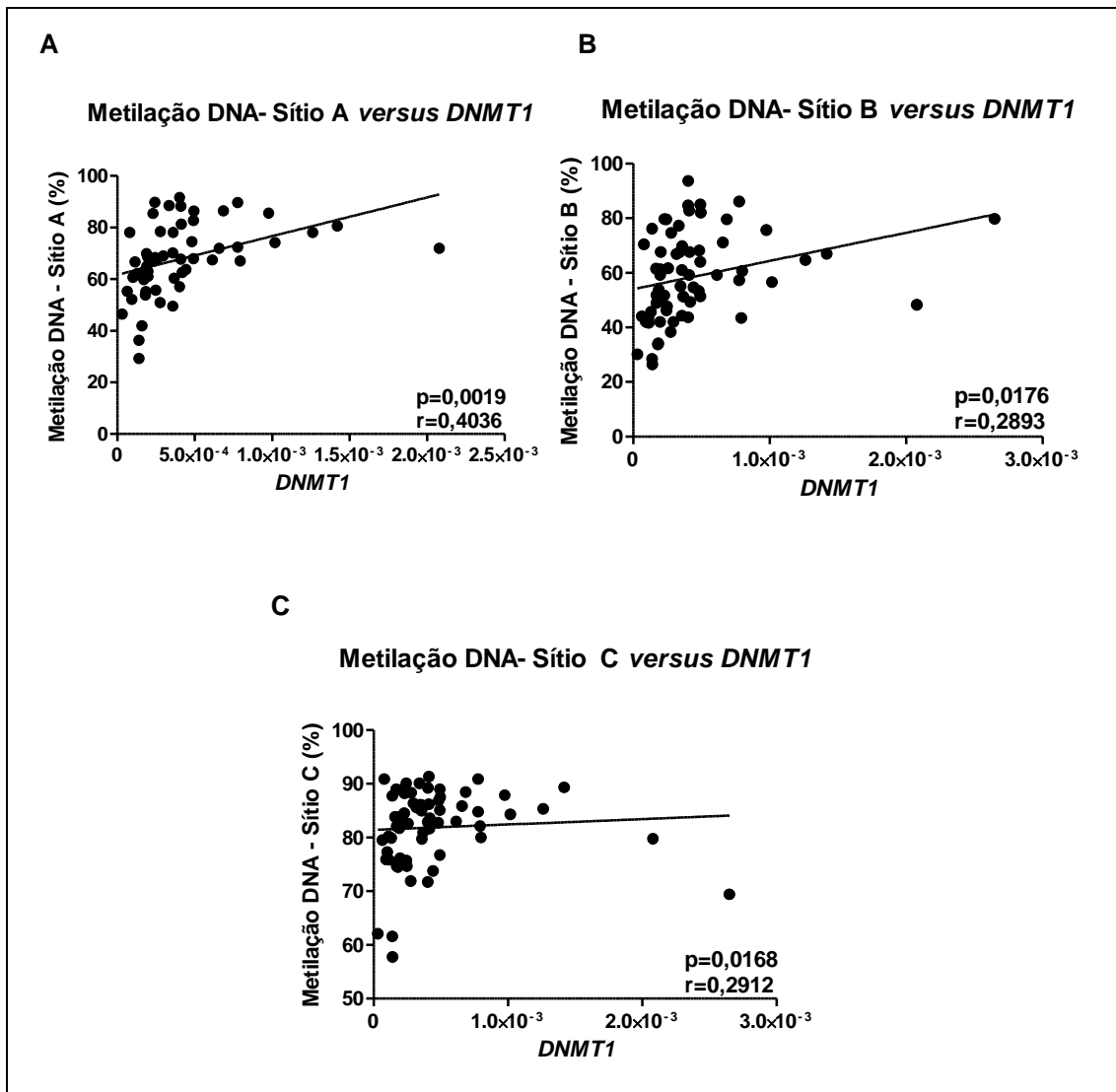
Figura 26 - Correlação entre os níveis de expressão de *SPRR3* e *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: A) Correlação entre expressão gênica de *SPRR3* e *DNMT1* nas amostras tumorais e mucosa adjacente ao tumor. B) Correlação entre expressão gênica de *SPRR3* e *DNMT3A* nas amostras tumorais e mucosa adjacente ao tumor. C) Correlação entre expressão gênica de *SPRR3* e *DNMT3B* nas amostras tumorais e mucosa adjacente ao tumor.

De forma semelhante, observamos correlação entre a expressão de *DNMT1* e os níveis de metilação de cada sítio CpG de *SPRR3* ( $p=0,0019$  e  $R = 0,4036$  para Sítio A;  $p=0,0176$  e  $R = 0,2893$  para Sítio B e  $p=0,0168$  e  $R = 0,2912$  para Sítio C) (Figura 27).

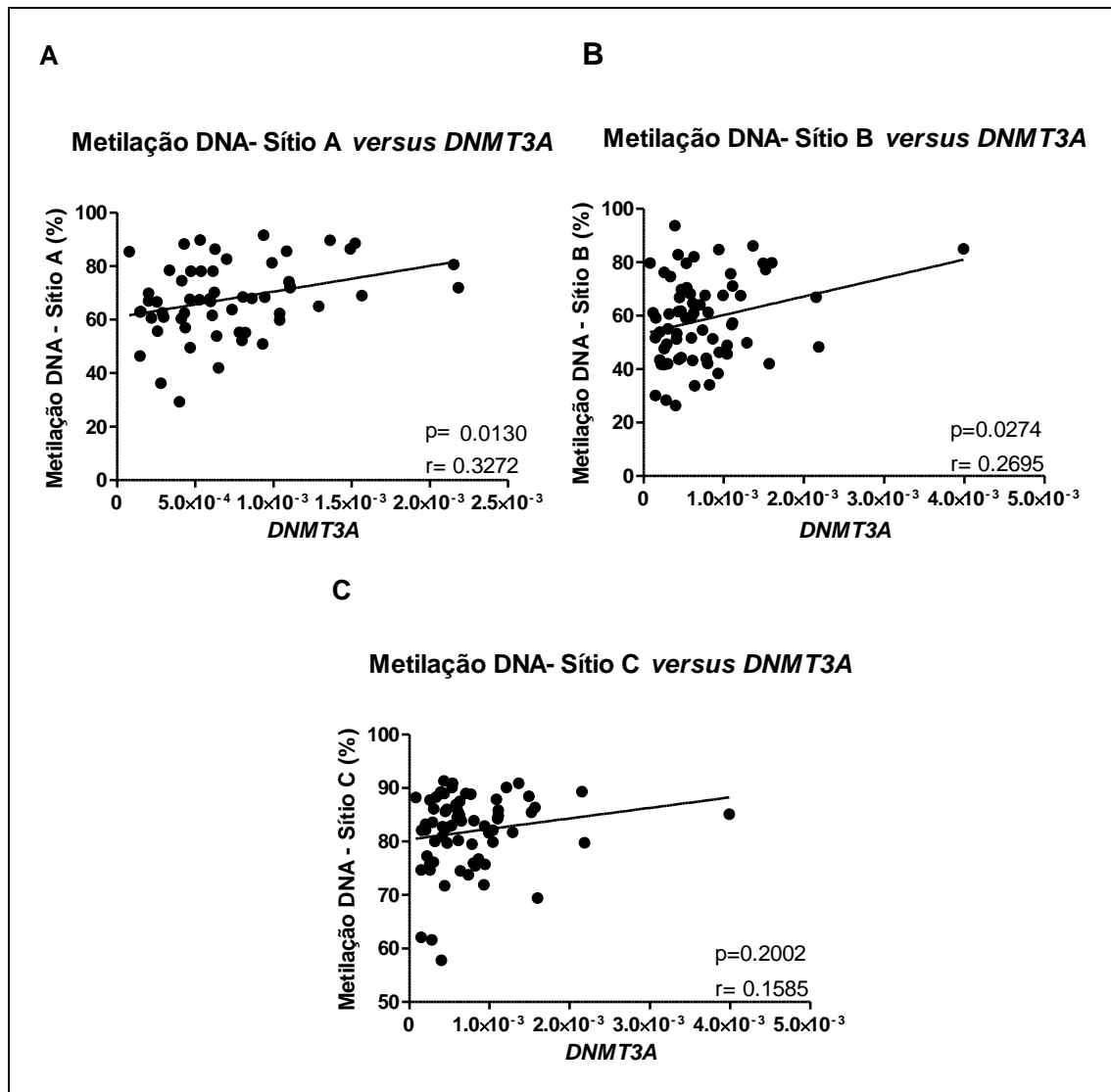
Figura 27 - Correlação entre a expressão gênica de *DNMT1* e a metilação dos 3 sítios de *SPRR3* em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: Correlação entre expressão gênica de *DNMT1* e níveis de metilação do Sítio A (A), Sítio B (B) e Sítio C (C).

Correlação positiva, também foi observada entre a expressão de *DNMT3A* e níveis de metilação dos sítios CpG A ( $p=0,0130$  e  $R= 0,3272$ , Pearson) e B ( $p=0,0274$  e  $R= 0,2695$ , Pearson). Entretanto, não foi observada correlação da expressão de *DNMT3A* e os níveis de metilação no sítio C (Figura 28).

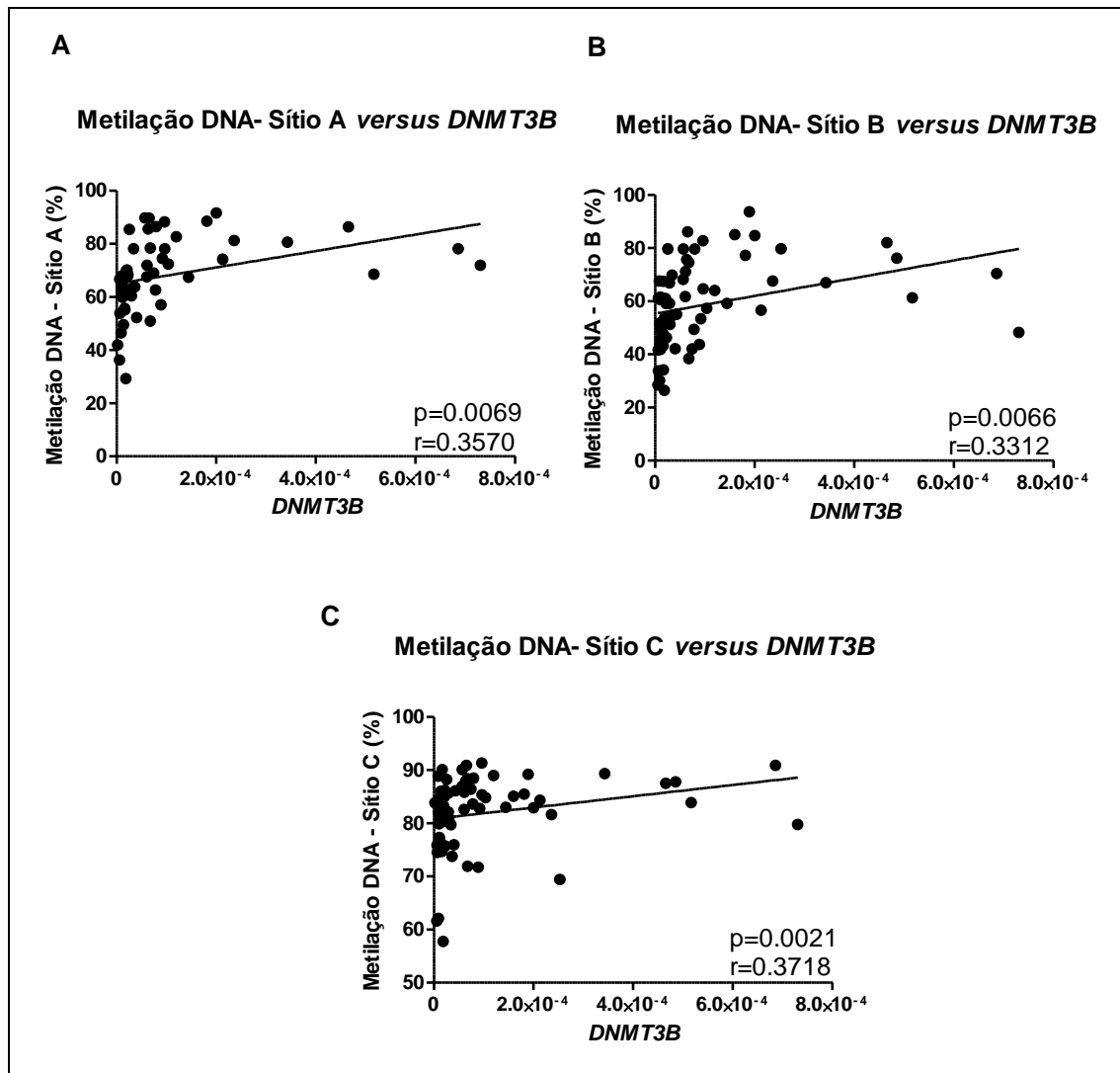
Figura 28 - Correlação entre a expressão gênica de *DNMT3A* e a metilação dos 3 sítios de *SPRR3* em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.



Legenda: Correlação entre expressão gênica de *DNMT3A* e níveis de metilação do Sítio A (A), Sítio B (B) e Sítio C (C).

A mesma análise foi feita com o gene *DNMT3B* e foram encontradas correlações positivas estatisticamente significativas para os três sítios avaliados ( $p = 0,0069$  e  $r = 0,3570$ , para Sítio A;  $p = 0,0066$  e  $r = 0,3312$ , para Sítio B e  $p = 0,0021$  e  $r = 0,3718$ , para Sítio C) (Figura 29).

Figura 29 - Correlação entre a expressão gênica de *DNMT3B* e a metilação dos 3 sítios de *SPRR3* em amostras de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



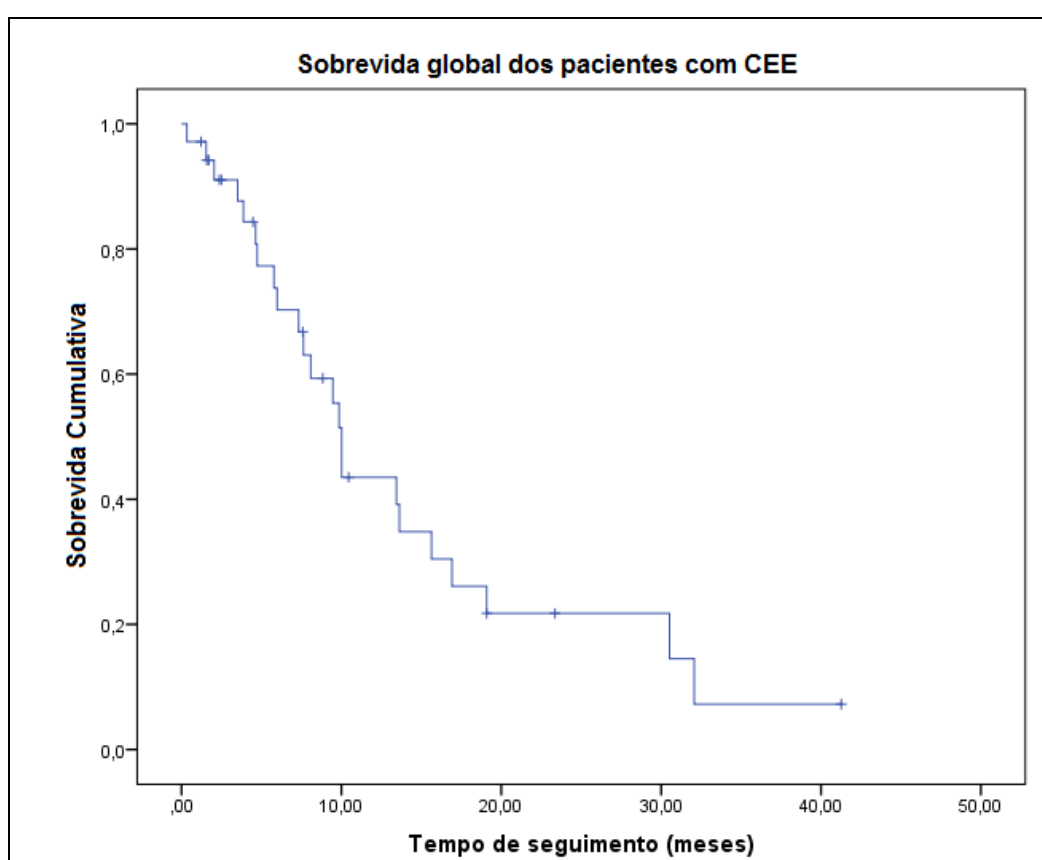
Legenda: Correlação entre expressão gênica de *DNMT3B* e níveis de metilação do Sítio A (A), Sítio B (B) e Sítio C (C).

Em conjunto, nossos dados sugerem que a metilação do DNA como um possível mecanismo envolvido na diminuição da expressão de *SPRR3* em carcinoma epidermoide de esôfago.

### 3.3.3 Impacto da Expressão e Metilação de *SPRR3* no Prognóstico de Pacientes com CEE

A sobrevida global dos pacientes avaliados neste estudo apresentou uma mediana de 10 meses (IC 95% de 9,14 a 10,90) com apenas 7,3% dos pacientes vivos ao final do seguimento avaliado (41 meses) (Figura 30). Devido a baixa sobrevida dos pacientes com CEE, também avaliamos a sobrevida destes pacientes em 24 meses, quando somente 21,8% estavam vivos neste período

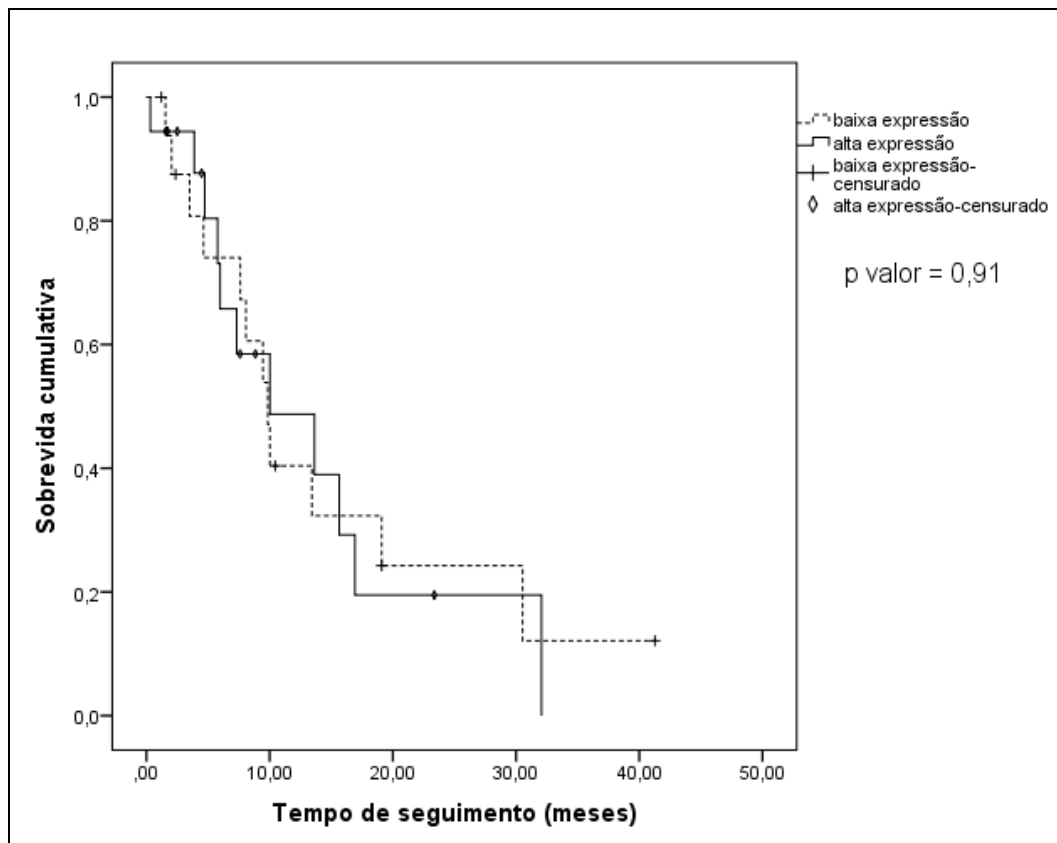
Figura 30 - Curva de sobrevida global para os indivíduos incluídos no estudo



Em seguida avaliamos se a expressão gênica de *SPRR3* teria impacto na sobrevida dos pacientes e observamos que indivíduos com expressão alta ou baixa expressão deste gene (de acordo com a mediana) não apresentaram diferenças nas taxas de sobrevida global ( $p=0,91$ ) (Figura 31).



Figura 31 - Curva de sobrevida global em relação à expressão de *SPRR3* em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago

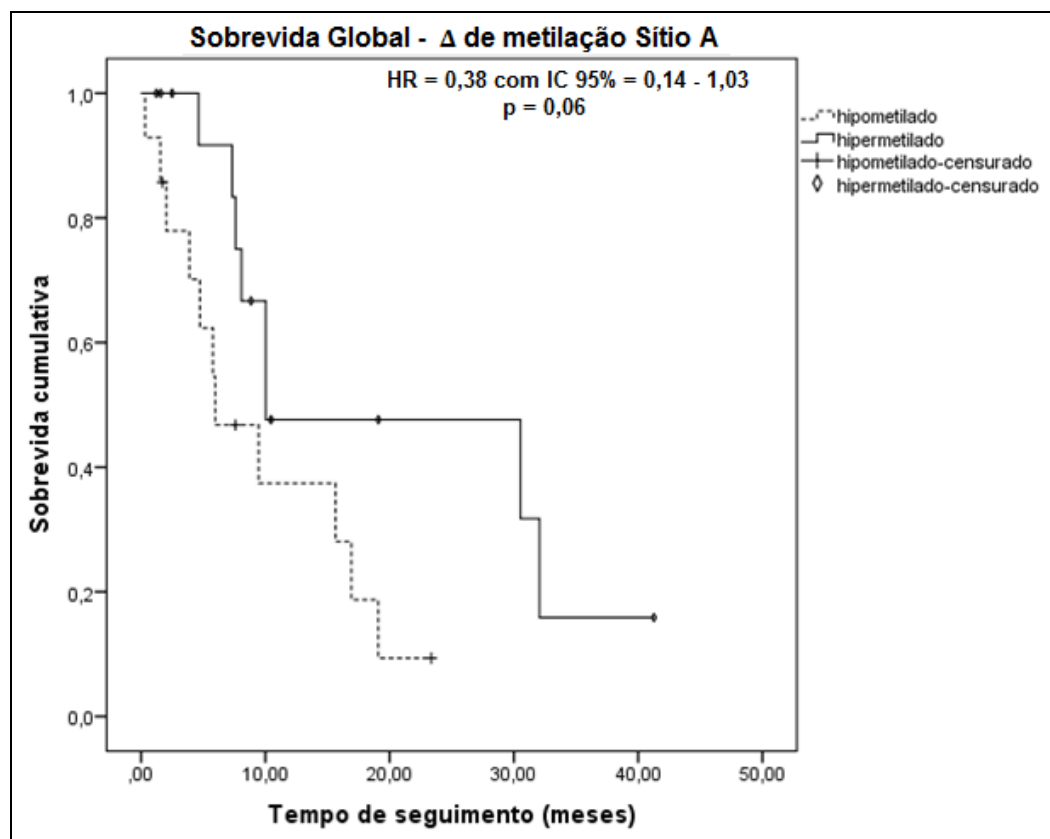


Legenda: O critério utilizado para análise de sobrevida foi a mediana do *Fold Change* (FC) da expressão de *SPRR3*. O valor da mediana do FC foi 1,29.  $p=0,91$

Em seguida, avaliamos o impacto no delta de metilação na sobrevida dos pacientes incluídos neste estudo. Nossos dados mostraram que os pacientes classificados como hipermetilados (delta de metilação acima da mediana) e hipometilados (delta de metilação abaixo da mediana) nos sítios A e B não apresentaram diferença significativa nas taxas de sobrevida (Figuras 32 e 33). Entretanto, o delta de metilação do sítio C impactou na sobrevida destes pacientes, onde indivíduos classificados como hipermetilados apresentaram uma sobrevida significativamente melhor (39,3% dos pacientes vivos em 24 meses) do que os

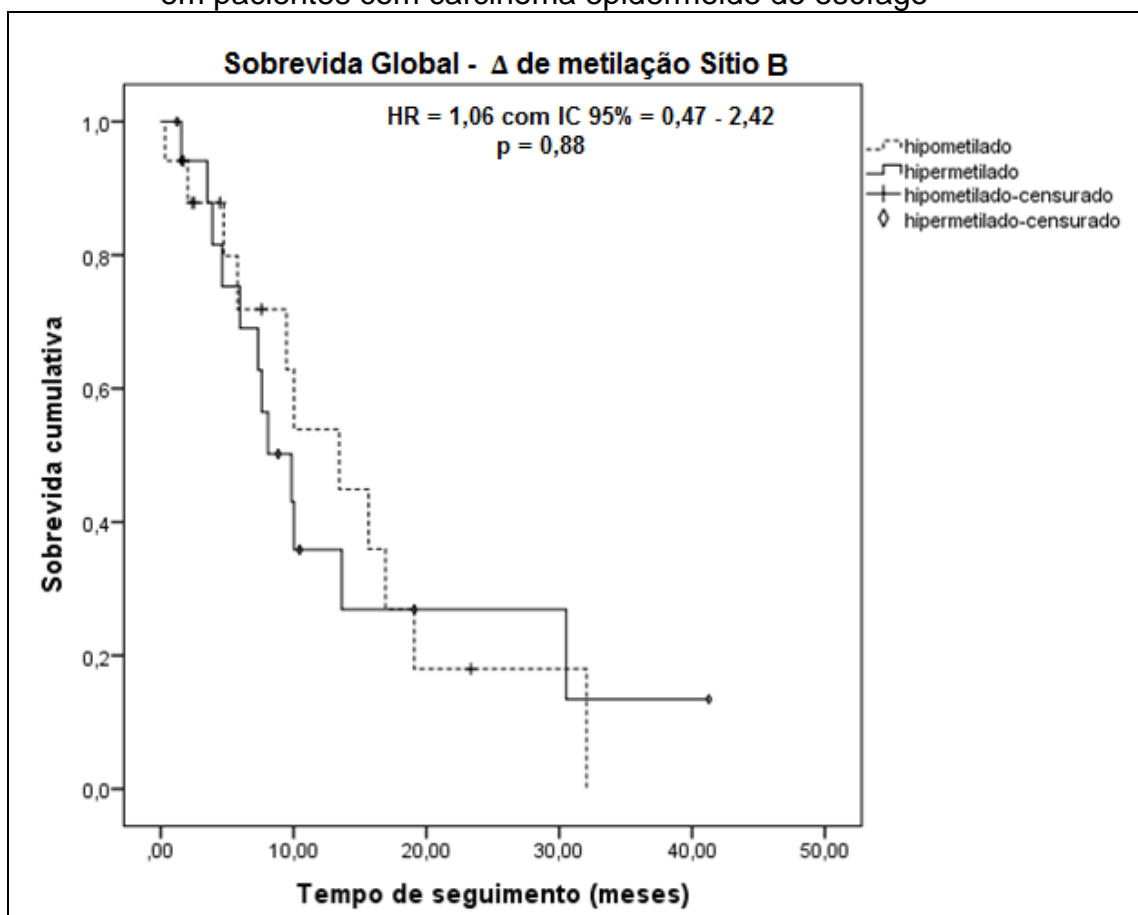
indivíduos classificados como hipometilados (não houve sobreviventes),  $p=0,01$  (Figura 34).

Figura 32 - Curva de sobrevida global em relação à metilação do Sítio A de *SPRR3* em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



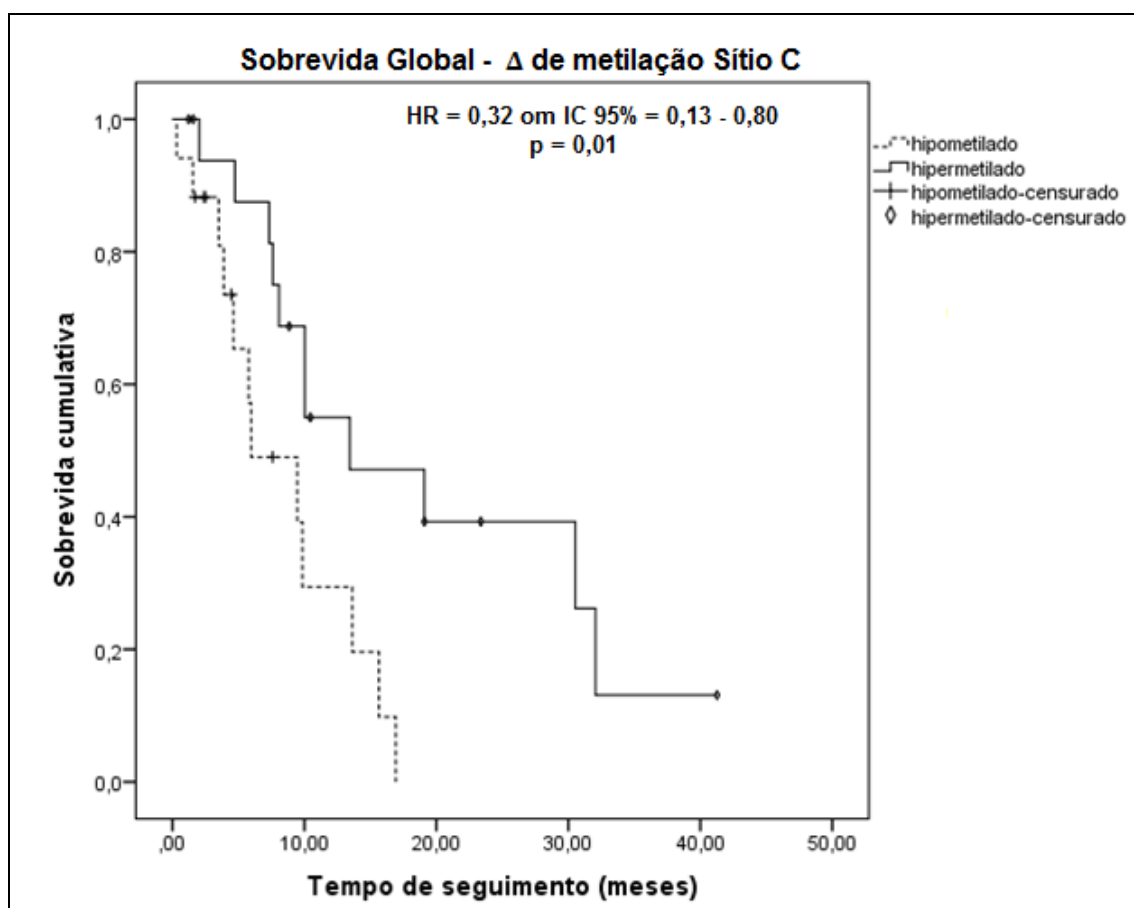
Legenda: O critério utilizado para análise de sobrevida foi a mediana do delta de metilação para o Sítio A. O valor da mediana do delta de metilação foi 21,4. HR = *harzard ratio*; IC = intervalo de confiança.

Figura 33 - Curva de sobrevida global em relação à metilação do Sítio B de *SPRR3* em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: O critério utilizado para análise de sobrevida foi a mediana do delta de metilação para o Sítio B. O valor da mediana do delta de metilação foi 23,39. HR = *hazard ratio*; IC = intervalo de confiança.

Figura 34 - Curva de sobrevida global em relação à metilação do Sítio C de *SPRR3* em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: O critério utilizado para análise de sobrevida foi a mediana do delta de metilação para o Sítio C. O valor da mediana do delta de metilação foi 8,16. HR = *hazard ratio*; IC = intervalo de confiança.

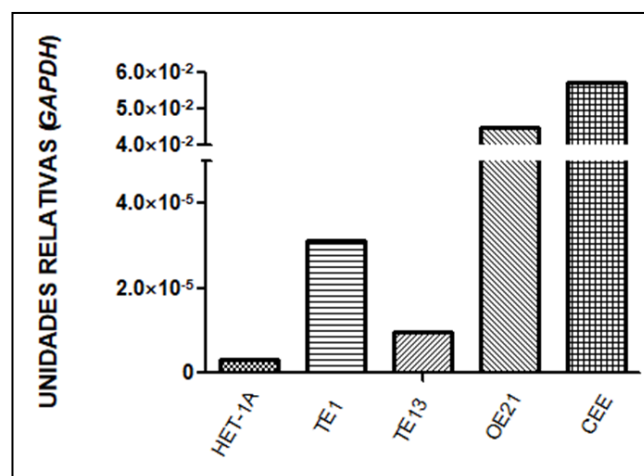
### 3.3.4 Linhagem celular

Com base nos dados obtidos em análises *in vivo*, podemos sugerir a participação da metilação do DNA como um possível mecanismo envolvido na

diminuição da expressão de *SPRR3* em CEE. Nosso passo seguinte foi confirmar o envolvimento das *DNMTs* na metilação de *SPRR3*, mediante o tratamento das células com agente inibidor da função das *DNMTs*. Para isto, as células foram tratadas com agente demetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina a fim de verificarmos se haveria diminuição dos níveis de metilação e retomada da expressão de *SPRR3*.

Primeiramente identificamos o perfil de expressão de *SPRR3* em quatro linhagens celular provenientes de mucosa esofágica humana, sendo uma obtida de linhagem celular livre de neoplasia (HET-1A) e três obtidas a partir de CEE (TE-1, TE-13 e OE21) (Figura 35). Foi observado que TE-13 foi a linhagem celular tumoral que expressou menores níveis de *SPRR3* ao passo que a OE21 apresentou maiores níveis detectáveis. As células HET-1A, que é uma linhagem proveniente de tecido esofágico livre de neoplasia, não apresentou níveis elevados de *SPRR3*. Na figura 35 podemos comparar os níveis de expressão encontrados para cada linhagem testada e em amostras frescas tumorais de pacientes com CEE, mostrando que a linhagem OE21 apresenta níveis de expressão similares aos de amostras tumorais de pacientes. Por esse motivo, selecionamos a OE21 para os experimentos *in vitro* iniciais.

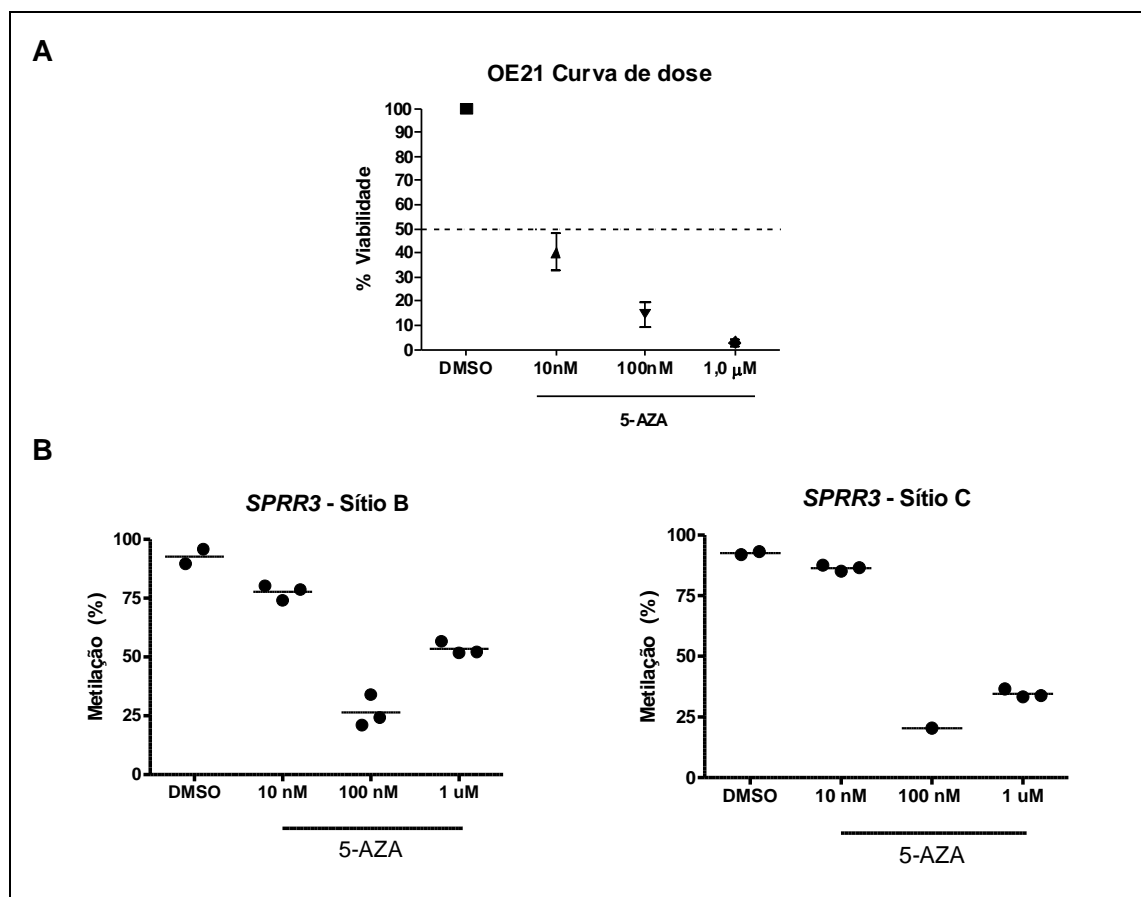
Figura 35 - Perfil de expressão de *SPRR3* em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago



Legenda: Níveis de expressão de *SPRR3* em linhagens celulares provenientes de mucosa esofágica, tanto tumoral quanto saudável, e em amostras de pacientes diagnosticados com CEE. qPCR realizado em triplicata (média dos valores).

O tratamento da linhagem OE21 com o agente demetilante 5-Aza-2'-desoxicitidina foi feito inicialmente com concentrações de 10 nM, 100 nM e 1  $\mu$ M por 6 dias (144 horas), com o objetivo de determinar a melhor dose da droga que apresentasse menores níveis tóxicos e o maior efeito de demetilação. Foi observado que a dose de 100 nM, apesar de ter causado a maior demetilação dos sítios CpGs avaliados em *SPRR3* na linhagem OE21, (Figura 36-B), se mostrou bastante tóxica nesse tempo de tratamento, apresentando média de viabilidade celular de apenas 11% (Figura 36-A). Não foi possível avaliar os sítios de metilação do sítio A, uma vez que a reação de pirosequenciamento não funcionou em nenhuma condição testada.

Figura 36 - Viabilidade celular e perfil de metilação dos sítios B e C de *SPRR3* em linhagem celular de carcinoma epidermoide de esôfago

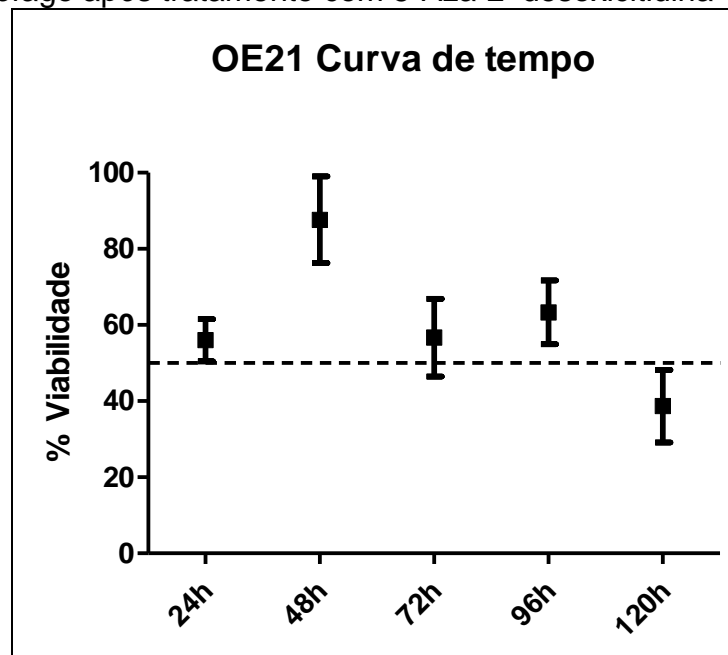


Legenda: (A) Porcentagem de células viáveis nas doses de 10 nm, 100 nm e 1 $\mu$ M, após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina por 144 horas; (B) e (C): Percentual de metilação de *SPRR3* nos sítios B e C, respectivamente, nas doses testadas. Linhagem celular de carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) OE21. Experimentos em triplicata.

Visto que a dose de 100 nM levou a uma demetilação expressiva, mas altamente tóxica no tempo de 144 horas, foi então realizado o tratamento com 5-aza-

2'-desoxicitidina nessa concentração, com menores intervalos de tempo (24 – 120h). A figura 37 mostra gráfico de viabilidade celular referente ao tratamento estabelecido, mostrando que todos os tempos, com exceção de 120h, apresentaram viabilidade celular superior a 50% em relação ao controle.

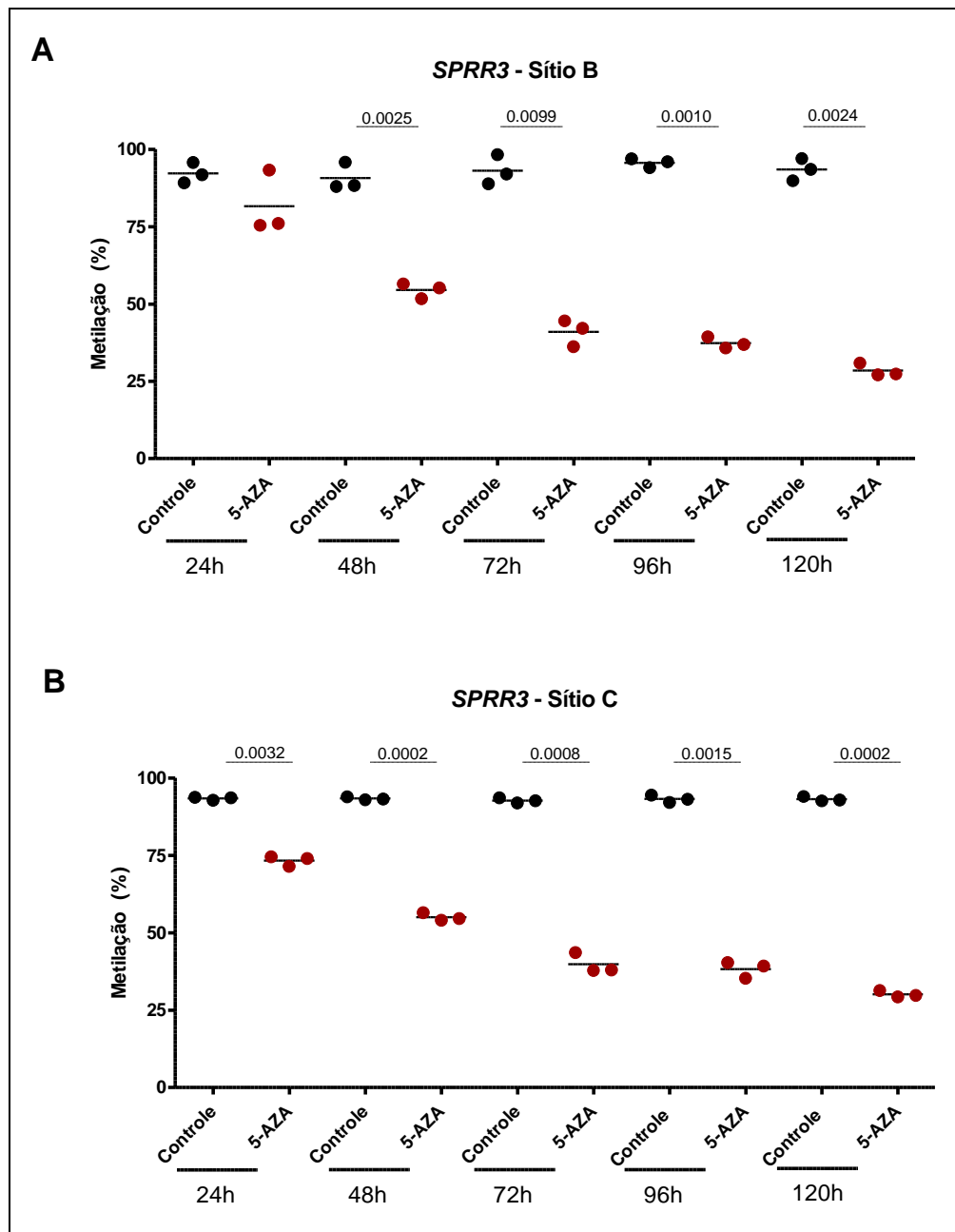
Figura 37 - Viabilidade celular em linhagem celular de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina



Legenda: Contagem de células viáveis nos diferentes tempos (24h, 48h, 72h, 96h e 120h) na dose de 100 nM. Linhagem celular de carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) OE21. Experimento realizado em triplicata.

Na figura 38 pode-se observar a demetilação de *SPRR3* na linhagem OE21 provocada pelo tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina ao longo do período avaliado, mostrando que a partir de 72h o perfil de demetilação observado é semelhante em todos os tempos que se sucederam. Para Sítio B foi observada diminuição estatisticamente significativa da metilação nas amostras tratadas com o agente em relação ao controle, a partir de 48h (48h,  $p=0,0025$ ; 72h,  $p=0,0099$ ; 96h,  $p=0,0010$  e 120h,  $p=0,0024$ ) (Figura 38-A). Quanto ao sítio C, foi observada diminuição significativa em todos os tempos avaliados (24h,  $p=0,0032$ ; 48h,  $p=0,0002$ ; 72h,  $p=0,0008$ ; 96h,  $p=0,0015$  e 120h,  $p=0,0002$ ) (Figura 38-B). Não foi possível avaliar o sítio A, como dito anteriormente, pois a reação de pirosequenciamento não funcionou.

Figura 37 - Perfil de metilação dos sítios B e C de *SPRR3* em linhagem de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina

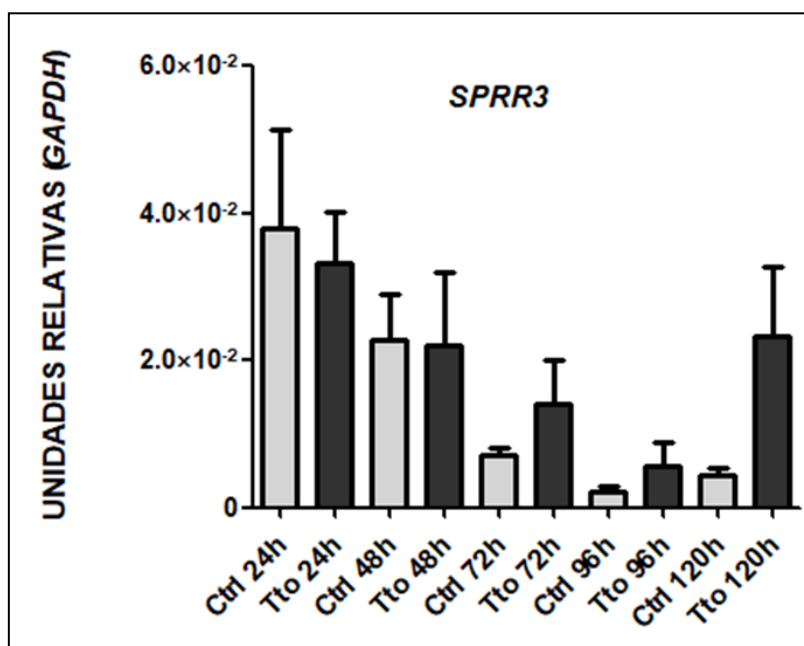


Legenda: A) Percentual de metilação do sítio B de *SPRR3* em linhagem celular OE-21 em tempos de 24 a 120 horas de tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 100 nM. B) Percentual de metilação do sítio C de *SPRR3* em linhagem celular OE-21 em tempos de 24 a 120 horas de tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 100 nM. Os valores de p significativos encontram-se no gráfico.



A fim de avaliar se o perfil de expressão gênica se alterava pela metilação, foi feita reação de qPCR nessas linhagens e foi observado um aumento dos níveis de expressão de *SPRR3*, embora não estatisticamente significativo, nas linhagens que foram tratadas com o agente demetilante nos tempos de 72h, 96h e 120h (Figura 39).

Figura 39 - Expressão de *SPRR3* em linhagem de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina



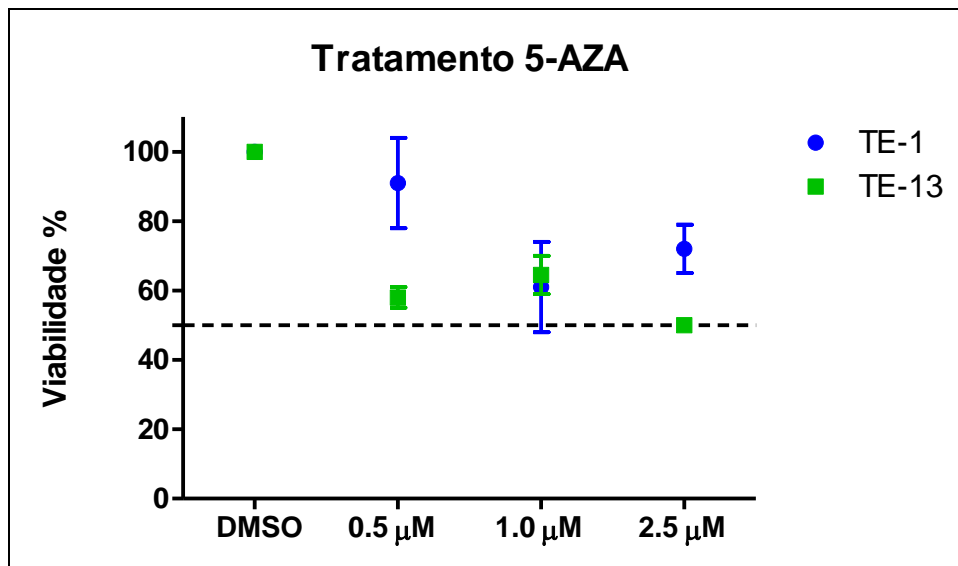
Legenda: Expressão do gene *SPRR3* em cada tempo avaliado (24h, 48h, 72h, 96h e 120h) na dose 100 nM em linhagem celular de carcinoma epidermoide esôfago OE21. Experimento realizado em triplicata. Não foram observados valores de  $p < 0,05$ .

Com o intuito de avaliar se a demetilação promovida pelo tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina também seria capaz de reestabelecer a expressão de *SPRR3* em outras linhagens de CEE, realizamos o tratamento nas linhagens TE-1 e TE-13. Pelos resultados obtidos com a linhagem OE21 nesse trabalho e pelos dados observados em outros trabalhos do nosso grupo, o tempo de tratamento selecionado foi o de 72h.

Entretanto, conforme dados obtidos em experimentos prévios realizados em nosso grupo, foi mostrado que a dose de 0,1  $\mu$ M (100 nM) não foi capaz de promover o mesmo efeito observado na linhagem OE21 nas linhagens TE-1 e TE-13, sugerindo que essas células sejam menos sensíveis ao tratamento com esse agente. Portanto, o tratamento com o 5-Aza-2'-desoxicitidina foi realizado em

concentrações maiores, 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , e 2,5  $\mu\text{M}$  no tempo selecionado de 72h, conforme mencionando anteriormente. Após o tratamento, foi avaliada a viabilidade celular das linhagens tratadas e tanto a TE1 quanto a TE13 apresentaram viabilidade acima de 50% em todas as doses administradas (Figura 40).

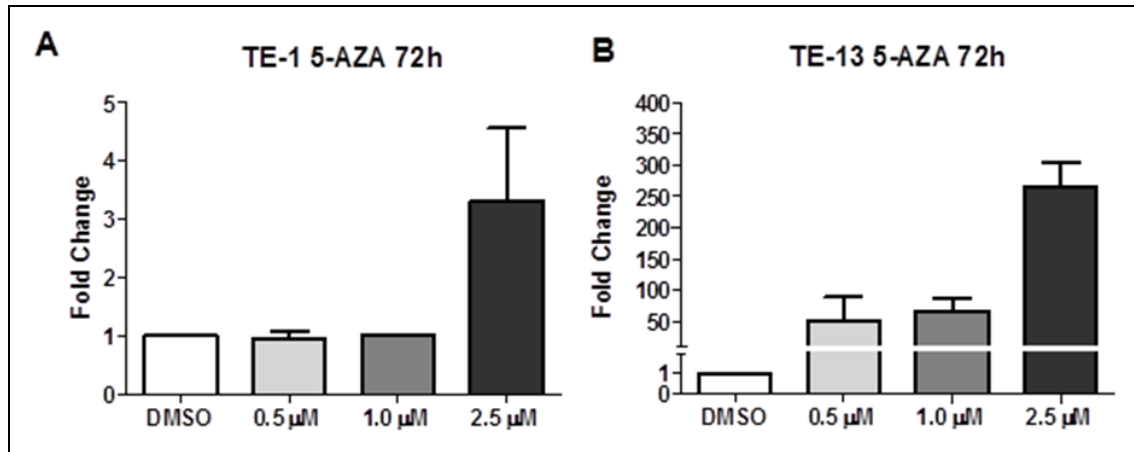
Figura 40 - Viabilidade celular em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina



Legenda: Contagem de células de carcinoma epidermoide de esôfago (OE21) viáveis após tratamento por 72h com 5-Aza-2'-desoxi nas doses testadas (0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , e 2,5  $\mu\text{M}$ ). Experimento realizado em triplicata.

Com a finalidade de verificarmos se o tratamento impactou na expressão de SPRR3, realizamos o ensaio de qPCR e somente o tratamento com a dose de 2,5  $\mu\text{M}$  apresentou aumento de expressão de SPRR3 nas linhagens tratadas em relação ao controle, embora sem a possibilidade de realizar teste estatístico visto o número de replicatas biológicas (Figura 41).

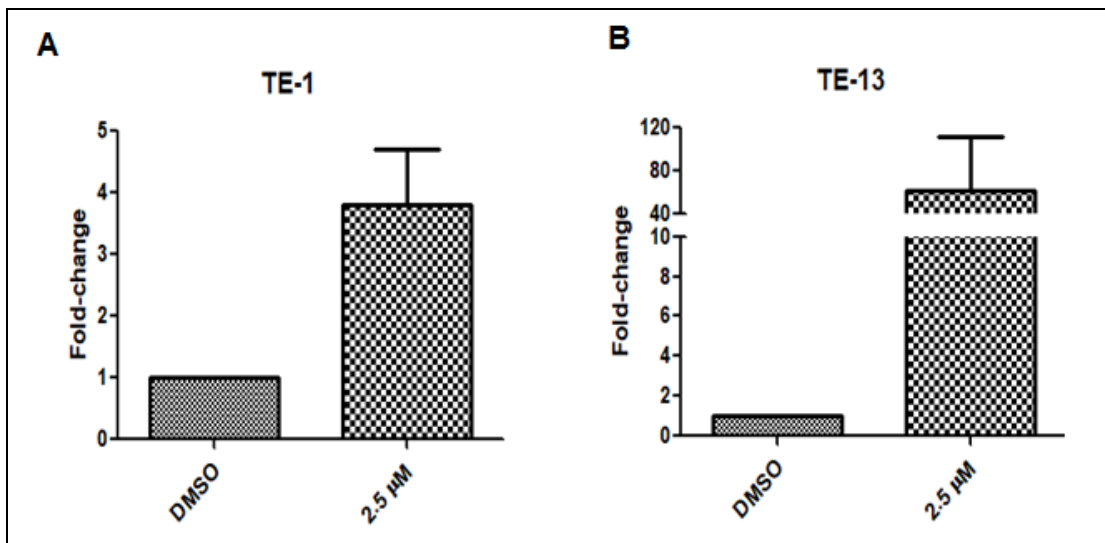
Figura 41 - Variação da expressão de *SPRR3* em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina



Legenda: Avaliação da expressão do gene *SPRR3* em cada linhagem celular de carcinoma epidermoide de esôfago, TE1 e TE13 (A e B, respectivamente), mediante ao tratamento por 72h com agente demetilante em diferentes doses (0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, e 2,5  $\mu$ M). Valores relativos ao controle em cada dose avaliada. Experimento realizado em triplicata.

Pelo exposto anteriormente, a dose de 2,5  $\mu$ M foi a escolhida para dar prosseguimento aos demais experimentos com as linhagens TE1 e TE13. Em relação aos níveis de expressão de *SPRR3*, não foi observada significância estatística entre o controle e a linhagem celular TE1 ( $p = 0,0536$ ), nem para a linhagem celular TE13 ( $p = 0,0625$ ), quando tratadas com o agente demetilante, embora tenha sido possível notar a expressão aumentada de *SPRR3* (cerca de 4 vezes mais na TE1 e cerca de 60 vezes mais na TE13), sugerindo um possível papel desse mecanismo epigenético na regulação da expressão desse gene (Figura 42).

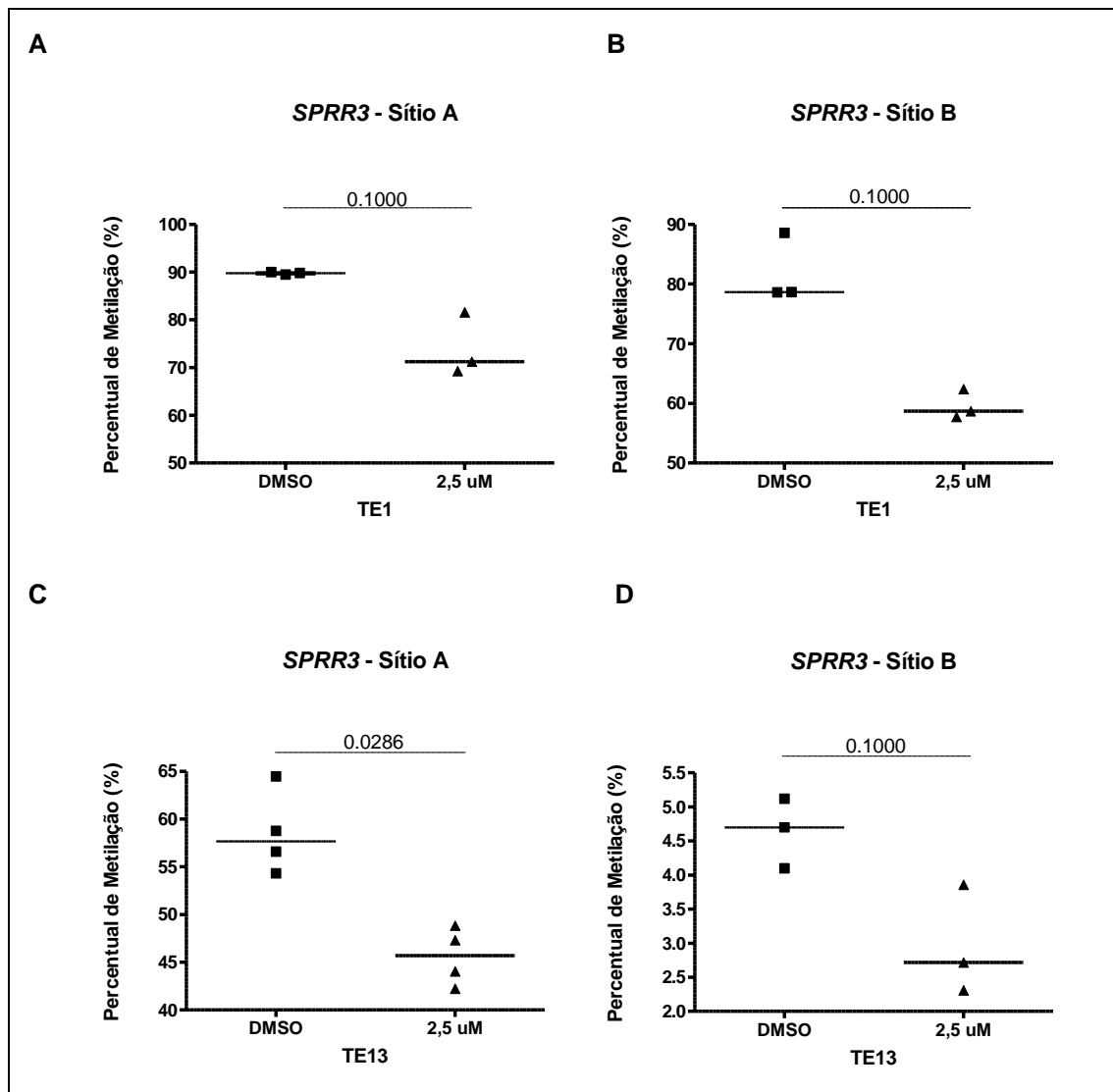
Figura 42 - Variação da expressão de *SPRR3* em linhagens celulares de CEE tratadas com 5-Aza-2'-desoxicitidina



Legenda: Expressão de *SPRR3* nas linhagens TE-1 e TE-13 de CEE mediante ao tratamento com agente demetilante na dose 2,5 μM. A) Fold Change de expressão de *SPRR3* em linhagem TE-1 ( $p = 0,0536$ ). Embora tenha sido observado um aumento da expressão, este não foi estatisticamente significativo. B) Fold Change de expressão de *SPRR3* em linhagem TE-13. Assim como para TE-1, também observamos um aumento da expressão, porém não foi estatisticamente significativo ( $p = 0,0625$ ). Experimento realizado em triplicata.

O tratamento com 2,5 μM de 5-Aza-2'- desoxicitidina promoveu aparente demetilação de *SPRR3* nas linhagens TE-1 e TE-13, no entanto, este efeito apenas foi estatisticamente significativo para Sítio A na linhagem TE-13,  $p = 0,0286$  (Figura 43).

Figura 43 - Perfil de metilação dos sítios A e B de *SPRR3* em linhagens de carcinoma epidermoide de esôfago após tratamento com 5-Aza-2'-desoxicitidina



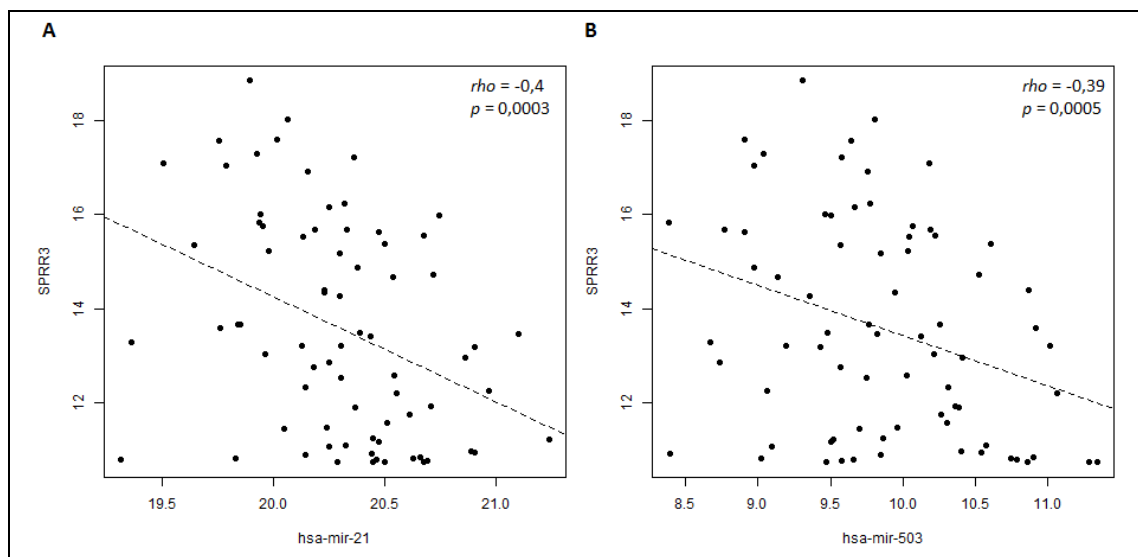
Legenda: A) Percentual de metilação do sítio A de *SPRR3* em linhagem celular TE-1 tratada com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 2,5 μM. B) Percentual de metilação do sítio B de *SPRR3* em linhagem celular TE-1 tratada com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 2,5 μM. C) Percentual de metilação do sítio A de *SPRR3* em linhagem celular TE-13 tratada com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 2,5 μM. D) Percentual de metilação do sítio B de *SPRR3* em linhagem celular TE-13 tratada com 5-Aza-2'-desoxicitidina na dose de 2,5 μM. Os valores de p significativos encontram-se no gráfico.

Diante do exposto, nossos dados sugerem que a diminuição da expressão de *SPRR3* está correlacionada com metilação do DNA promovida pelas *DNMTs*.

#### 3.4 Identificação de Potenciais miRNAs Ligantes a *SPRR3*

Em seguida, avaliamos se outro componente da maquinaria epigenética poderia estar contribuindo para o silenciamento de *SPRR3* em CEE. A análise utilizando dados de 94 amostras de CEE e 3 amostras de tecido adjacente ao tumor depositados no TCGA identificou 55 miRNAs diferencialmente expressos em CEE, sendo 29 miRNAs super-expressos e 26 miRNAs sub-regulados. Com esse dado em mãos analisamos se a expressão gênica de *SPRR3* estava correlacionada com a expressão dos 29 miRNAs superexpressos em CEE. Para esta análise foram utilizados 74 dos 94 casos anteriormente citados, devido à disponibilidade de informação sobre expressão de *SPRR3* e dos supracitados miRNAs. Foi observada correlação inversa entre expressão de *SPRR3* e hsa-miRNA-21 ( $p=0,0004$ ;  $r=-0,4$ ) e hsa-miRNA-503 ( $p=0,0005$ ;  $r=-0,39$ ) (Figura 44).

Figura 44 - Correlação entre expressão de dois miRNAs super-expressos em CEE e expressão gênica de *SPRR3*



Legenda: A) Correlação encontrada entre expressão do miRNAa-21 e expressão gênica de *SPRR3* utilizando dados de amostras de CEE depositados no TCGA. B) Correlação encontrada entre expressão do miRNAa-21 e expressão gênica de *SPRR3* utilizando dados de amostras de CEE depositados no TCGA.

Utilizando a base de dados Mirwalk, *SPRR3* não consta como alvo predito do miR-21, porém foi identificada como alvo de miRNA-503 em três diferentes bancos (hsa-miRNA-503-3p: RNA Hybrid e hsa-miRNA-503-5p: miRmap, RNA22 e RNA

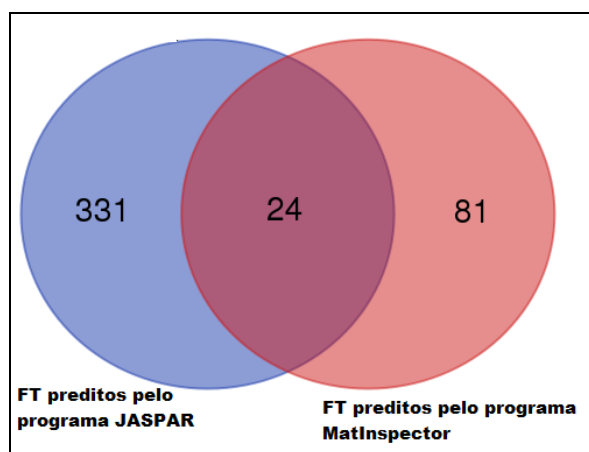
Hybrid). Desta forma, nossos dados sugerem uma possível participação dos miR-21 e miR-503 na regulação da expressão de *SPRR3* em CEE.

### 3.5 Identificação De Potenciais Fatores de Transcrição Associados à Expressão de *SPRR3*

A fim de predizermos quais fatores de transição (FT) se ligariam ao promotor de *SPRR3*, realizamos análise *in silico* utilizando os programas MatInspector e JASPAR2016.

Segundo o JASPAR2016 foram identificados 355 FT com regiões de ligação no promotor de *SPRR3*, enquanto que o programa MatInspector identificou 105 FT com elementos responsivos na sequência do promotor deste gene. A interseção entre os dados gerados por ambos os programas resultou em 24 FT em comum (Figura 45).

Figura 45 - Número de potenciais fatores de transcrição de *SPRR3* identificados pelos programas MatInspector e JASPAR



Legenda: Cruzando os dados gerados pelos programas MatInspector e JASPAR, foram identificados 24 fatores transcricionais que se ligariam a *SPRR3*.

Tendo em mãos os dados de transcriptoma (RNA-Seq) gerados pelo nosso grupo, de amostras pareadas de CEE e de mucosa esofágica de indivíduos saudáveis, fizemos uma análise de correlação entre a expressão desses 24 genes identificados com a expressão de *SPRR3*. Treze destes genes apresentaram correlação estatisticamente significativa com a expressão de *SPRR3* (Figura 46), dos quais dois (*PRDM1* e *MEIS1*) apresentaram correlação positiva e onze

apresentaram correlação inversa (*SPI1*, *GATA3*, *SRF*, *NFE2*, *MSX2*, *RFX5*, *TBX20*, *CEBPB*, *FOSL1*, *PLAG1*, *TEAD4*). Para os treze genes, igualmente avaliamos a correlação entre a expressão destes e *SPRR3* utilizando dados depositados no banco de dados The Cancer Genome Atlas (TCGA) e encontramos as seguintes correlações: *PRDM1*  $r=0,38$ ,  $p=0,0032$ ; *SPI1*  $r=-0,41$ ,  $p=0,012$ ; *GATA3*  $r=-0,26$ ,  $p=0,06$ ; *SRF*  $r=0,48$ ,  $p=0,9$ ; *MSX2*  $r=-0,11$ ,  $p=0,56$ ; *NFE2*  $r=-0,15$ ,  $p=0,374$ ; *RFX5*  $r=-0,20$ ,  $p=-0,20$ , *MEIS1*  $r=0,15$ ,  $p=0,37$ ; *TBX20*  $r=-0,01$ ,  $p=0,96$ ; *CEBPB*  $r=-0,14$ ,  $p=0,40$ ; *FOSL1*  $r=0,01$ ,  $p=0,96$ ; *PLAG1*  $r=-0,02$ ,  $p=0,92$ ; *TEAD4*  $r=-0,27$ ,  $p=0,055$ .

Além disso, todos apresentaram diferença de expressão entre tecido tumoral e tecido adjacente ao tumor. Dois genes (*PRDM1* e *MEIS1*) apresentaram menor expressão no tumor quando comparado com a mucosa adjacente e os demais genes apresentaram maior expressão no tumor em relação a mucosa adjacente (Tabela 7).

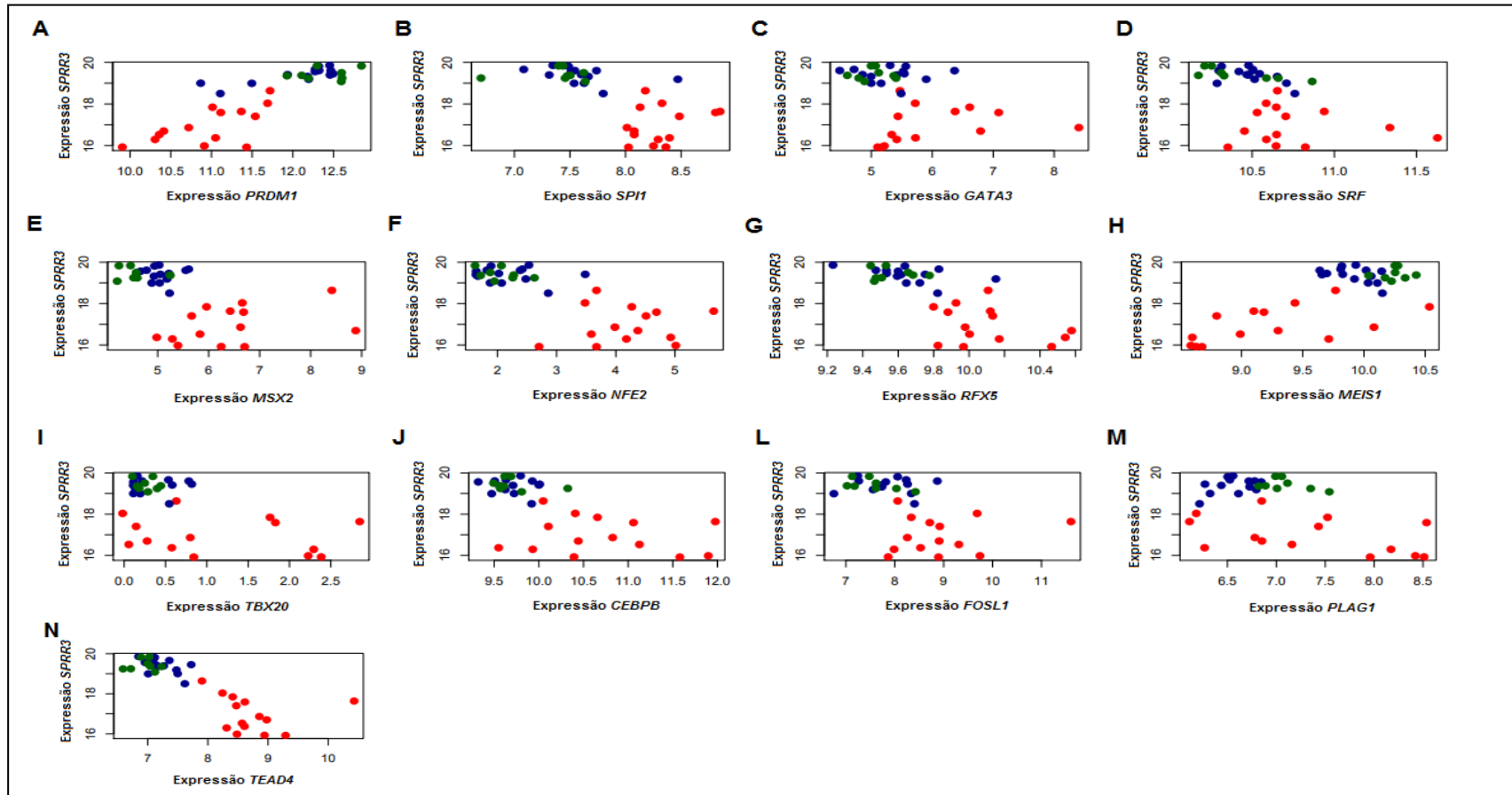
Tabela 7 - Relação dos treze fatores de transcrição identificados e sua variação na expressão gênica em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago

Genes		log2 Fold Change	P
<b><i>PRDM1</i></b>	PR Domain Containing 1	-1,66	<0,0001
<b><i>SPI1</i></b>	Spi-1 Proto-Oncogene	1,07	<0,0001
<b><i>GATA3</i></b>	GATA Binding Protein 3	0,88	0,018
<b><i>SRF</i></b>	Serum Response Factor	0,48	0,009
<b><i>MSX2</i></b>	Msh Homeobox 2	2,20	<0,0001
<b><i>NFE2</i></b>	Nuclear Factor, Erythroid 2	3,76	<0,0001
<b><i>RFX5</i></b>	Regulatory Factor X5	0,72	<0,0001
<b><i>MEIS1</i></b>	Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1 Homolog	-0,80	0,005
<b><i>TBX20</i></b>	T-Box Protein 20	3,29	0,001
<b><i>CEBPB</i></b>	CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta	1,86	<0,0001
<b><i>FOSL1</i></b>	FOS Like 1, AP-1 Transcription Factor Subunit	1,29	0,0002
<b><i>PLAG1</i></b>	Pleiomorphic Adenoma Gene 1	1,63	<0,0001
<b><i>TEAD4</i></b>	TEA Domain Transcription Factor 4	2,49	<0,0001

Legenda: A variação de expressão foi normalizada na escala e log 2, que é a razão da expressão gênica entre amostra tumoral e tecido adjacente ao tumor (análise de transcriptoma por RNA-seq).



Figura 46 - Correlações entre expressão de *SPRR3* e 13 fatores de transcrição



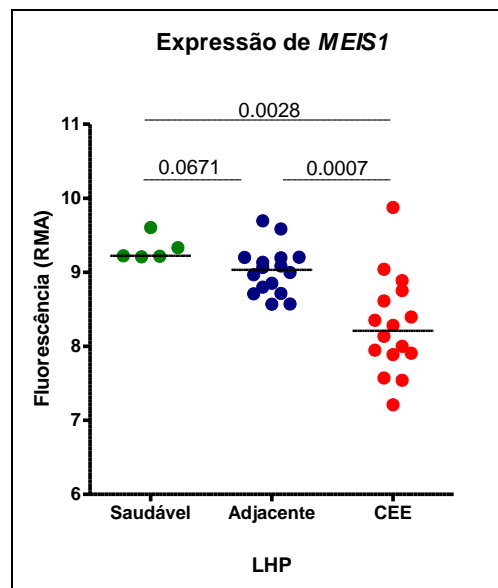
Legenda: Treze fatores de transcrição foram selecionados mediante valor de p encontrado nas correlações com a expressão de *SPRR3* obtidas na análise feita a partir dos dados gerados pelo transcriptoma (RNA-Seq) realizado pelo nosso grupo. Pontos verdes correspondem a amostras livres de neoplasia, pontos azuis correspondem a amostras provenientes de tecido adjacente ao tumor e os pontos vermelhos correspondem ao tecido tumoral.

Visando integrar os dados obtidos nas análises preditorias de miRNA e de fatores de transcrição e tendo conhecimento que o miR-21 apresentou correlação negativa com expressão de *SPRR3*, mas que o RNA mensageiro deste gene não possui elemento responsivo à sequência do miR-21, procuramos nos 13 FT identificados quais seriam possíveis alvos deste miRNA.

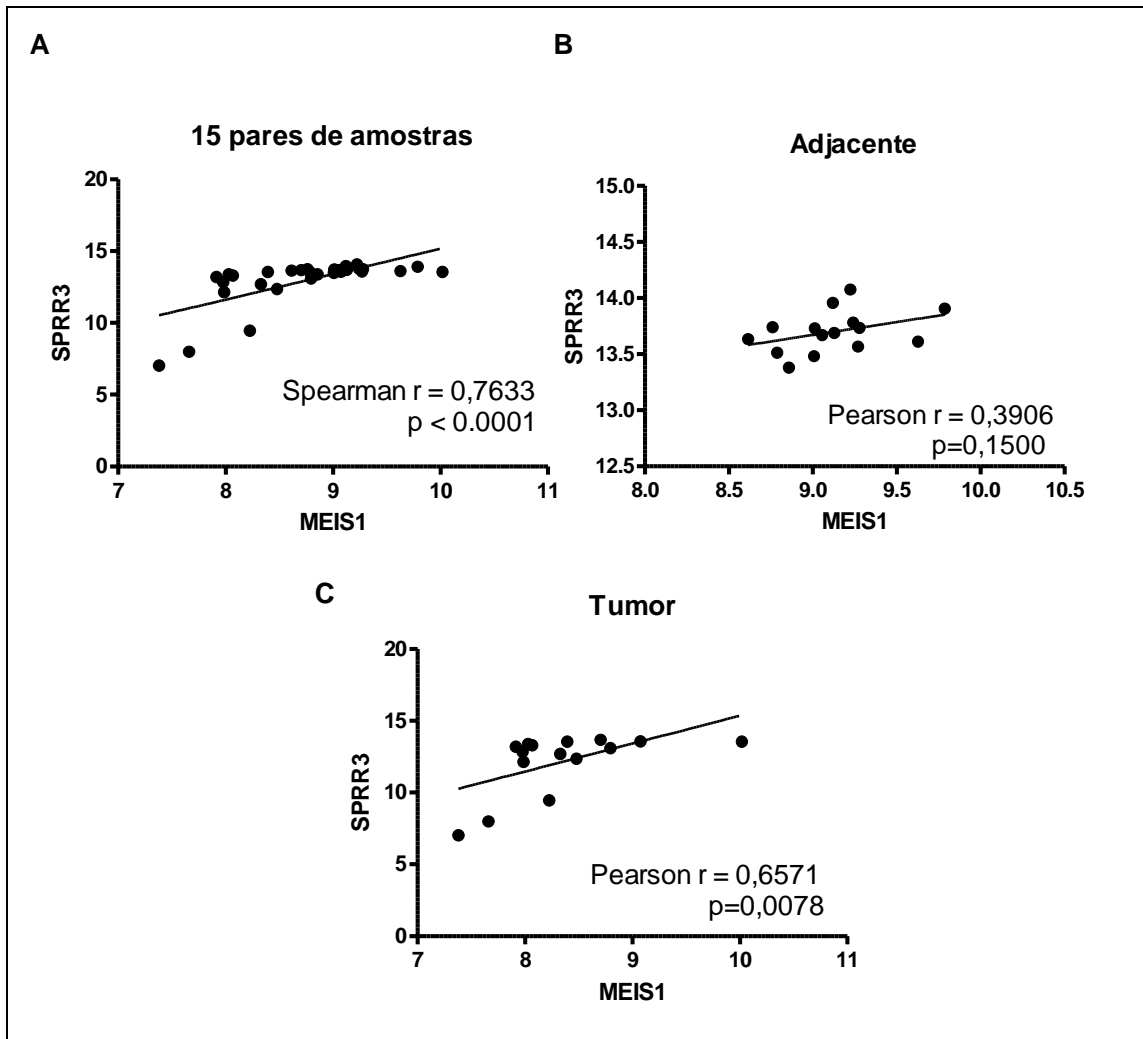
O único gene *downregulado* em CEE e alvo do miR-21 na relação dos FT listados foi o *MEIS1* (Myeloid ecotropic viral integration site 1), membro da família dos genes homeobox e que desempenham papéis cruciais no desenvolvimento embrionário (Figura 47).

Conforme observado na figura 46H, a expressão de *MEIS1* está positivamente correlacionada com a expressão de *SPRR3* ( $p= 0,0008$  e  $r= 0,54$ ). Essa correlação foi confirmada num set de dados produzidos pela análise de transcriptoma de microarranjo de DNA também realizada pelo nosso grupo ( $p= 0,0008$  e  $r= 0,76$ ). Avaliamos também a correlação em amostras tumorais e em amostras adjacentes separadamente, essa análise mostrou correlação significativa somente em amostras tumorais ( $p=0,0078$  e  $r= 0,66$ ), sugerindo um fenômeno exclusivo tumoral (Figura 48).

Figura 47 - Perfil de expressão de *MEIS1* utilizando valores gerados pela análise de transcriptoma



Legenda: Perda de expressão de *MEIS1* em amostras com carcinoma epidermoide de esôfago. LHP= Laudo Histopatológico. RMA = *Robust Multiarray Average*. Dados gerados pela técnica de microarranjo de DNA.

Figura 48 - Correlação entre expressão gênica de *SPRR3* e *MEIS1* em CEE

Legenda: A) Correlação entre expressão de *SPRR3* e *MEIS1* utilizando dados de transcriptoma gerados por microarranjo de DNA de amostras tumorais e amostras adjacentes ao tumor. B) Correlação entre expressão de *SPRR3* e *MEIS1* utilizando dados de amostras provenientes de tecido adjacente ao tumor C) Correlação entre expressão de *SPRR3* e *MEIS1* utilizando dados de amostras de tumor.

Também integramos os dados gerados pelas análises de identificação de fatores de transcrição e a localização dos sítios CpGs avaliados neste trabalho. Utilizamos como referências para esta análise, as sequências NC\_000001.11 Cromossomo 1, Hg19 (152973500 – 152975000) e Hg38 (153001024 – 153002524). O sítio A situa-se na posição 152973880, enquanto que o sítio B situa-se na posição 152973958 e sítio C na posição 152974771. Dentre todos os 13 fatores transcricionais avaliados, apenas *MEIS1* e *GATA3* possuem sequências preditas de ligação em regiões do DNA que contemplam localização de sítios CpGs. Sendo o *MEIS1* (GAGCCAG, sequência predita de ligação) ligando-se à região em que se

localiza o sítio B avaliado neste trabalho e o gene *GATA3* ligando-se à região em que se localiza o sítio C (CGATGA, sequência predita de ligação).

## 5 DISCUSSÃO

A capacidade de proliferar somada ao adequado controle do ciclo celular e a parada do processo de diferenciação terminal, são essenciais para a manutenção da auto renovação tecidual (MORRISON & SPRADLING, 2008). Durante o processo de diferenciação epitelial, modificações no perfil de expressão gênica são cruciais para alterar o equilíbrio entre diferenciação e proliferação, podendo resultar muitas vezes, no desenvolvimento de patologias, como o câncer (SEN *et al.*, 2010).

SPRR3, como já mencionado, é uma proteína associada ao processo de diferenciação epitelial e sua expressão diferencial já foi observada em diversas patologias (FISCHER *et al.*, 1999; BLANCHARD *et al.*, 2010; CHO *et al.*, 2010; ELIAS *et al.*, 2014; SEGEDY *et al.*, 2014). Em câncer de esôfago, um tumor agressivo e letal, é observada a perda de expressão gradual ao longo da transformação neoplásica, o que sugere uma participação no processo de carcinogênese esofágica (Simão *et al.*, 2011). Pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão deste gene, logo, este trabalho visou investigar possíveis mecanismos envolvidos nesta regulação.

Como já dito anteriormente, o câncer de esôfago encontra-se entre os dez tipos de tumores mais frequentes e mortais (FERLAY *et al.*, 2015), refletindo péssimo prognóstico (MAO *et al.*, 2011; FERLAY *et al.*, 2010; ENZINGER & MAYER *et al.*, 2003). Nossos dados mostraram que apenas 21,8% dos pacientes incluídos neste estudo estavam vivos aos 24 meses de seguimento e menos de 10% estavam vivos no final dos 41 meses de acompanhamento. Os pacientes foram em sua maioria indivíduos do sexo masculino, com mediana de idade de 60 anos, tabagistas e etilistas ativos. Quanto ao tumor, o principal terço acometido foi o terço médio, a maioria foi moderadamente diferenciado e de estadiamento avançado (III e IV). Estas características observadas em nossa população são similares às descritas para CEE em outros trabalhos (SHI, *et al.*, 2014; ARNOLD, *et al.*, 2015).

Em 2011 foi publicado pelo nosso grupo, o primeiro trabalho que avaliou os níveis de expressão de *SPRR3* utilizando a técnica de qPCR e, os dados obtidos nesse trabalho validaram esses achados (SIMÃO *et al.*, 2011), mostrando que *SPRR3* foi menos expresso em amostras de CEE quando comparadas com as

amostras adjacentes ao tumor. Logo, nos questionamos quanto aos possíveis mecanismos envolvidos no silenciamento de *SPRR3*.

Já foi descrito o envolvimento de diversos fatores exógenos e endógenos na regulação da transcrição de genes associados ao processo de diferenciação epitelial. O presente estudo avaliou a possível influência de fatores endógenos na regulação da expressão de *SPRR3*, incluindo alterações epigenéticas, onde a metilação do DNA e a regulação por miRNAs foram abordadas neste estudo, e também a possível atuação de fatores de transcrição. A literatura científica carece de estudos que explorem os diferentes mecanismos que atuam na regulação expressão de *SPRR3*, o que ressalta a urgência no desenvolvimento de novos estudos acerca deste tema e destaca a importância do presente trabalho. Em conjunto, a existência de alguns trabalhos que já citaram o mecanismo de metilação relacionado a *SPRR3* (AMMERPOHL *et al.*, 2012; MAYOL *et al.*, 2012) somando-se às observações de dados gerados por trabalho prévio do nosso grupo que avaliou metiloma do CEE (LIMA *et al.* 2011), inicialmente nossa investigação pelo mecanismo de metilação do DNA. Alguns estudos em CEE já mostraram a hipermetilação em genes supressores tumorais, como por exemplo, *CDKN2A*, *MGMT*, *hMLH1* (Wang *et al.*, 2008; ALHEJAILY *et al.*, 2014; SIPPL *et al.*, 2017), e em trabalho publicado por nosso grupo em 2011 foram identificadas, por meio de análise em larga escala, assinaturas distintas de metilação do DNA em amostras de tumor em relação ao tecido adjacente, bem como entre tecido saudável e tecido adjacente ao tumor. Foram observadas alterações no perfil de metilação em genes associados à inflamação (por exemplo *IL-10* e *IL-6*), adesão (por exemplo, *DSG1*) diferenciação celular (por exemplo, *KRT13*). Portanto, os achados observados neste trabalho sugerem que a desregulação epigenética parece estar envolvida em etapa precoce do desenvolvimento do CEE (LIMA *et al.*, 2011).

Uma vez que a perda de *SPRR3* parece ser um evento importante e precoce na carcinogênese esofágica, fomos avaliar a metilação do DNA como possível mecanismo regulador desse gene. Em uma análise preliminar, investigamos se *SPRR3* apresentava regiões metiladas, analisando dados de metiloma do grupo e observamos um aumento dos níveis de metilação em três regiões de *SPRR3*. Esses resultados foram validados em um grupo maior de amostras avaliadas por pirosequenciamento e correlacionadas negativamente com o resultado da expressão gênica, sugerindo que este mecanismo possa contribuir para a regulação da

expressão deste gene (Figura 25). Até o momento apenas três trabalhos mostraram algum tipo de associação entre metilação e *SPRR3*. Um deles, mostrou o envolvimento da metilação de *SPRR3* na assinatura de padrões específicos ao longo do processo de carcinogênese ao avaliar amostras de tecido hepático normal, tecido hepático de pacientes com cirrose e tecido tumoral. Neste estudo foi observado menor nível de metilação em pacientes diagnosticados com hepatocarcinoma quando comparados a pacientes com cirrose hepática e indivíduos saudáveis (AMMERPOHL *et al.*, 2012). Este trabalho foi de grande relevância, pois em uma avaliação inicial do seu promotor gênico, observamos que *SPRR3* não possuía perfil com ilhas CpGs no promotor, mas sim sítios CpGs isolados. O segundo trabalho identificou assinatura epigenética característica de pacientes com neuroblastoma, o qual identificou hipermetilação em genes envolvidos em processos de desenvolvimento celular e proliferação, por exemplo *RASSF1A* e *HOXD3*, e também identificou hipometilação em genes que já foram descritos alterados em outros tumores, incluindo *SPRR3*, em amostras de pacientes diagnosticados com neuroblastoma (MAYOL *et al.*, 2012). O terceiro trabalho avaliou amostras de pacientes diagnosticados com glioblastoma e observou hipometilação em *SPRR3* em amostras tumorais em comparação a amostras saudáveis, e que, os baixos níveis de metilação estão associados ao pior prognóstico destes pacientes (LIU *et al.*, 2014).

Já foi reportado que a superexpressão das DNMTs desempenham papel fundamental no processo de metilação de DNA em diferentes tumores humanos (RHEE *et al.*, 2002; ESTELLER, 2008). Portanto avaliar o nível de expressão das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* nas mesmas amostras em que foram avaliadas a expressão e a metilação de *SPRR3* foi uma etapa relevante neste estudo, uma vez uma das DNMTs (*DNMT1*) já foi apontada como essencial para o processo de diferenciação epidermal e que sua ausência resulta na diferenciação prematura e perda da capacidade de auto renovação tecidual (SEN *et al.*, 2010). Os resultados obtidos das análises de correlação entre a expressão dessas DNMTs e a expressão e metilação de *SPRR3* corroboram a nossa hipótese de que a metilação é um dos mecanismos de regulação de *SPRR3*.

Alguns estudos têm demonstrado que a expressão aberrante de *DNMTs* contribui para a transformação neoplásica, uma vez que estas proteínas medeiam a metilação de promotores de genes supressores tumorais. Robertson e

colaboradores observaram um aumento de expressão de *DNMTs* em diferentes neoplasias (rim, bexiga e cólon) em relação ao tecido adjacente tumoral (ROBERTSON *et al.*, 1999). Em câncer de orofaringe também já foi observado o aumento de expressão das *DNMTs* em tumor em relação às amostras correspondentes normais, bem como este trabalho sugeriu que a hipermetilação do gene *CDKN2A* e superexpressão das *DNMTs* estão associados à carcinogênese oral (YAKUSHIJI *et al.*, 2003). Zhao e colaboradores descreveram a importância de *DNMT1* no carcinoma epidermoide de esôfago, uma vez que em modelo *knockdown* para *DNMT1*, foi observada hipometilação e re-expressão de genes supressores tumorais (ZHAO *et al.*, 2011). Estes estudos apontaram a relevância das *DNMTs* na carcinogênese de diferentes tumores.

Em seguida, avaliamos se a metilação do DNA de *SPRR3* impactava na sobrevida de pacientes com CEE. O perfil de metilação de *SPRR3*, sítio C, foi capaz de influenciar o prognóstico do paciente, indivíduos com maiores níveis de metilação neste sítio apresentaram melhor prognóstico quando comparados aos indivíduos com valores abaixo da mediana. Após este intrigante resultado, vimos que o sítio C está localizado na região 5'UTR do gene *SPRR3* e o impacto da metilação na região 5'UTR é controverso na literatura. Em um trabalho recente, os autores avaliaram dados de metiloma, obtidos da plataforma *Infinium HumanMethylation450k*, combinados com os dados de transcriptoma, obtidos da plataforma *Affymetrix Human Gene 1.0ST arrays*, com a finalidade de entender a variação no perfil de metilação e o possível impacto na expressão gênica. Os autores mostraram que nas regiões próximas ao início da transcrição (*transcriptional start site* -TSS), a relação entre a metilação do DNA e a expressão gênica foi associada ao silenciamento gênico, por outro lado, a metilação em regiões 5'UTR não mostrou uma relação clara com o perfil de expressão gênica (MARTINO & SAFFERY, 2015). Outro trabalho mostrou que a repressão por metilação no gene que codifica a eritropoietina funciona de duas maneiras, regiões 5'UTR que apresentam alta densidade de metilação, recrutam proteínas que se ligam a DNA metilado (MBP), por outro lado, a metilação em regiões próximas ao promotor atuam bloqueando a associação de proteínas nucleares (YIN & BLANCHARD, 2018).

Além disso, ao avaliarmos a média dos deltas de metilação do DNA de *SPRR3* dos sítios analisados, observamos que o sítio A apresenta uma média de 21,40%, o sítio B de 23,39% e curiosamente o sítio C apresenta uma média de



apenas 8,11%. Esses dados nos mostraram que o tecido adjacente ao tumor já possui um alto perfil de metilação, quando comparado aos demais sítios, sugerindo que a metilação no sítio C ocorra de forma precoce. Outro dado que sustenta nossa hipótese é que, após análise dos dados de metiloma gerados pelo nosso grupo, foi visto que o tecido adjacente ao tumor apresenta maiores níveis de metilação que a mucosa esofágica de indivíduos saudáveis apenas no sítio C. Entretanto é necessário avaliar a metilação da mucosa esofágica de indivíduos saudáveis a fim de confirmar essa hipótese.

Até este ponto do estudo, os resultados obtidos sugerem a expressão de *SPRR3* possa ser regulada negativamente pela metilação do DNA, mediada pela ação das *DNMTs*. Para confirmar o envolvimento das *DNMTs* neste fenômeno, foi realizado tratamento de linhagens celulares de CEE com agente demetilante. A ação deste agente resulta na perda da atuação das *DNMTs*, sendo uma boa abordagem para testarmos nossa hipótese. Portanto, observamos em ensaio *in vitro*, que o agente demetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (AZA) foi capaz de induzir demetilação e aumento da expressão de *SPRR3* nas linhagens de carcinoma epidermoide de esôfago OE21, TE-1 e TE-13, corroborando os achados em amostras humanas, descritos neste trabalho. Recentemente foi visto, através de ensaio em larga escala por RNAseq, que linhagens celulares de câncer de esôfago tratadas concomitantemente com AZA e HDACi (inibidor de histona deacetilase), apresentaram perfil diferencial de expressão gênica quando comparadas ao controle sem tratamento. Dentre os genes diferencialmente expressos, *SPRR3* foi um deles, mostrando-se mais expresso após o tratamento das células (AHRENS *et al.*, 2015). Esses dados confirmam o já mencionado *cross-talk* entre os mecanismos de metilação do DNA e modificações do perfil de histonas, na transcrição gênica (VAISSIERE, SAVAN & HERCEG, 2008). Logo, podemos pensar numa possível interação entre estes mecanismos na regulação de *SPRR3*.

Além da metilação do DNA, outro mecanismo epigenético que já foi descrito por desempenhar importante papel no silenciamento gênico em vários processos biológicos é a regulação da expressão gênica por miRNAs (BARTEL, 2004). Os micro-RNAs pertencem a uma família de pequenos RNAs não codificantes que participam na regulação da expressão de genes envolvidos em diversos processos biológicos incluindo carcinogêneas. Ao longo da última década tem-se observado a desregulação da expressão de miRNAs em diferentes neoplasias (PENG & CROCE,

2015). Explorando mais hipóteses acerca da diminuição da expressão de *SPRR3*, através da realização de análise *in silico* utilizando dados de CEE depositados no TCGA, encontramos dois miRNAs superexpressos (hsa-miR-21 e hsa-miR-503) que apresentaram correlação negativa com a expressão de *SPRR3*. No entanto, apenas miRNA-503 teve como alvo predito a *SPRR3*, ao passo que o miR-21 parece atuar de forma indireta (Figura 41).

Trabalhos já evidenciaram a atuação do miR-503 como um supressor tumoral, por participar do silenciamento de genes que regulam processos de proliferação celular, invasão e migração em diversos tipos tumorais, como câncer de mama, câncer de estômago, em câncer de pulmão de células não pequenas e osteossarcoma (PENG *et al.*, 2014; POLIOUDAKIS, ABELL & IYER, 2015; GUPTA *et al.*, 2017; MA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Em tecido escamoso de cavidade oral foi observada elevada expressão de miR-503 em relação a amostra controle proveniente de mucosa saudável sem neoplasia, o que nos instiga a investigar o nível de expressão em amostras de tecido esofágico (LAJER *et al.*, 2011). Em carcinoma epidermoide de esôfago, foi observado que o miR-503 regula negativamente a expressão de *HOXC13* que resulta na diminuição da proliferação do tumor e inibição da apoptose (LUO *et al.*, 2017). Diferentemente de outros tumores, *SPRR3* parece atuar como supressor tumoral em CEE e nossos achados sugerem uma possível participação do miR-503 na regulação negativa deste gene, o que atribuiria a este miRNA uma nova atuação, até então desconhecida. O miR-21 é um microRNA oncogênico (oncomiR) e está superexpresso em diversas neoplasias, incluindo câncer de mama, cólon e reto, pulmão, próstata, estômago, alguns tumores de cabeça e pescoço e esôfago, entre outros (MISAWA *et al.*, 2010). Como observado, *SPRR3* não é um alvo predito do miR-21 e a correlação encontrada nos sugere um processo de regulação de forma indireta com a participação do gene *MEIS1* na regulação de *SPRR3*. Esse gene é responsável por codificar uma proteína homeobox pertencente à família TALE ("extensão de loop de três aminoácidos") (WILLIAMS, WILLIAMS & INNIS, 2005), estando envolvido em processos como proliferação celular, diferenciação e na embriogênese (Huang *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005).

Em trabalho publicado em 2017, foi visto que a superexpressão de *MEIS1* inibiu a proliferação celular, a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular, diminuiu a invasão celular e migração, bem como inibiu a transição epitélio-

mesênquima em linhagens celulares de câncer gástrico (SONG, WANG & WANG, 2017). Em carcinoma renal de células claras, a expressão também foi associada à inibição da proliferação celular, invasão e migração (ZHU *et al.*, 2017). Em pacientes com LMA (leucemia mielóide aguda) a super expressão de *MEIS1* (IMAMURA *et al.*, 2002) pode estar relacionada com mutações no gene *DNMT3A*, uma vez que foi observada pacientes com mutações nesse gene apresentaram alta expressão de *MEIS1* (FERREIRA *et al.*, 2015) ou a fusões do gene *MLL* (MILNE *et al.* 2005).

Em CEE já foi visto que a expressão de *MEIS1*, tanto proteica quanto gênica, (ABBASZADEGAN & MOGHBELI, 2015), estão significativamente reduzidas em amostras tumorais em relação à mucosa adjacente ao tumor, assim como também foram observados baixos níveis de metilação em seu promotor gênico, o que indica que a supressão de sua expressão não depende da metilação do DNA (RAD *et al.*, 2015). Em conjunto, temos evidências que justificam propor a investigação da participação de miR-21 e *MEIS1* na regulação da expressão de *SPRR3*.

Outros componentes endógenos podem influenciar a expressão gênica, como a atuação de fatores transcricionais. Dos treze fatores de transcrição identificados como possíveis reguladores da expressão de *SPRR3* em CEE, o gene *FOSL1* nos chamou atenção, uma vez que outro membro da família FOS, o *c-FOS*, foi visto como um regulador de *SPRR3* (FISCHER *et al.*, 1999). Membros da família FOS se dimerizam com outras proteínas da família JUN, formando um complexo de fatores de transcrição (heterodímero) que se liga a uma sequência do DNA chamada de sítio AP-1. (RAUSCHER *et al.*, 1998). Logo, este dado nos instiga a pensar na possibilidade de outro membro deste complexo proteico participar da regulação da expressão de *SPRR3* e, nossos dados mostram que *FOSL1* está mais expresso em tumor em comparação ao tecido adjacente.

Outra subunidade de AP-1, *c-JUN*, já foi associada à regulação da expressão de *SPRR3*. Em 2014, foi mostrada regulação de *SPRR3* por *c-JUN* via PKC/JNK em resposta ao estímulo por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) em linhagem celular de CEE, KYSE450. Neste trabalho, por meio da realização de ensaios *in vitro*, foi demonstrada a ligação de *c-Jun* diretamente ao promotor de *SPRR3* e observaram que a indução da expressão de *c-Jun* resulta no aumento da ativação de *SPRR3*, assim como também mostraram que *c-Jun* aumenta a expressão de *SPRR3* principalmente pela ativação da via de PKC/JNK em resposta ao TPA, em células de CEE. As células quando tratadas com inibidor da proteína quinase C

(PKC) apresentaram menores níveis de expressão de SPRR3, logo os autores sugeriram a influência desta proteína (PKC) na regulação de SPRR3, em conjunto com c-JUN. Além disto, foi observado que a baixa expressão de SPRR3 mostrou-se relacionada ao grau de diferenciação dos tumores avaliados e observou-se perda de sua expressão desde lesões de baixo grau até ao CEE. Estas observações levaram os autores a sugerirem um papel importante na disfunção de c-Jun e proteínas associadas à diferenciação epitelial, como eventos precoces na progressão neoplásica intraepitelial. (LUO *et al.*, 2014).

Nosso grupo já mostrou que a perda da expressão de *SPRR3* é um evento precoce na carcinogênese esofágica (SIMÃO *et al.*, 2011) e, o presente estudo mostra evidências robustas do envolvimento de mecanismos epigenéticos na desregulação da expressão deste gene. Nossos achados nos incitam a questionar se a perda da expressão deste gene atua de maneira causal na iniciação tumoral esofágica ou se este fenômeno é consequência do processo de transformação tumoral. Para isto, tentamos desenvolver modelo de cultura organotípica (3D) construído a partir de célula de mucosa esofágica livre de neoplasia imortalizada por hTERT (NE2-hTERT).

Esta parte do projeto foi realizada durante o período do estágio supervisionado no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) sob a supervisão da Dra. Susan Gibbs na Vrije Universiteit em Amsterdam. O modelo de cultivo celular tridimensional (3D) se aproxima em histologia ao tecido nativo, o que contribui para o desenvolvimento de estudos investigatórios, como testes de novas drogas em abordagens terapêuticas, estudos de resposta imune, e particularmente sobre processos que afetam a diferenciação (KOSTEN *et al.*, 2015). Logo, o desenvolvimento de um modelo de cultivo de célula de mucosa esofágica de histologia normal em 3D representa uma excelente ferramenta que nos permitiria explorar potenciais mecanismos do envolvimento da *SPRR3* sobre a transformação tumoral esofágica.

A escolha do laboratório da Dra. Susan Gibbs foi devido ao fato que ela desenvolve há mais de 10 anos modelos de pele e, mais recentemente, de gengiva, em cultura organotípica. Levando-se em consideração a semelhança histológica e experiência prévia do grupo de pesquisa, escolhemos o protocolo utilizado em modelo de gengiva para desenvolvermos a cultura em esôfago, uma vez que são epitélios contendo células escamosas e sem camada córnea. Resumidamente, este

protocolo compreendeu etapa inicial de construção de gel de matrix de colágeno tipo I povoado por fibroblastos, após 24 horas foram adicionados os queratinócitos no topo dos géis e estes foram cultivados por mais 3 dias e, por fim, foram expostos à interface líquido-ar por 10 dias a fim de induzir o processo de diferenciação epitelial (KOSTEN *et al.*, 2015). Embora, como dito anteriormente, tivéssemos adotado o mesmo protocolo para o modelo em gengiva, não foi observada indução de diferenciação. Em seguida, o tempo de cultivo em interface líquido-ar foi aumentado para 24 dias e com retirada de biópsia ao 17º dia para avaliar possível diferenciação epitelial por coloração H&E. Apesar de ter sido observado aparente acúmulo de camadas, no entanto, ao final do experimento concluímos que não foi possível desenvolver o modelo de equivalente de tecido esofágico.

Algumas observações nos levaram a esta conclusão, sendo estas: a linhagem celular apresentou caráter bastante invasivo e migratório, uma vez que observamos a invasão destas células no gel de colágeno povoado com fibroblastos (avaliamos a distribuição de citoqueratinas por imuno-histoquímica), e NE2-hTERT não foi capaz de formar membrana basal, nas condições testadas. Cheung e colaboradores destacaram o ganho de N-caderina e Vimentina durante o processo de imortalização, o que pode justificar o perfil invasivo desta linhagem (CHEUNG *et al.*, 2010). No mais, cabe ressaltar que não foi possível testar outras condições, como por exemplo alterar condições relacionadas à construção dos géis de colágeno e tempo de exposição à interface líquido-ar, pois não houve tempo hábil para realizar novos experimentos (Detalhes da metodologia, experimentos realizados e uma breve discussão dos dados observados, encontram-se em Anexo 2).

Este foi o primeiro trabalho em CEE que buscou entender melhor os mecanismos que participam da regulação da expressão de *SPRR3*. Nossos resultados sugerem que a metilação do DNA é um mecanismo importante na regulação da expressão de *SPRR3*, porém não é o único responsável pelo fenômeno. Para isto, exploramos outros mecanismos que poderiam estar envolvidos na perda de expressão desse gene e encontramos possíveis fatores transcricionais e miRNAs, que atuariam de forma direta ou indireta na regulação da expressão deste gene.

## CONCLUSÕES

- a) Observamos baixos níveis de expressão de *SPRR3* em linhagens de CEE, bem como menores níveis de expressão gênica em amostras de tecido tumoral em comparação ao tecido adjacente ao tumor de pacientes com CEE;
- b) Foram identificados maiores níveis de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em amostras de tecido tumoral em comparação ao tecido adjacente de pacientes com CEE;
- c) Observamos maiores níveis de metilação de *SPRR3* em linhagens de CEE quando comparadas às células tratadas com agente demetilante, bem como maiores níveis e metilação em amostras de tecido tumoral em comparação ao tecido adjacente ao tumor de pacientes com CEE;
- d) A metilação de *SPRR3* está significativamente relacionada aos menores níveis de expressão de *SPRR3*, assim como observamos correlação positiva entre a metilação do *SPRR3* com os níveis de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*;
- e) Nossos dados sugerem que tratamento com agente demetilante foi capaz de induzir demetilação e reestabelecer a expressão de *SPRR3* em linhagens de CEE;
- f) Observamos associação entre a idade e sexo dos pacientes avaliados e *Fold Change* de expressão de *SPRR3* e não observamos correlação com os dados clínico patológicos e o delta de metilação de *SPRR3*;
- g) Identificamos dois possíveis miRNAs que possivelmente participariam no silenciamento de *SPRR3*;
- h) Foram identificados treze possíveis fatores de transcrição que poderiam atuar na regulação da expressão de *SPRR3*;

## REFERÊNCIAS

- Abraham, JM., *et al.* Esophagin cDNA cloning and characterization: a tissue-specific member of the small proline-rich protein family that is not expressed in esophageal tumors. *Cell Growth Differ.* 1996 Jul;7(7):855-60.
- Ahrens T.D., *et al.* Selective inhibition of esophageal cancer cells by combination of HDAC inhibitors and Azacytidine. *Epigenetics.* 2015;10(5):431-45. doi: 10.1080/15592294.2015.1039216.
- Alonso, L., Fuchs, E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11830-5. Epub 2003 Aug 11.
- Alhejaily, A *et al.* Inactivation of the CDKN2A tumor-suppressor gene by deletion or methylation is common at diagnosis in follicular lymphoma and associated with poor clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2014 Mar 15;20(6):1676-86. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2175. Epub 2014 Jan 21.
- Ammerpohl, O., *et al.* Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer, Estados Unidos,* v. 130, n. 6, p. 1319-1328, mar. 2012.
- Antequera F., Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Dec 15;90(24):11995-9.
- Bartel, D.P., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell,* 116 (2004) 281-297.
- Battifora H. Clinical applications of the immunohistochemistry of filamentous proteins. *Am J Surg Pathol.* 1988; 12:24.
- Beckstead, B.L. *et al.* Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2005 Nov; 26(31):6217-28.
- Bernerd F., Asselineau, D. Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro. *Dev Biol.* 1997 Mar 15;183(2):123-38.
- Bernstein, B. E.; Meissner, A.; Lander, E. S. The mammalian epigenome. *Cell,* Estados Unidos, v. 128, n. 4, p. 669-681, fev. 2007.
- Bestor, T.H. Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene,* v. 74, n.1, p. 9-12, 1988.
- Bestor, T. H. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *The EMBO Journal, Reino Unido,* v. 11, n. 7, p. 2611-2617, jul. 1992.
- Bestor, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2395–402.

Bhartiya, D.; SCARIA, V. Genomic variations in non-coding RNAs: Structure, function and regulation. *Genomics, Estados Unidos*, v. 107, n. 2-3, p. 59-68, mar. 2016.

Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development, Estados Unidos*, v. 16, n. 1, p. 6-21, jan. 2002.

Blanchard, C., et al. Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis. *The Journal of Immunology, Estados Unidos*, v. 184, n. 7, p. 4033-4041, abr. 2010.

Bowman, G. D. Mechanisms of ATP-dependent nucleosome sliding. *Current Opinion in Structural Biology, Estados Unidos*, v. 20, n. 1, p. 73-81, fev. 2010.

Bracken, S. et al. Altered gene expression in highly purified enterocytes from patients with active coeliac disease. *BMC Genomics*. 2008 Aug 8;9:377. doi: 10.1186/1471-2164-9-377.

Bragulla, H. H.; Homberger, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy, Estados Unidos*, v. 214, n. 4, p. 516-559, abr. 2009.

Brasseur, J.G. et al. Function of longitudinal vs circular muscle fibers in esophageal peristalsis, deduced with mathematical modeling. *World J Gastroenterol* 13(9):1335–1346, 2007.

Bray F, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492. Epub 2018 Sep 12.

Câncer de esôfago: epidemiologia, diagnóstico e tratamento. Disponível em: . Acesso em: 27 fev. 2016.

Cairns, B.R. Emerging roles for chromatin remodeling in cancer biology. *Trends Cell Biol*. 2001 Nov;11(11):S15-21.

Candi, E.; Schmidt, R.; Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology, Estados Unidos*, v. 6, n. 4, p. 328-340, abr. 2005.

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, Estados Unidos*, v. 82, n. 5, p. 657–664, ago. 1999.

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



Chen, B.S., et al. Decreased expression of SPRR3 in Chinese human oesophageal cancer. *Carcinogenesis*. 2000 Dec;21(12):2147-50.

Cho, D.H. Upregulation of SPRR3 promotes colorectal tumorigenesis. *Mol Med*. 2010 Jul-Aug;16(7-8):271-7. doi: 10.2119/molmed.2009.00187. Epub 2010 Mar 17.

Coleman N, H. G., et al. Dietary fiber and the risk of precancerous lesions and cancer of the esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, v. 71, n. 7, p. 474-482, jul. 2013.

Cotran, R. S.; Kumar, V.; Robbins, S. L. *Patologia estrutural e funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

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*, Estados Unidos, v. 33, n. 4, jan. 2013

Dawsey, S. M., et al. Mucosal iodine staining improves endoscopic visualization of squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus in Linxian, China. *Cancer*, Estados Unidos, v. 83, n. 2, p. 220-231, jul, 1998.

De Heller-Milev, M., et al. Expression of small proline rich proteins in neoplastic and inflammatory skin diseases. *British Journal of Dermatology*, Reino Unido, v. 143, n. 4, p. 733-740, out. 2000.

Dweep, H. & Gretz, N. miRWalk 2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*. 2015;12:697.

Del Bino, S. et al. Ultraviolet B induces hyperproliferation and modification of epidermal differentiation in normal human skin grafted on to nude mice. *Br J Dermatol*. 2004 Apr;150(4):658-67.

Egger, G., et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, Estados Unidos, v. 429, n. 6990, p. 457-463, mai. 2004.

Ehrlich, M. (2002). DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21(35), 5400–13.

Elias, P.M., Wakefield, J.S. Mechanisms of abnormal lamellar body secretion and the dysfunctional skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Allergy Clin Immunol*. 2014 Oct;134(4):781-791.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.048. Epub 2014 Aug 15.

El-Serag, H. B.; Rudolph, K. L. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, Estados Unidos, v. 132, n. 7, p. 2557-2576, jun. 2007.

Espada, A., Esteller, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (2010) 238–246.

Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007 Apr;8(4):286-98. Epub 2007 Mar 6. Review.

Esteller, M. Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, Inglaterra, v. 358, n. 11, p. 1148-1159, mar. 2008.

Falk, G. W. Risk factors for esophageal cancer development. *Surgical oncology clinics of North America*, Estados Unidos, v. 18, n. 3, p. 469–485, jul. 2009.

Feinberg, A.P., Oohlsson R, Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer, *Nat. Rev. Genet.* 7 (2006) 21–33.

Feinberg, A.P., Tycko, B. The history of cancer epigenetics, *Nat.Rev.Cancer* 4 (2004) 143-153.

Ferlay, J., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, Estados Unidos, v. 136, p. 359-386, mar. 2015.

Ferreira HJ, et al. [DNMT3A mutations mediate the epigenetic reactivation of the leukemogenic factor MEIS1 in acute myeloid leukemia](#). *Oncogene.* 2017 Jul 20;36(29):4233. doi: 10.1038/onc.2017.57. Epub 2017 Mar 13.

Fischer, D.F. et al. Interdependent transcription control elements regulate the expression of the SPRR2A gene during keratinocyte terminal differentiation. *Mol Cell Biol.* 1996 Oct;16(10):5365-74.

Fischer, D.F., et al. Structure and evolution of the human SPRR3 gene: implications for function and regulation. *Genomics*, Estados Unidos, v. 55, n. 1, p. 88-99, jan. 1999.

Fischer, D. F.; Backendorf, C. Identification of regulatory elements by gene family footprinting and in vivo analysis. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, v. 104, p. 37-64, 2007.

Fisichella, P.M.A., Patti, M.G. Normal physiology of the esophagus. In: Tilanus HW, Attwood SE, editors. *Barrett's esophagus*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2002, p.51.

Forrest, A. Chemistry and Biology of N-nitroso Compounds. *Cambridge Monographs on Cancer Research. Journal of Clinical Pathology*, v. 46, n. 1, p. 95, jan. 1993.

Frappier, B. L. Epithelium. Em Dellmann's *Textbook of Veterinary Histology*. 6. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006.

- Frommer, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Mar 1; 89(5):1827-31.
- Fuchs, E.; Cleveland, D.W. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):514-9.
- Gibbs, S., et al. Molecular characterization and evolution of the SPRR family of keratinocyte differentiation markers encoding small proline-rich proteins. *Genomics, Estados Unidos*, v. 16, n. 3, p. 630-637, jun. 1993.
- Goll, M. G., et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science, Estados Unidos*, v. 311, n. 5759, p. 395-398, jan. 2006.
- Goll, M. G.; Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of Biochemistry, Estados Unidos*, v. 74, p. 481-514, 2005.
- Grigoryev, S.A. Nucleosome spacing and chromatin higher-order folding. *Nucleus* 2012 Nov- -Dec;3(6):493-9.
- Guibert, S.; Weber, M. Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 104, p. 47-83, 2013.
- Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell, Estados Unidos*, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan. 2000.
- Herceg, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis, Inglaterra*, v. 22, n. 9, p. 91-103, mar. 2007.
- Heyn, H.; Esteller, M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature Reviews Genetics, Inglaterra*, v. 13, n. 10, p. 679-692, out. 2012.
- Hisa T, et al., Hematopoietic, angioenic and eyes defects in Meis1 mutant animals. *EMBO J*. 2004;23:450-9.
- Holliday, R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006 Apr-Jun;1(2):76-80. Epub 2006 Mar 15.
- Holliday, R. The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987 Oct 9;238(4824):163-70. Review
- Holoch, D.; Moazed, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics, Estados Unidos*, v. 16, n. 2, p. 71-84, fev. 2015.
- Howell, M. D. et al., Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Sep;124(3 Suppl 2):R7-R12. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.012.

Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, June 5, 2014<sup>a</sup> 2014

Humphries, B.; Wang, Z.; Yang, C. The role of microRNAs in metal carcinogen-induced cell malignant transformation and tumorigenesis. *Food and Chemical Toxicology*, Estados Unidos, fev. 2016.

Hu, R. et al. Quantitative Secretomic Analysis Identifies Extracellular Protein Factors That Modulate the Metastatic Phenotype of Non-Small Cell Lung Cancer. *J Proteome Res.* 2016 Feb 5;15(2):477-86. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00819. Epub 2016 Jan 25.

Hur, C., et al. Trends in Esophageal Adenocarcinoma Incidence and Mortality. *Cancer*, Estados Unidos, v. 119, n. 6, p. 1149-1158, mar. 2013.

INCA. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. 44p. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

Issa, J. P. Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. *Cancer Prevention Research*, Estados Unidos, v. 1, n. 4, p. 219-222, set. 2008.

Jaenisch, R., Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:245-54.

Jemal, A., et al. Cancer statistics, 2006. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Estados Unidos, v. 56, n. 2, p. 106-130, mar. 2006.

Jemal, A. et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin.* 2008; 58:71–96.

Jemal, A., et al. Global Cancer Statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Estados Unidos, v. 61, n. 2, p. 69-90, mar./abr. 2011.

Jenuwein, T.; Allis, C. D. Translating the histone code. *Science*, Estados Unidos, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, ago. 2001.

Johnson, L., Cao, X., Jacobsen, S. Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. (2002)*Curr. Biol.*, 12, 1360–1367.

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.

Jones, P.A.; Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3 (2002) 415–428.

Jones, P. A.; Taylor, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, Estados Unidos, v.20, n. 1, p. 85-93, mai. 1980.

Joshi, S.D., Davidson, L.A. Epithelial machines of morphogenesis and their potential application in organ assembly and tissue engineering. *Biomech Model Mechanobiol.*

Author manuscript; available in PMC 2013 May 28. Published in final edited form as: *Biomech Model Mechanobiol.* 2012 Nov; 11(8): 1109–1121.

Jurkowski, T. P., et al. Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA, Estados Unidos*, v. 14, n. 8, p. 1663-1670, ago. 2008.

Kalinin, A.; Kajava, A.V.; Steinert, P.M. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays.* 2002 Sep;24(9):789-800.

Kalinin, A.; Marekov, L. N.; Steinert, P. M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of Cell Science, Reino Unido*, v. 114, p. 3069-3070, set. 2001.

Kapranov, P. et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316:1484–1488. doi: 10.1126/science.1138341 (2007).

Kelsell, D.P. and Byrne, C. SNPing at the Epidermal Barrier. *J Invest Dermatol.* 2011 Aug;131(8):1593-5. doi: 10.1038/jid.2011.92.

Kerr, J.B. *Atlas of functional histology.* London: Mosby. 1999. 402 p.

Kim, J.C. et al. Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation in less advanced stages of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(3):909-16. doi: 10.1007/s10549-011-1868-5. Epub 2011 Nov 11.

Kim Chi, E.T. et al. Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3146-54.

Kim, Jong Bin. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Seminars in Cancer Biology* 15 (2005) 365–377

Kimos, M.C. et al. Esophagin and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) are biomarkers of human esophageal neoplastic progression. *Int J Cancer.* 2004 Sep 1;111(3):415-7.

Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. Life (and death) in a malignant tumour. *Nature, Reino Unido*, v. 379, n. 6560, p. 19-20, jan. 1996.

Kinzler, K.W., Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996; 87:159-170.

Kostenet *al.*. Gingiva Equivalents Secrete Negligible Amounts of Key Chemokines Involved in Langerhans Cell Migration Compared to Skin Equivalents. [J Immunol Res.](#) 2015;2015:627125. doi: 10.1155/2015/627125. Epub 2015 Oct 11.

Kubo, A., et al. Dietary factors and the risks of oesophageal adenocarcinoma and Barrett's oesophagus. *Nutrition Research Reviews*, v. 23, n. 2, p. 230-246, dez. 2010.

Kwa, F. A., et al. Chromatin modifying agents - the cutting edge of anticancer therapy. *Drug Discovery Today*, v. 16, n. 13-14, p. 543-547, jul. 2011.

Kypriotou, M.; Huber, M.; Hohl, D. The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the 'fused genes' family. *Experimental Dermatology*, v. 21, n. 9, p. 643-649, set. 2012.

Layke, J. C.; Lopez, P. P. Esophageal cancer: a review and update. *American family physician, Estados Unidos*, v. 73, n. 12, p. 2187–2194, jun. 2006.

Lehnertz et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr. Biol.*, 13, 1192–1200. 2003

Lewandowska, J.; Bartoszek, A. DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy--multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. *Mutagenesis, Inglaterra*, v. 26, n. 4, p. 475-487, jul. 2011.

Liang, Y., Chang, C., Lu, Q. The Genetics and Epigenetics of Atopic Dermatitis-Filaggrin and Other Polymorphisms. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2015 Sep 18.

Lin DC, Du XL, Wang MR. Protein alterations in ESCC and clinical implications: a review. [Dis Esophagus](#). 2009;22(1):9-20. doi: 10.1111/j.1442-2050.2008.00845.x. Epub 2008 Jun 17.

Liu, Q. et al., Expression of SPRR3 is associated with tumor cell proliferation and invasion in glioblastoma multiforme. *Oncol Lett*. 2014 Feb;7(2):427-432. Epub 2013 Dec 6.

Lopez, J., et al. The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer*, v. 100, n. 4, p. 571-7, 2009.

Lopez-Serra, L.; Esteller, M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *British Journal of Cancer, Reino Unido*, 98, n. 12, p. 1881-1885, jun. 2008.

Lopez-Serra, L.; Esteller, M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene, Estados Unidos*, v. 31, n. 13, p. 1609-1622, mar. 2012.

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

Luger K, Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997 Sep 18;389(6648):251-60.

- Luo, A. et al. Small proline-rich repeat protein 3 enhances the sensitivity of esophageal cancer cells in response to DNA damage-induced apoptosis. *Mol Oncol.* 2013 Oct;7(5):955-67. doi: 10.1016/j.molonc.2013.05.005. Epub 2013 Jun 13.
- Luo, A., et al. Differentiation-associated genes regulated by c-Jun and decreased in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Plos One*, Estados Unidos, v. 9, n. 5, mai. 2014.
- Manconi, B. et al. Characterization of two isoforms of human SPRR3 from saliva of preterm human newborn and autaptic fetal oral mucosa, parotid and submandibular gland samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jul 30;398(3):477-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.103. Epub 2010 Jul 1.
- Marenholz, I., et al. Association screening in the Epidermal Differentiation Complex (EDC) identifies an SPRR3 repeat number variant as a risk factor for eczema. *Journal of Investigative Dermatology*, Estados Unidos, v. 131, n. 8, p. 1644-1649, ago. 2011.
- Marshall, D. et al. Differentially expressed late constituents of the epidermal cornified envelope *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 6;98(23):13031-6.
- Martin, N., Patel, S., Segre, J.A. Long-range comparison of human and mouse Sprr loci to identify conserved noncoding sequences involved in coordinate regulation. *Genome Res.* 2004 Dec;14(12):2430-8.
- Mayol, G., et al. DNA hypomethylation affects cancer-related biological functions and genes relevant in neuroblastoma pathogenesis. *PLoS One.* 2012;7(11):e48401. doi: 10.1371/journal.pone.0048401. Epub 2012 Nov 7.
- Mchugh, K.J., Tao, S.L., Saint-Geniez, M. A novel porous scaffold fabrication technique for epithelial and endothelial tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med.* 2013 Jul;24(7):1659-70. doi: 10.1007/s10856-013-4934-1. Epub 2013 Apr 27.
- Mclean, W. H.; Irvine, A. D. Disorders of keratinisation: from rare to common genetic diseases of skin and other epithelial tissues. *Ulster Medical Journal*, Reino Unido, v. 76, n. 2, p. 72-82, mai. 2007.
- Mischke, D., et al. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a gene complex ("epidermal differentiation complex") on human chromosome 1q21. *Journal of Investigative Dermatology*, Estados Unidos, v. 106, n. 5, p. 989-992, mai. 1996.
- Moll, R., Franke, W.W. & Schiller, D.L., 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumor and culture cells. *Cell*, 31(November), pp.11–24.
- Moskow JJ et al., Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol.* 1995;15:5434-43.

Muhonen, P., Holthofer, H. Epigenetic and microRNA-mediated regulation in diabetes. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2009)

Mulero-Navarro, S., Esteller, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68 (2008) 1–11.

Muller, S. et al. Target recognition, RNA methylation activity and transcriptional regulation of the *Dictyostelium discoideum* Dnmt2-homologue (DnmA). *Nucleic Acids Research*, 2013, Vol. 41, No. 18 8615–8627.

Muller, 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.

Nervi, C.; De Marinis, E.; Codacci-Pisanelli, G. Epigenetic treatment of solid tumours: a review of clinical trials. *Clinical Epigenetics*, v. 7, dez. 2015.

Nicholson, AG et al. Eighth Edition Staging of Thoracic Malignancies: Implications for the Reporting Pathologist. [Arch Pathol Lab Med.](#) 2018 Feb 26. doi: 10.5858/arpa.2017-0245-RA. [Epub ahead of print]

Nozoe, T., et al. Significance of immunohistochemical expression of p27 and involucrin as the marker of cellular differentiation of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncology*, v. 71, n. 5-6, p. 402-410, 2006.

Parkin, D. M., et al. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians, Estados Unidos*, v. 55, n. 2, p. 74–108, mar./abr. 2005.

Pastore, F.; Levine, R. L. Epigenetic regulators and their impact on therapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica, Itália*, v. 101, n. 3, p. 269-278, mar. 2016.

Pennathur, A., et al. Oesophageal carcinoma. *The Lancet, Reino Unido*, v. 381, n. 9864, p. 400-412, fev. 2013.

Pickens, A.; Orringer, M. B. Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. *The Annals of Thoracic Surgery, Estados Unidos*, v. 76, n. 4, p. 1367-1369, out. 2003.

Piltonen, T. T. et al. Mesenchymal stem/progenitors and other endometrial cell types from women with polycystic ovary syndrome (PCOS) display inflammatory and oncogenic potential. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Sep;98(9):3765-75. doi: 10.1210/jc.2013-1923. Epub 2013 Jul 3.

Post, P. N.; Siersema, P. D.; Van Dekken, H. Rising incidence of clinically evident Barrett's oesophagus in The Netherlands: a nation-wide registry of pathology reports. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, Escandinávia*, v. 42, n. 1, p. 17-22, jan. 2007.

Prabhu, A.; Obi, K. O.; Rubenstein, J. H. The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-



analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, Estados Unidos, v. 109, n. 6, p. 822-827, jun. 2014.

Pradhan, S., et al. Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *Journal of Biological Chemistry*, Estados Unidos, v. 274, n. 46, p. 33002-33010, nov. 1999.

Pradhan, S., Esteve, P. O. (2003) Mammalian DNA (cytosine- 5)methyltransferases and their expression. *Clin. Immunol.*, 109, 6–16.

Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, v. 17, n. 12, p. 1063-1072, dez. 2008.

Rad, A. et al. Predicting the molecular role of *MEIS1* in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumor Biol.*

Rakoff-Nahoum, S. Why cancer and inflammation. *Yale J Biol Med* 2006, 79 (3-4), 123-30.

Rauscher FJ et al. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro. [Genes Dev.](#) 1988 Dec;2(12B):1687-99.

Reddy, S.P., Vuong, H., Adiseshaiah, P. Interplay between proximal and distal promoter elements is required for squamous differentiation marker induction in the bronchial epithelium: role for ESE-1, Sp1, and AP-1 proteins. *J Biol Chem.* V.278,n.24, p 21378-87. Jun 2003.

Rice, T.W. Esophageal Cancer Staging. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015 Jun;48(3):157-63. doi: 10.5090/kjtcs.2015.48.3.157. Epub 2015 Jun 5.

Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, Reino Unido, v. 447, n. 7143, p. 425-432, mai. 2007.

Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:2291-8.

Rubenstein, J. H.; Taylor, J. B. Meta-analysis: the association of oesophageal adenocarcinoma with symptoms of gastro-oesophageal reflux. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Estados Unidos, v. 32, n. 10, p. 1222-1227, nov. 2010.

Saksena, R., et al. Tubular organ epithelialisation. *J Tissue Eng.* 2016 Jan-Dec; 7: 2041731416683950. Published online 2016 Dec 19.  
Doi: 10.1177/2041731416683950

Sark, M. W. J., et al. AP-1 and Ets Transcription Factors Regulate the Expression of the Human SPRR1A Keratinocyte Terminal Differentiation Marker. *The Journal of Biological Chemistry, Estados Unidos*, v. 273, n. 38, p. 24683–24692, 1998.

Sawan, C., et al. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutation Research, Estados Unidos*, v. 642, n. 1-2, p. 1-13, jul. 2008.

Secretan, B., et al. A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *The Lancet Oncology, Reino Unido*, v. 10, n. 11, p. 1033-1034, nov. 2009.

Segedy, A.K., et al. Identification of small proline-rich repeat protein 3 as a novel atheroprotective factor that promotes adaptive Akt signaling in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Estados Unidos*, v. 34, n. 12, p. 2527-2536, dez. 2014.

Sen, L. et al. DNMT1 maintains progenitor function in self-renewing somatic tissue. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):563-7. doi: 10.1038/nature08683. Epub 2010 Jan 17.

Sepehr, A., et al. Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. *Oncogene, Estados Unidos*, v. 20, n. 50, p. 7368–7374, nov. 2001.

De Simão et al. Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR and its potential use as a biomarker. *Exp Mol Pathol*. 2011 Oct;91(2):584-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.06.006. Epub 2011 Jul 12

Sipl, C *et al.* Promoter methylation of RB1, P15, P16, and MGMT and their impact on the clinical course of pilocytic astrocytomas. *Oncol Lett*. 2018 Feb;15(2):1600-1606. doi: 10.3892/ol.2017.7490. Epub 2017 Nov 24.

Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. *Oesophagus including oesophagogastric junction. TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009:66–72.

Song, F; Wang, H & Wang, Y. Myeloid ecotropic viral integration site 1 inhibits cell proliferation, invasion or migration in human gastric cancer. [Oncotarget](#). 2017 Sep 28;8(52):90050-90060. doi: 10.18632/oncotarget.21376. eCollection 2017 Oct 27.

Soppe, W. J., et al. DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, 21, 6549–6559. (2002).

Sorm, F., et al. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*, v. 20, n. 4, p. 202-203, abr. 1964.

Stein, H.J., et al. Esophageal cancer: patient evaluation and pre-treatment staging. *Surg Oncol* 2001 Nov;10(3):103-11.

Steinert, P. M.; Marekov, L. N. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry, Estados Unidos*, v. 270, n. 30, p. 17702-17711, jul, 1995.

Steinert, P.M. Keratins: dynamic, flexible structural proteins of epithelial cells. *Curr Probl Dermatol*. V54, p 193-198. 2001.

Stern, C.D., Conrad, H. Waddington's contributions to avian and mammalian development, 1930-1940. *Int J Dev Biol*. 2000;44(1):15-22.

Stresemann, C.; Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer, Estados Unidos*, v. 123, n. 1, p. 8-13, jul. 2008.

Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2009;49:243-63. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-061008-103102.

Tramacere, I.; La Vecchia, C.; Negri, E. Tobacco smoking and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma: a meta-analysis. *Epidemiology*, v. 22, n. 3, p. 344-349, mai. 2011.

Trzeciak, M. et al. Expression of Cornified Envelope Proteins in Skin and Its Relationship with Atopic Dermatitis Phenotype. *Acta Derm Venereol*. 2017 Jan 4;97(1):36-41. doi: 10.2340/00015555-2482.

Tesfaigzi, J. A small proline-rich protein, SPRR1, is upregulated early during tobacco smoke-induced squamous metaplasia in rat nasal epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996 May;14(5):478-86.

Tuyns, A. J. Epidemiology of alcohol and cancer. *Cancer research, Estados Unidos*, v. 39, n. 7 Pt 2, p. 2840-2843, jul. 1979.

Vaissière, T., Sawan, C., Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):40-8. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.02.004. Epub 2008 Feb 29.

Vertino, P.M., Yen, R.W., Gao, .J, Baylin, S.B. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase. *Mol Cell Biol*. 1996 Aug;16(8):4555-65.

Vizcaino, A. P., et al. Time trends incidence of both major histologic types of esophageal carcinomas in selected countries. *International Journal of Cancer, Estados Unidos*, v. 99, n. 6, p. 860-868, jun. 2002.

Wang, J., Sasco, A.J., Fu, C., Xue, H., Guo, G., Hua, Z., et al. Aberrant DNA methylation of P16, MGMT and hMLH1 genes in combination with MTHFR C677T genetic polymorphism in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol*

Biomarkers Prev 2008; 17:118-25; PMID:18199718; DOI:10.1158/1055-9965.EPI-07-0733.

Williams TM, Williams ME, Innis JW. Range of HOX/ TALE superclass associations and protein domain requirements for HOXA13: MEIS interaction. Dev Biol. 2005; 277:457-71.

Wolffe, A.P., Matzke, M.A. Epigenetics: regulation through repression. Science. 1999, 286(5439):481-6.

Yakushiji, T., Uzawa, K., Shibahara, T., Noma, H., Tanzawa, H. Overexpression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Int J Oncol. 2003;22:1201-7.

Young, P.P. et al. Enrichment of genes in the aortic intima that are associated with stratified epithelium: implications of underlying biomechanical and barrier properties of the arterial intima. Circulation. 2005 May 10;111(18):2382-90. Epub 2005 May 2.

Zhang et al. Exogenous expression of Esophagin/SPRR3 attenuates the tumorigenicity of esophageal squamous cell carcinoma cells via promoting apoptosis. Int J Cancer. 2008 Jan 15;122(2):260-6.

Zhao, S.L., Zhu, S.T., Hao, X., Li, P., Zhang, S.T. Effects of DNA methyltransferase 1 inhibition on esophageal squamous cell carcinoma. Dis Esophagus. 2011;24:601–10

Zhu, Y., Ong, W.F. Epithelium regeneration on collagen (IV) grafted polycaprolactone for esophageal tissue engineering. Mater Sci Eng C 2009;

Zhu, J et al. MEIS1 inhibits clear cell renal cell carcinoma cells proliferation and in vitro invasion or migration. [BMC Cancer](#). 2017 Mar 7;17(1):176. doi: 10.1186/s12885-017-3155-2.

Zucchini, C. et al. Expression profile of epidermal differentiation complex genes in normal and anal cancer cells. Int J Oncol. 2001 Dec;19(6):1133-41.

**ANEXO A - Carta de Aprovação do Comitê de Ética**

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 B - Cultura Organotípica Utilizando Célula de Mucosa Esofágica Imortalizada por hTERT**

### **Introdução:**

O modelo de cultivo celular tridimensional (3D) se aproxima em histologia ao tecido nativo, o que contribui de forma grandiosa ao desenvolvimento de estudos investigatórios, como testes de novas drogas em abordagens terapêuticas, estudos de resposta imune, entre outros (KOSTEN *et al.*, 2015). Logo, o desenvolvimento de um modelo de cultivo de célula de mucosa esofágica de histologia normal em 3D representa uma excelente abordagem que nos permite explorar mecanismos os quais favorecem a transformação tumoral esofágica.

Além disto, o modelo tridimensional de cultura de células exibe uma grande vantagem em relação à cultura 2D, uma vez que permite a construção de ambiente mais realístico ao tumor, por meio do co-cultivo de diferentes células com diferentes com fenótipos diferentes (como por exemplo a presença de células proliferativas enquanto que outras células podem estar se diferenciando e outras até mesmo em necrose) (KIM, 2005).

Os passos para o desenvolvimento do modelo serão descritos nesta seção, como um anexo à tese, uma vez que não foi possível padronizá-lo e, por sua vez, não obtivemos resultados que respondesse nossa questão. Foi observado nos experimentos até então realizados, que a linhagem celular NE2-hTERT não é indicada para o modelo proposto. Esta linhagem celular não apresentou formação de camada basal contínua e realizou invasão da matriz de colágeno após o cultivo em interface ar-líquido, o que nos fez questionar se esta possuía características oncogênicas, pois mimetizou o comportamento de células neoplásicas *in vivo* com a invasão no tecido conjuntivo adjacente.

### **Objetivo:**

Desenvolver modelo de cultura organotípica utilizando linhagem celular proveniente de mucosa esofágica imortalizada por *h-TERT*.

## **Materiais e Métodos:**

### **Cultivo das linhagens Celulares imortalizadas com gene humano *TERT***

A linhagem celular NE2-hTERT foi estabelecida a partir de cultura primária de células epiteliais normais de tecido esofágico (tecido esofágico normal longe de borda tumoral), obtido de paciente diagnosticado com CEE, do sexo masculino, 52 anos de idade, submetido à esofagectomia. A imortalização ocorreu mediante utilização de vetor retroviral pLXIN-hTERT e definida após duplicação de população superior a 50 passagens além da vida útil das células parentais (CHEUNG *et al.*, 2010). Esta linhagem celular foi doada pelos pesquisadores Annie Cheung e Sai Wah Tsao Universidade de Hong Kong. Para o cultivo da linhagem NE2-hTERT, foi utilizado o protocolo do laboratório do Dr. Tsao, que consiste no cultivo das células utilizando mistura em proporção 1:1 dos meios *Definided Keratinocyte-SFM* (DKSFM; GIBCO) e Epilife (Cascade Biologics, Portland, Oregon) com suplementação de fatores de crescimento específicos para cada meio e fornecidos pelos fabricantes e antibiótico, mantidas a 37° C com 5% CO<sub>2</sub>. No entanto, foi realizada a troca gradual para o meio de cultura I, que será referido neste manuscrito como KC-I (DMEM 75% + HamF12 25%, suplementado com Pen/strep.). Este meio consiste na mistura (3:1) dos meios DMEM e HamF12 com suplementação (UltrogerG, Insulina, hidrocortisona, isoproteronol, l-serina e L-carnitina) e antibiótico (1% penicilina/estreptomicina). Para o cultivo de queratinócitos, fez-se necessário o uso de garrafas de cultura com revestimento de colágeno do tipo IV (Colágeno IV, 10%, diluído em meio DMEM). A linhagem celular de gengiva humana imortalizada com gene h-TERT (hTERT-hNOF), disponível no laboratório da Dr. Susan Gibbs, referida nesta tese como Fib-TERT, foi cultivada em meio para fibroblasto, que consiste no meio DMEM suplementado com 5% de Fetal Clone III e 1% penicilina/estreptomicina.

### **Construção e Cultura de Fibroblastos em Géis de Colágeno e Cultura de NE2-hTERT em Interface Ar-Líquido.**

A cultura organotípica de equivalentes teciduais foi realizada em três dias independentes, envolvendo a construção dos géis contendo fibroblastos, o cultivo de queratinócitos sobre os géis de fibroblastos e a exposição ao ar destas culturas. Inicialmente foi preparado o meio para os fibroblastos [1/5 Fetal Clone III e 4/5 HBSS (1x com  $\text{Ca}^+/\text{Mg}^+$ ). Em seguida, procedeu-se o preparo da solução de colágeno contendo fibroblastos na concentração de  $0.8 \times 10^6$  células em meio anteriormente citado, colágeno tipo I dissolvido na concentração de 4mg/ml e HBSS 10x, na proporção 1:10:1,25. O volume a ser utilizado de cada reagente depende da quantidade de equivalentes cultivados. Chama-se equivalente, cada cultura desenvolvida em modelo 3D de tecido específico, portanto, o cultivo 3D de células provenientes de mucosa esofágica é referido na tese como Equivalentes de Esôfago (EE). Após o preparo da solução para o gel com fibroblastos, foi adicionado 2mL desta solução no centro de cada poço de uma placa *transwell* 0,4 $\mu\text{m}$  (CLS3450 Sigma Corning<sup>®</sup> Transwell<sup>®</sup> polyester membrane cell culture inserts), sem tocar na membrana. Incubou por pelo menos duas horas a 37<sup>o</sup> C e 5%  $\text{CO}_2$ . Após este período de incubação, adicionou 3,5mL de meio embaixo e em cima das culturas.

No segundo dia de experimento, procedeu-se o cultivo de queratinócitos sobre os géis de fibroblastos em matriz de colágeno. Inicialmente retirou-se meio de cultura adicionado aos poços com a cultura no dia anterior e a placa foi recolocada na estufa enquanto foi feita a contagem dos queratinócitos. Após isto, adicionou-se 2 mL de meio KC-I contendo  $0,25 \times 10^6$  NE2-hTERT células e 3,5 mL do meio KC-I suplementado com 1ng/mL de EGF sob das culturas, e então estas permaneceram na estufa a 37<sup>o</sup> C e 5%  $\text{CO}_2$  pelo período de 2 a 4 horas. Após este período, foram adicionados 3,5mL de meio KC-I suplementado com 1ng/mL de EGF no topo de cada cultura. As culturas permaneceram na estufa, nas condições já citadas, por 3 dias.

A fim de induzir diferenciação tecidual, as culturas foram expostas ao ar em interface ar-líquido e cultivadas em meio de diferenciação, consistindo em DMEM / Ham's F12 (3/1) e suplementos. Este meio de diferenciação é referido



neste manuscrito como KC-II. Para que haja a exposição dos queratinócitos ao ar, as culturas foram transferidas para uma placa transwell profunda.

### **Imuno-histoquímica para Citoqueratinas**

A fim de observarmos a invasão de queratinócitos no gel contendo fibroblastos, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica a fim de identificarmos a distribuição de citoqueratinas [Anti-Cytokeratin AE1/AE3 (Pan cytokeratins) Antibody, prediluted, clone AE1/AE3]. O clone AE1/AE3 é uma mistura (coquetel) de citoqueratinas de baixo e alto peso molecular, que detecta tanto as citoqueratinas ácidas (tipo I) 10, 14, 15, 16 e 20 assim como as citoqueratinas básicas ou neutras (tipo II) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 (MOLL *et al.*, 1982; BATTIFORA *et al.*, 1988).

Neste estudo a técnica foi realizada em secções de 5 µm de cada cultura de equivalente de tecido esofágico desenvolvida, incluindo tratamento com nicotina e controle de cada experimento realizado. Os cortes foram fixados nas lâminas através de uma incubação a 37°C por 7 horas, em placa de aquecimento.

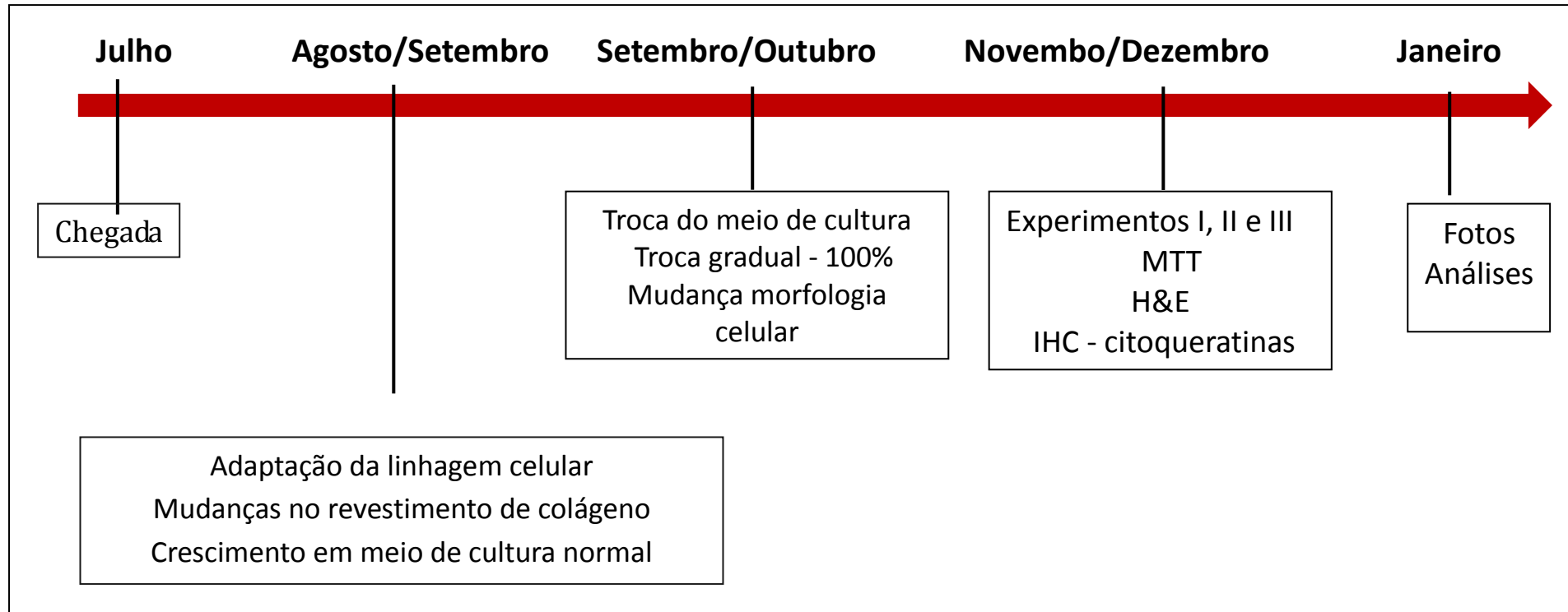
A desparafinização foi feita em dois banhos de 15 minutos e 5 minutos em xilol seguidos de banho em solução 50% xilol/50% etanol absoluto por 2 minutos, seguidos por banho de 2 minutos/cada em etanol 96% seguido de etanol 70% e hidratado em água destilada. Para a recuperação antigênica, as secções foram incubadas submersas em solução tampão 10 mM Tris/1 mM EDTA e pH 6, por 6 minutos em micro-ondas na potência 100%, seguido de 10 minutos na potência 70%. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 1h em ventilação e após são lavadas em PBS (Phosphate-buffered saline) por 5 min. Para delimitar o tecido a ser marcadas, as secções foram circuladas por caneta Dako Pen (Dako®; Agilent Technologies, Estados Unidos) e foram adicionados aproximadamente 100µL de anticorpo na diluição 1:25 seguido de incubação à temperatura ambiente por 60 minutos em ausência de luz. Após esta incubação, as lâminas foram lavadas em dois banhos de 5 minutos/cada com PBS (Phosphate-buffered saline) e excesso de líquido foi removido. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 100 µL de solução DAKO EnVision™ (DAKO EnVision™+ System, HRP) e incubação por 30 minutos em

caixa fechada seguida de banho por 5 minutos em PBS. Para inibição de peroxidase endógena, foram adicionados 200 µL de solução AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) a cada corte tecidual e foram incubados por 10 minutos na ausência de luz. Após este período, a reação foi interrompida por lavagem em água destilada. Seguiu-se com coloração com hematoxilina por 3 segundos e banho em água corrente. Para finalizar, os tecidos foram cobertos por lamínulas utilizando Aquatex® (Merck).

### **Experimentos Realizados:**

Após a chegada ao laboratório, inicialmente a célula passou por um período de observação e adequação ao revestimento de colágeno IV, o qual teve sua aplicação na garrafa de cultura reformulada para permitir o crescimento celular. Posteriormente, foi realizada a troca gradual para o meio de cultura KCI, desde a proporção 1:4 até total uso do novo meio. A troca foi feita a cada nova passagem celular (Figura 48).

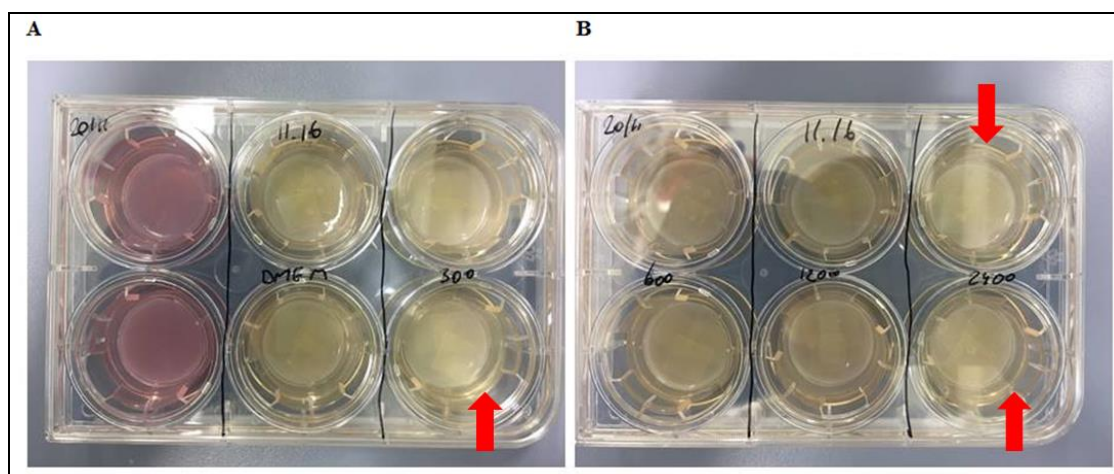
Figura 48 - *Timeline* conforme a realização dos experiemtnos referentes ao desenvolvimento do modelo 3D



Legenda: Esquema com cronologia desde a chegada da linhagem celular até a realização dos experiemtnos referentes ao desenvolvimento da cultura organotípica de mucosa esofágica.

Foi observado mudança na morfologia celular, em que as células adquiriram aspecto fibroblast-like. No primeiro experimento realizado foi observada leve contração dos géis (encolhimento do tamanho dos géis) de algumas culturas (Figura 47).

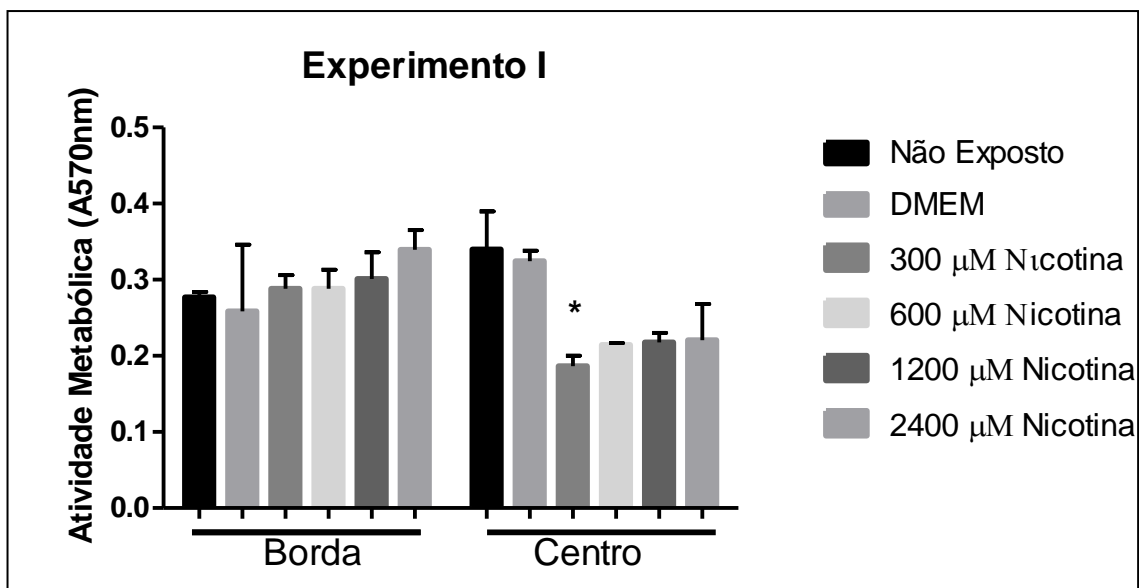
Figura 47 - Placas contendo cultura de célula NE2-hTERT cultivada em modelo 3D – Experimento I



Legenda: Cultura de queratinócitos sobre géis de colágeno povoados por fibroblastos em interface líquido-ar. A) Placa contendo controle sem nenhuma exposição, controle com DMEM e cultura com dose 300  $\mu\text{M}$  de nicotina, respectivamente. B) Placa contendo 600  $\mu\text{M}$ , 1200  $\mu\text{M}$  e 2400  $\mu\text{M}$  de nicotina, respectivamente. Culturas em duplicata. Setas indicam leve contração dos géis.

A viabilidade celular frente ao tratamento das culturas com as diferentes concentrações de nicotina por 24h foi avaliada (Figura 48), embora não tenha sido observada diferenciação epitelial nesse experimento (Figura 49). Foi possível observar menor viabilidade das amostras retiradas do centro da cultura sob exposição a gazes embebidas com diferentes concentrações de nicotina em relação ao controle não exposto, entretanto apenas o tratamento com 300  $\mu\text{M}$  de nicotina mostrou significância estatística ( $p < 0,05$ ). (Figura 48).

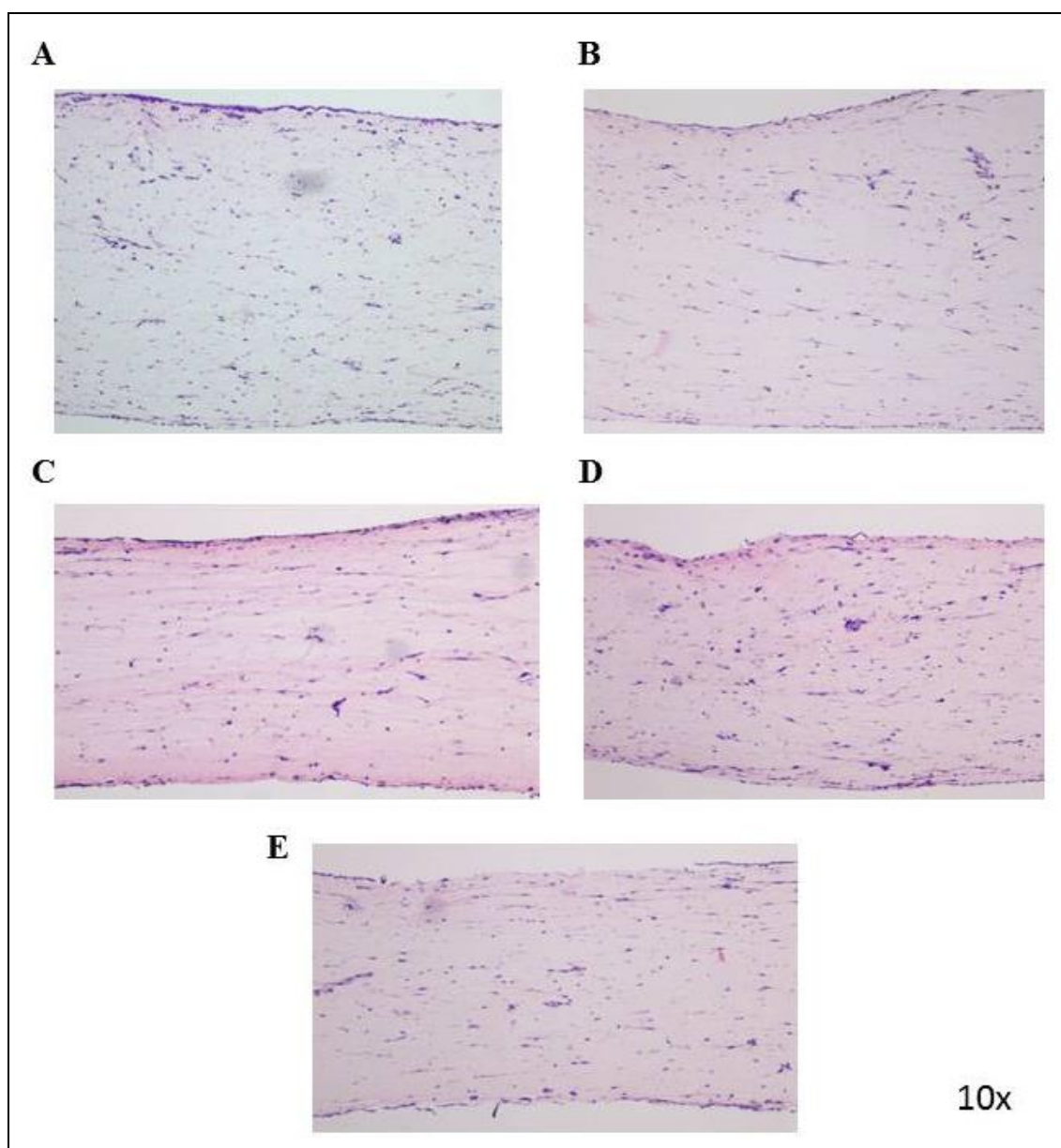
Figura 48 - Viabilidade celular em cultura 3D de esôfago exposta à nicotina



Legenda: A viabilidade celular das células em cultura 3D foi menor na região central da cultura nas diferentes concentrações de nicotina em relação aos controles. As amostras retiradas da margem da cultura apresentaram viabilidade celular similar tanto nas amostras tratadas com nicotina quanto nos controles. Duplicata biológica. \* $p < 0,05$ .

Histologicamente foi observada formação de camada única de células sem processo de diferenciação, tanto nos controles quanto nas células tratadas (Figura 49).

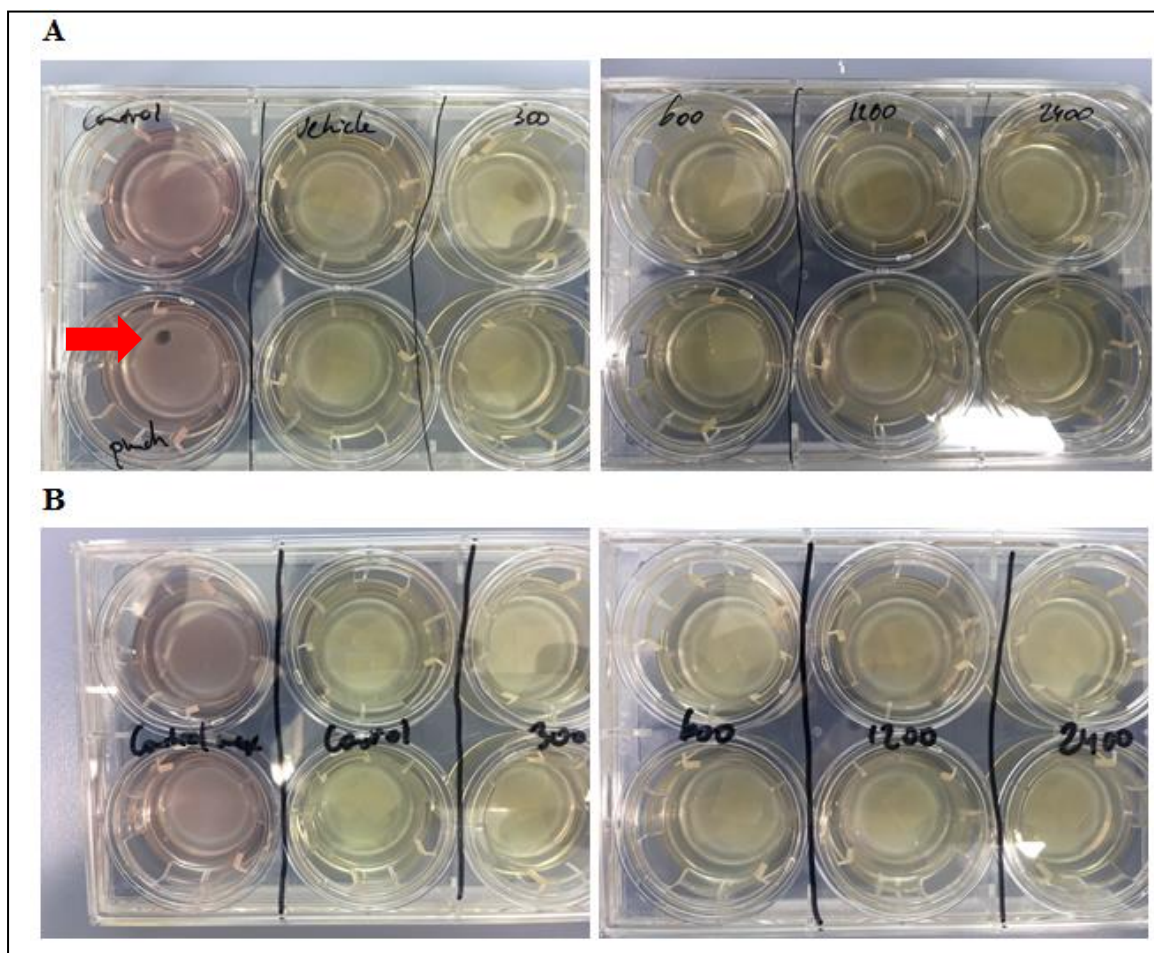
Figura 49 - Histologia de cultura de célula NE2-hTERT cultivada em modelo 3D



Legenda: Por meio de análise histológica, não foi observado formação de camadas e processo de diferenciação tecidual. A) Controle sem exposição B) Controle DMEM C) Cultura exposta à 600  $\mu\text{M}$  de nicotina D) Cultura exposta à 1200  $\mu\text{M}$  de nicotina E) Cultura exposta à 2400  $\mu\text{M}$  de nicotina.

Como não foi observada a diferenciação tecidual nem formação de camadas no primeiro experimento, o tempo de indução de diferenciação foi alterado de 10 dias para 24 dias, assim como foi ajustada a quantidade de Vitamina C ao meio KC-II nos experimentos seguintes. Não foi observada contração excessiva das culturas desenvolvidas (Figura 50).

Figura 50 - Placas contendo cultura de célula NE2-hTERT cultivada em modelo 3D – Experimentos II e III

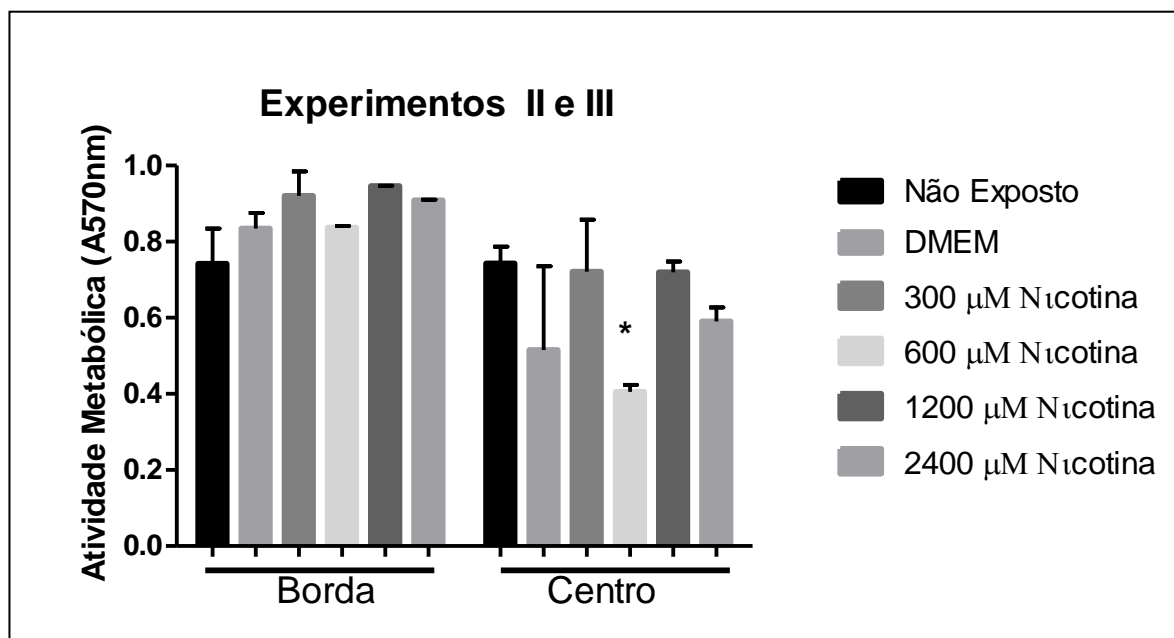


Legenda: Cultura de queratinócitos sobre géis de colágeno povoados por fibroblastos em interface líquido-ar. A) Experimento II - Placas contendo controles e culturas expostas a diferentes concentrações de nicotina. B) Experimento III - Placas contendo controles e culturas expostas a diferentes concentrações de nicotina. Culturas em duplicata em ambos os experimentos. Seta indica biopsia (3 mm) retirada no 17º dia de indução de diferenciação.

A viabilidade após tratamento foi avaliada e foi observada menor viabilidade das amostras retiradas do centro da cultura que foram submetidas à 600  $\mu$ M de nicotina ( $p < 0,05$ ) embebida em gaze (Figura 51).



Figura 51 - Viabilidade celular em cultura 3D de esôfago frente à exposição a diferentes doses de nicotina por 24h

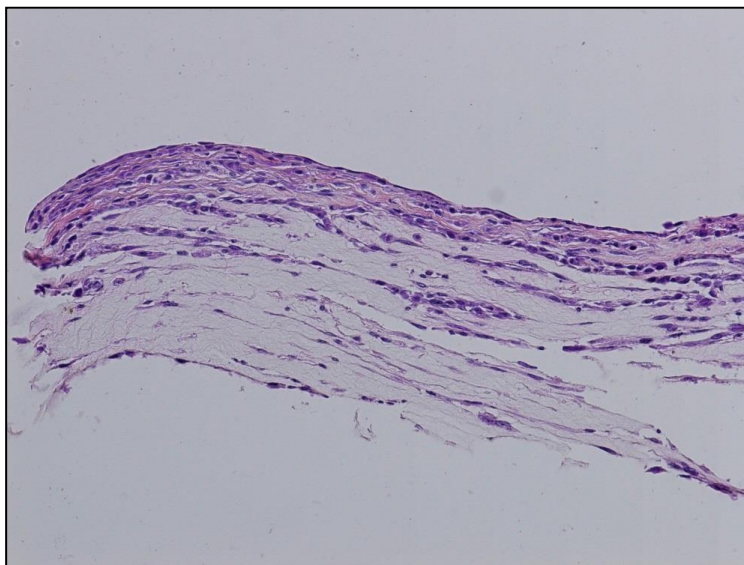


Legenda: A viabilidade celular das células em cultura 3D foi menor na região central da cultura com 600 µM de nicotina em relação aos controles. As amostras retiradas da margem da cultura não apresentaram diferença na viabilidade em relação aos controles. Duplicata biológica e duplicata experimental. \* $p < 0,05$ .

A fim de avaliarmos se as culturas permaneciam com formação de única camada celular, foi realizada uma biópsia de 3 mm no 17º dia após expor as culturas ao ar. Histologicamente foi possível observar aparente formação de camadas celulares de epitélio (Figura 52).



Figura 52 - Biópsia de cultura organotípica de equivalente de esôfago ao 17º dia após indução de diferenciação

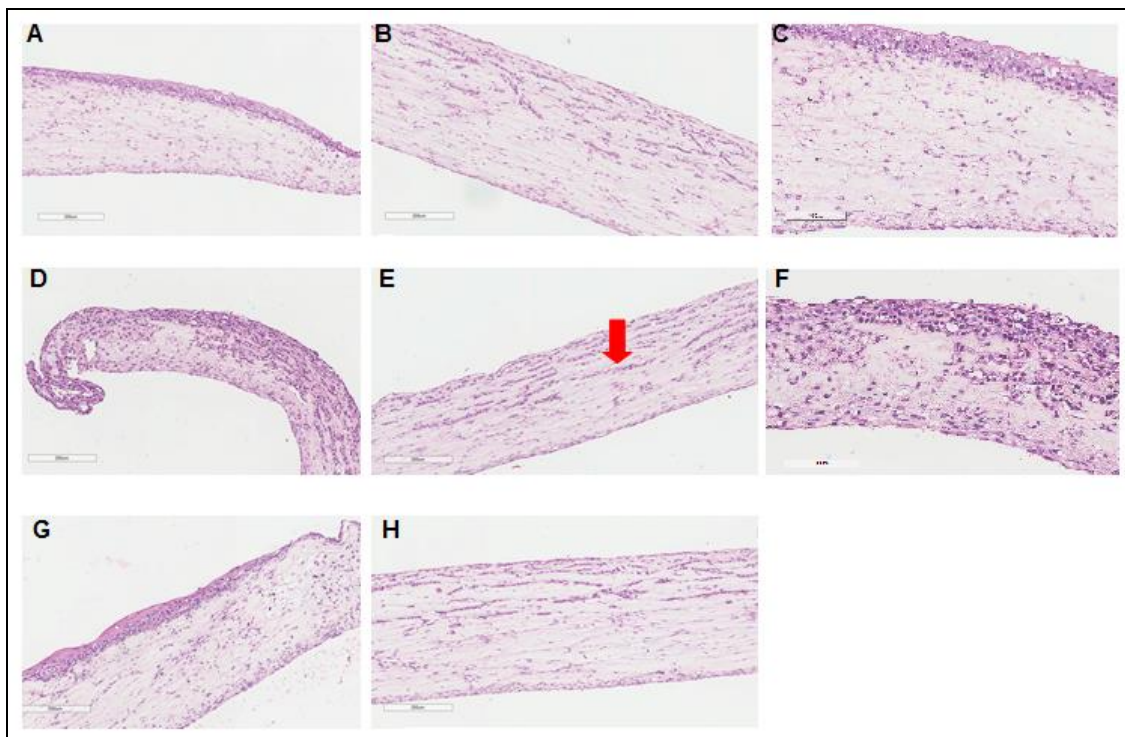


Legenda: No 17º dia após indução da diferenciação epitelial foi realizada biópsia em que foi observada aparente formação de camadas celulares de epitélio, após análise histológica.

Após 24º dia de indução de diferenciação, as culturas foram expostas às diferentes doses de nicotina por 24h e posteriormente as amostras foram coletadas. De maneira geral, foi observado maior número de queratinócitos nas culturas desenvolvidas sob o efeito indutório de diferenciação, quando comparadas as culturas obtidas no primeiro experimento, as quais não apresentaram indução de diferenciação.

Inicialmente, avaliamos a histologia por meio da coloração Hematoxilina-Eosina destas culturas. É notória a presença de queratinócitos infiltrados no gel de colágeno povoado por fibroblastos, sendo estes mais espaçados com formação “serpentiforme” na região central, embora este arranjo celular também esteja presente em algumas regiões de borda (Figura 53).

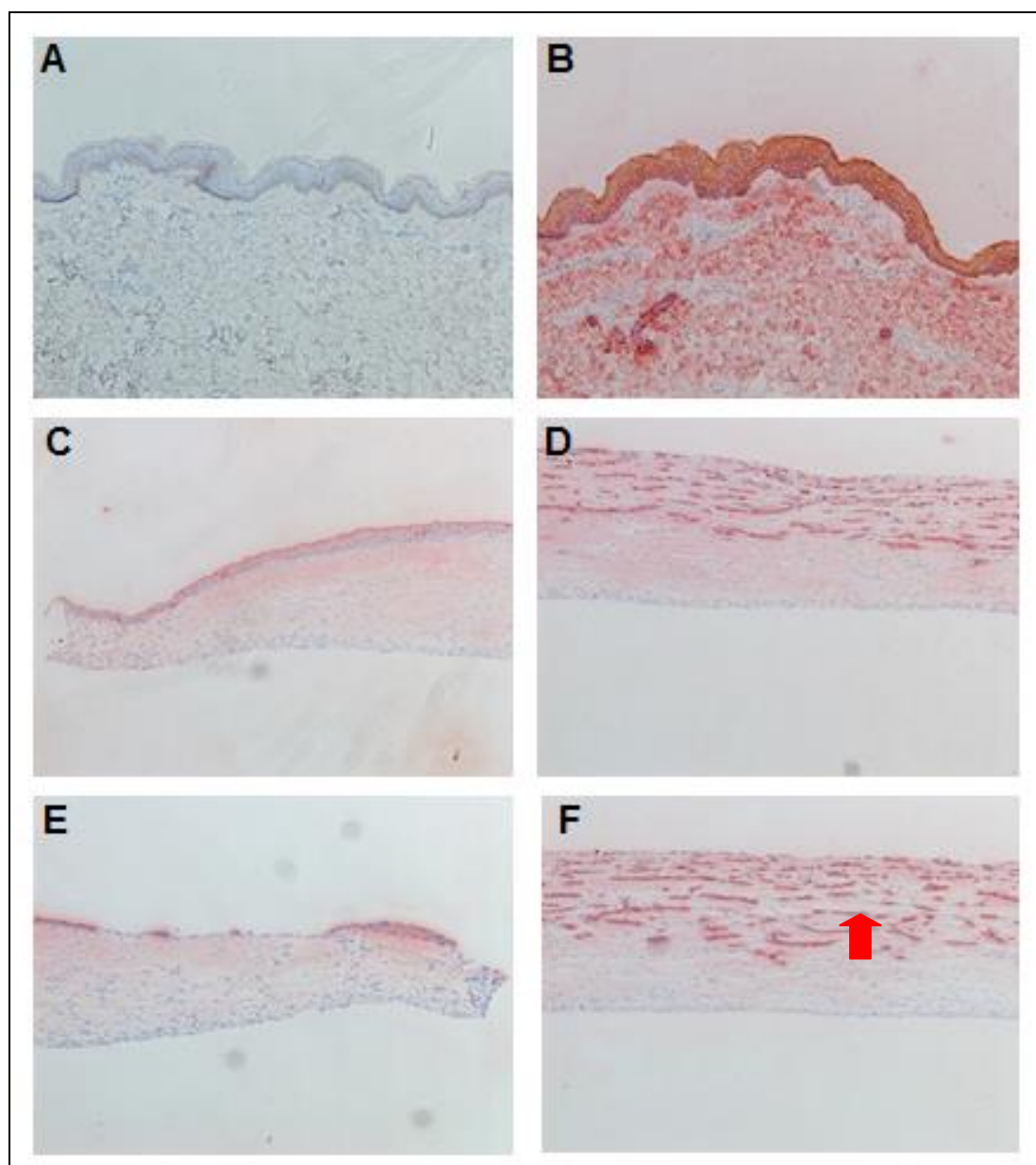
Figura 53 - Histologia de culturas 3D de equivalente de esôfago sob tratamento com nicotina



Legenda: H&E em amostras provenientes das culturas 3D de queratinócitos em gel de colágeno e fibroblastos em interface líquido-ar. Fotos representativas de controle e culturas tratadas com diferentes doses de nicotina. A) Borda da cultura não exposta ao tratamento com nicotina, porém exposta à gaze. B) Região central da cultura não exposta ao tratamento com nicotina, porém exposta à gaze. C) Borda da cultura exposta à 300 µM de nicotina. D) Região central da cultura exposta à 300 µM de nicotina. A seta indica a formação de estrutura celular em organização “serpentina”, indicando invasão de células epiteliais no gel povoado ou fibroblastos, na área central da cultura. E) Borda da cultura exposta à 2400 µM de nicotina. F) Região central da cultura exposta à 2400 µM de nicotina.

Pela análise da histologia por coloração por H&E, observamos a presença de formação celular atípica no interior os géis de colágeno contendo fibroblastos, o que nos sugere uma possível migração das células epiteliais para dentro dos géis. Portanto, a fim de confirmarmos a invasão dos queratinócitos no gel, foi avaliada a distribuição de diferentes citoqueratinas por imuno-histoquímica. Desta forma, foi possível identificar positividade para célula epitelial, confirmando presença de células epiteliais no gel, principalmente em área de borda (Figura 53 C-F).

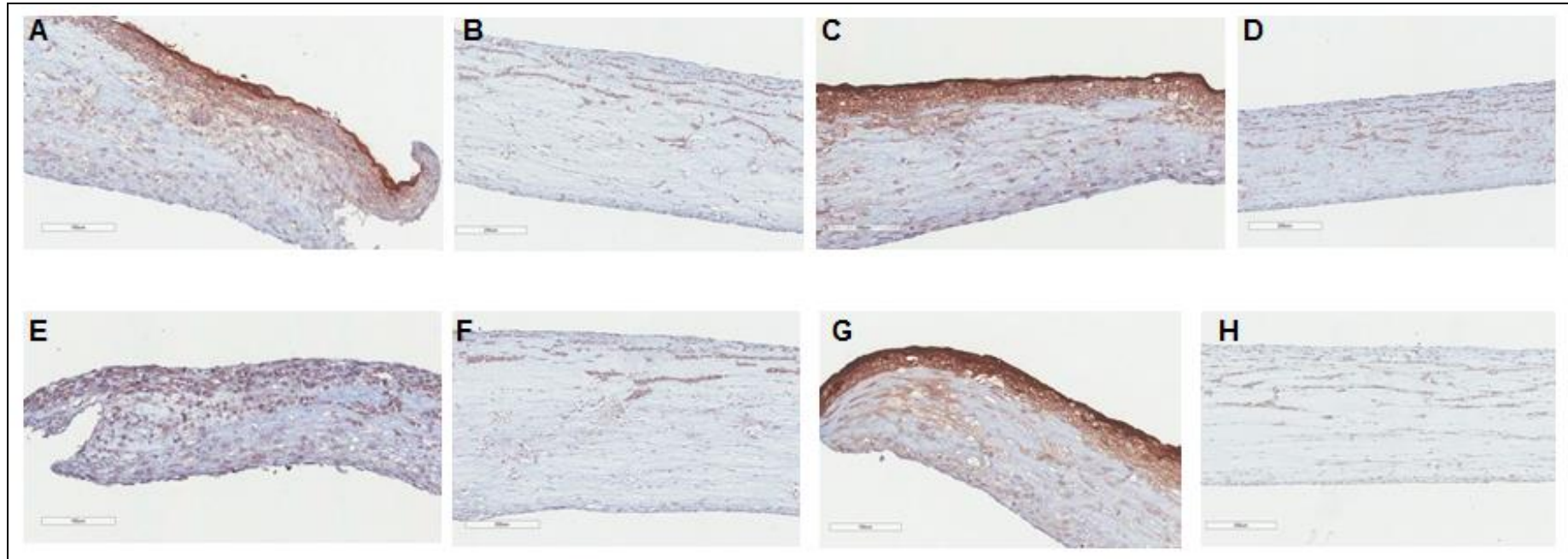
Figura 53 - Imunomarcção de citoqueratinas em cultura equivalente de esôfago



Legenda: Imuno-histoquímica avaliando distribuição de citoqueratinas em cultura 3D de equivalente de esôfago. A) Controle negativo da imuno-histoquímica em pele. B) Controle positivo da imuno-histoquímica em pele. C) Marcação em amostra proveniente de borda de cultura tratada com DMEM. D) Marcação em amostra proveniente da região central de cultura tratada com DMEM. E) Marcação em amostra proveniente de borda cultura tratada com 1200 µM de nicotina. F) Marcação em amostra proveniente da região central de cultura tratada com 1200 µM de nicotina. A seta indica marcação de queratinas em região com formação de estrutura celular em organização “serpentina”, indicando invasão de células epiteliais no gel povoado ou fibroblastos, na área central da cultura. Aumento 10x em todas as fotos.

Ao longo do desenvolvimento do modelo, como já dito anteriormente, as culturas foram expostas à nicotina. Após avaliarmos a distribuição de diferentes citoqueratinas, foi realizada imuno-histoquímica a fim de identificarmos distribuição de SPRR3 e possíveis diferenças de marcação mediante ao tratamento estabelecido com as diferentes doses de nicotina. Foi observada maior localização de SPRR3 em região de borda quando comparada a região central da mesma cultura, entretanto não foi identificada diferença de expressão entre os tratamentos com nicotina. (Figura 54).

Figura 54 - Imunomarcação de SPRR3 em cultura de equivalente de esôfago



Legenda da figura 54: Imuno-histoquímica avaliando distribuição de SPRR3 em cultura 3D de equivalente de esôfago. A) Marcação em amostra proveniente de borda de cultura não exposta ao tratamento com nicotina e nem gaze. Aumento 20x. B) Marcação em amostra proveniente de região central de cultura não exposta ao tratamento com nicotina e nem gaze. Aumento 10x. C) Marcação em amostra proveniente da borda de cultura tratada com DMEM. Aumento 20x. D) Marcação em amostra proveniente da região central de cultura tratada com DMEM. Aumento 10x. E) Marcação em amostra proveniente de borda cultura tratada com 300 µM de nicotina. Aumento 20x. F) Marcação em amostra proveniente de região central de cultura tratada com 300 µM de nicotina. Aumento 10x. G) Marcação em amostra proveniente da borda de cultura tratada com 1200 µM de nicotina. Aumento 20x. H) Marcação em amostra proveniente da região central de cultura tratada com 1200 µM de nicotina. Aumento 10x.

**Discussão:**

Em artigo publicado em 2010, foi visto que esta linhagem celular exibe algumas alterações genéticas e genômicas já relacionadas ao câncer de esôfago, incluindo progressiva perda de p16INK4a, super expressão de genes associados à transição epitélio mesênquima, de proteínas antiapoptóticas e duplicação do braço longo do cromossomo 5 (5q). Como uma limitação ao uso desta célula, foi observado ao longo da imortalização celular, partir da passagem celular de número 40, aumento nos níveis proteicos de N-caderina, vimentina e  $\alpha$ -SMA, o que pode contribuir para o perfil migratório da NE2-hTERT visto em nossas culturas. Além disto, a linhagem apresentou perda de expressão de E-caderina, e esta é uma alteração que já foi descrita em CEE, associada a um mau prognóstico em pacientes com este tumor (LIN, DU & WANG, 2009). Embora o processo de transformação desta linhagem tenha acarretado ganho de características comuns ao processo de carcinogênese, NE2-hTERT não é tumorigênica (CHEUNG et al., 2010).

Cabe ressaltar que a linhagem celular foi doada após contato com a Dra. Cheung, no entanto, houve atraso em todo processo envolvendo o envio e a documentação necessária, bem como a permissão pelo governo holandês para o uso desta célula (nível de Biossegurança 2), o que resultou na diminuição do tempo hábil para o desenvolvimento do referido projeto. Após construção da cultura organotípica seguida de avaliação histológica e imunohistoquímica, concluímos que a linhagem NE2-hTERT não é apropriada para o desenvolvimento do modelo, uma vez que esta não foi capaz de formar membrana basal. Conforme trabalho publicado em 1993, as interações entre epitélio e mesenquima são essenciais para formação e manutenção do tecido epitelial, uma vez que a comunicação entre o estroma e o epitélio influencia diversos processos como proliferação dos queratinócitos, migração, diferenciação e a formação da camada basal na junção epitélio-derme mediante síntese de componentes da matriz extracelular (SAINTIGNY *et al.*, 1993).

A limitação imposta pelo pouco tempo disponível, não nos permitiu testar alterações na construção do gel de colágeno, uma vez que observamos em algumas culturas uma tendência a acumular algumas poucas



camadas de queratinócitos nas regiões de borda. Moon e colaboradores observaram que células epiteliais de pele adquiriram comportamento proliferativo e invasivo (entrando no gel de colágeno povoado por fibroblastos) na presença de EGF e indução da expressão de MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1) (MOON *et al.*, 2001). Outros trabalhos já mostraram que a exposição à EGF resulta na indução da migração de células epiteliais para interior do estroma e expressão de metaloproteinases (ZEIGLER *et al.*, 1996; VARANI, 2004). O protocolo utilizado para a construção do modelo de equivalente de esôfago seguiu protocolo utilizado no laboratório da Dra. Susan Gibbs para a construção de equivalente de gengiva, uma vez que tanto esôfago quanto gengiva, são epitélios estratificados com células esquamosas e não queratinizados, diferentemente da epiderme. O protocolo utilizado para cultivo e indução de diferenciação em modelo contendo queratinócitos de gengiva recebe suplementação com EGF (Epidermal Growth Factor), logo, foi adicionado EGF ao meio de cultivo de NE2-hTERT. Embora existam semelhanças nestes epitélios, estes possuem características próprias, o que pode influenciar à resposta à agentes exógenos ao cultivo de queratinócitos em modelos *in vitro*.

Já foi visto, em pele, que a população de fibroblastos apresenta-se heterogênea neste órgão e que células epiteliais interagem com células da derme, tanto através de contato célula-célula ou por fatores parácrinos, incluindo IL-6, IL-8 e KGF (WERNER & SMOLA, 2001). Esta comunicação também estimula a produção, pelos fibroblastos dérmicos, de fatores de crescimento e citocinas necessários para o desenvolvimento de queratinócitos (STEILING & WERNER, 2003). Logo, a pouca interação entre a linhagem celular NE2-hTERT e os fibroblastos pode ter prejudicado a produção de moléculas necessárias para a indução da diferenciação epitelial, assim como não promoveu uma base adequada para suportar o epitélio.

Sabe-se que em cultura 3D utilizando células imortalizadas por hTERT de pele (HaCaT) e mucosa oral (IHOK), o tratamento com 300  $\mu$ M de nicotina foi capaz de alterar a histologia (epitélio com menor número de camadas) de ambos os modelos, exibindo uma pobre estratificação e organização das camadas celulares, assim como menor queratinização em modelo de pele. Os dados levaram os autores a concluir que a nicotina inibe

crescimento celular mediante parada do ciclo celular em fase G(0)/G(1) e esta parada pode estar relacionada com aumento de expressão de p21, além de afetar o processo de diferenciação epitelial (LEE *et al.*, 2005. Portanto, fomos investigar a hipótese da nicotina regular a expressão da SPRR3 em CEE. Esses dados mostraram maior marcação em região de borda de cultura em relação à região central da cultura. Como falado anteriormente, as células na região de centro de cultura se espalharam pela região do gel, com formação de estruturas celulares serpentiformes, mas isso ocorreu independente da concentração de nicotina.

**Conclusão:**

Como uma conclusão deste projeto, nossos dados sugerem que a linhagem celular NE2-hTERT não é adequada para desenvolver o modelo de cultura organotípica, uma vez que esta não foi capaz de formar membrana basal contínua e organizada.