



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

Pedro Nicolau Neto

**Identificação de potenciais biomarcadores em carcinoma epidermóide de
esôfago a partir de análise randômica de expressão gênica**

Rio de Janeiro

2014

Pedro Nicolau Neto

Identificação de potenciais biomarcadores em carcinoma epidermóide de esôfago a partir de análise randômica de expressão gênica.

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: Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Rio de Janeiro

2014

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

N639 Nicolau-Neto, Pedro.
Identificação de potenciais biomarcadores em carcinoma epidermóide de esôfago a partir de análise randômica de expressão gênica / Pedro Nicolau-Neto. - 2014.
130 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Esôfago – Câncer – Teses. 2. Expressão gênica – Teses. 3. Carcinoma de células escamosas do esôfago. 4. Câncer – Fatores de risco – Teses. I. Simão, Tatiana de Almeida. II. Pinto, Luis Felipe Ribeiro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.329-006.6

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Identificação de potenciais biomarcadores em carcinoma epidermóide de esôfago a partir de análise randômica de expressão gênica.

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 29 de maio de 2014.

Coorientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a 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

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Instituto Nacional de Câncer

Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola
Instituto Nacional de Câncer

Rio de Janeiro

2014

Dedico este trabalho aos meus amados pais

Angela e Lamy.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luis Felipe, por ter me recebido em seu grupo, por ter topado fazer o microarranjo, pela ótima orientação e compreensão neste momento de dificuldade. Humildemente digo que hoje sou um pouco melhor do que quando entrei no grupo. Saudações tricolores!

À professora Tatiana Simão, acima de tudo uma pessoa muito querida por mim. Obrigado por ter me dado a oportunidade de ser seu orientando, por ter topado minhs idéias, pela ajuda na compra dos reagentes e importações. Por ter ligado pra Kely sempre que eu pedia. Obrigado pela amizade e pelo carinho de sempre;

À Sheila e Nath pela amizade que criamos nesse período e que vamos estender por muito tempo! Foi mais fácil tendo vcs ao meu lado. Agradeço também a Nathalia pela ajuda nos experimentos funcionais, sem você não seria possível fazê-los!

Ao Paulo Thiago, querido ex amigo, ex amante e ex companheiro de bar. Agradeço por ser o único a entender meu humor ácido e infantil. Obrigado pela alimentação balanceada que me ensinou a ter e por fazer do laboratório um cantinho pro nosso amor. Não vou agradecer pelas análises pq pelo Partek seria tudo melhor e mais rápido;

À Lilian pelo auxílio na manipulação das amostras e nas reações de RT. Obrigado pela ajuda e pelo carinho;

À Isabela pela companhia nesses 5 anos e pela coragem de padronizar uma imuno aos 46 do segundo tempo;

Aos meus colegas do laboratório LBTM (UERJ) e PCM (INCA), em especial prof Ana Rossini, Alda, Vanessa, Nina, Ricardo, Leticia, Marcela, Janaina, Claudia, Patricia, Natalia, Monique, Fernanda, Andreia e Vagner. Também a minha querida prima Marina.

À Professora Simone e seu grupo pela companhia nas reuniões e disponibilidade para analisar as imuno;

Aos pacientes de CEE do INCA que se mostraram dispostos a nos ajudar;

Ao serviço de endoscopia, em especial à Dra Maria Aparecida e a Enfermeira Ana Lucia Braga pela ajuda nas coletas;

Ao Banco Nacional de Tumores – INCA por ter me recebido sempre que disponível para manipular as amostras;

Ao Serviço de Genética, em especial ao Albert, Cláudio, Carol, professor Hector e prof Miguel. Ao último agradeço também por toda a ajuda, por liberar a sala de cultura e disponibilizar a plataforma Affymetrix;

Ao Programa de pós-graduação em Biociências, em especial aos secretários, e ao IBRAG/UERJ. São 11 anos nesta universidade, neste querido instituto. Agradeço pela minha formação como biólogo e pela oportunidade do mestrado e doutorado.

Aos meus amigos, irmãos que a gente escolhe durante a vida pelos momentos de descontração e pelo carinho;

À minha enorme família que é um suporte e desafogo em todos os momentos difíceis. Em especial aos meus avós. Dona Marina a senhora é demais!

À minha querida irmã por cuidar de meus pais, por ser ótima com meus filhos e pelo amor de sempre;

Aos meus amados pais, pela luta na minha formação, por terem me dado abrigo, comida, remédio e acima de tudo amor. Este singelo trabalho é dedicado à vocês;

À minha amada esposa que me atura a quase o mesmo tempo que a UERJ. Obrigado por me aturar rabugento, nervoso e gritador. Obrigado pela família que estamos criando. Nossos filhos são o meu melhor projeto, meu melhor resultado e não teria conseguido sem você. Te amo! Dudinha e Antonio ainda não sabem mas vocês são tudo pra mim, obrigado por me receberem em casa com um sorriso no rosto;

Acima de tudo, agradeço a Deus por ter me dado condições de trabalhar e estudar. Por ter acreditado em mim, mesmo quando eu já havia perdido as esperanças. Obrigado Senhor pelos desafios!

Por fim, agradeço as agências de financiamento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Vamos, pra cima fluzão!
Quero, gritar campeão!
Vamos lutar, por mais essa taça,
vamos Fluminense com garra e com raça!

RESUMO

Nicolau-Neto, Pedro. **Identificação de potenciais biomarcadores em carcinoma epidermóide de esôfago a partir de análise randômica de expressão gênica**. 2014. 130 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O câncer de esôfago é um dos mais incidentes e letais no mundo e no Brasil. O subtipo histológico mais frequente é o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), que corresponde a cerca de 80% dos casos. Análises em larga escala de expressão gênica têm sido importantes para o avanço no conhecimento sobre os mecanismos de carcinogênese de diversos tipos de tumor, assim como melhorias na conduta terapêutica dos pacientes oncológicos. Até o momento, poucos trabalhos avaliaram a expressão gênica global através da técnica de microarranjo de DNA em CEE e destes apenas três foram realizados em populações ocidentais. Após análise de expressão global por microarranjo de DNA de 15 pares de CEE e mucosa não tumoral adjacente ao tumor observamos 1064 genes diferencialmente expressos (GDE). Os genes super-expressos no tumor representavam principalmente genes relacionados ao controle do ciclo celular, proliferação e reparo de DNA. Os sub-expressos no tumor foram relacionados a processos metabólicos e diferenciação epidermal. A análise comparativa entre CEE e mucosa saudável mostrou 437 super-expressos e 98 sub-expressos em CEE enquanto a comparação entre a mucosa não tumoral adjacente ao tumor e a mucosa saudável resultou em 27 GDE. Os genes *PI3KR3* e *AKT3*, pertencentes a via de PI3K – AKT, mostraram-se super-expressos em CEE e os valores de expressão foram capazes de discriminar alterações no epitélio. O gene *FSCN1* apresentou-se super-expresso em CEE em relação tanto à mucosa adjacente quanto à mucosa saudável e super-expresso na mucosa adjacente em relação à mucosa saudável. Essa expressão mostrou-se como fator independente de prognóstico e capaz de identificar alterações no epitélio esofágico. A partir do enriquecimento de vias de controle do ciclo celular, analisamos o perfil de expressão de *FOXM1* e de membros de sua via de sinalização. *FOXM1* apresentou-se super-expresso em CEE em relação à mucosa adjacente e à mucosa saudável e sua expressão apresentou sensibilidade e especificidade elevadas para identificação de alterações no epitélio esofágico. Todos os alvos de FOXM1 encontrados super-expressos no microarranjo foram validados por PCR em tempo real e a expressão de *MMP12* também foi caracterizada como fator independente de prognóstico dos pacientes de CEE. Análises funcionais modulando a expressão de FOXM1 na linhagem TE1 foram realizadas mas nenhuma alteração em viabilidade celular, taxas de proliferação e fase do ciclo celular foi observada.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide de esôfago. Microarranjo. Biomarcador. FOXM1.

ABSTRACT

Nicolau-Neto, Pedro. *Identification of potential biomarkers in esophageal squamous cell carcinoma from random gene expression analysis*. 2014. 130 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Esophageal cancer is one of the most prevalent and lethal tumors worldwide and in Brazil. The most common histological subtype is esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), corresponding to approximately 80% of the cases. Large-scale analysis of gene expression has been helpful in comprehending the carcinogenesis process of different tumor types and improving the therapeutic management of cancer patients. Few studies have assessed global gene expression by DNA microarray technique in ESCC to date. Only three studies were conducted in Western populations. After analyzing the global gene expression by DNA microarray in 15 pairs of ESCC and non-tumor mucosa samples, we identified 1064 differentially expressed genes (DEG). The upregulated genes in tumors were mainly related to controlling the cell cycle, proliferation, and DNA repair. On the other hand, the downregulated genes were related to metabolic processes and epidermal differentiation. The comparative analysis between tumors and healthy mucosa showed 437 overexpressed and 98 downregulated genes in ESCC, while the comparison between adjacent non-tumor mucosa and healthy esophageal samples showed 27 DEG. The *PI3KR3* and *AKT3* genes, members of the PI3K-AKT signaling pathway, were upregulated in ESCC, and their expression levels could predict potential malignant changes in the esophageal epithelium. Furthermore, an increase in *FSCN1* expression was observed in tumors compared with the paired non-tumor adjacent tissue and in the non-tumor mucosa compared to the healthy mucosa. The expression levels of *FSCN1* were an independent prognosis biomarker for ESCC patients and a predictor of changes in the esophageal epithelium. Since cell cycle control was one of the enriched pathways in our analyses, we evaluated the expression profile of *FOXM1* and members of its signaling pathway. *FOXM1* was overexpressed in ESCC compared to the non-tumor adjacent tissue and the healthy mucosa, and its expression showed high sensitivity and specificity for identifying changes in the esophageal epithelium. All upregulated targets of *FOXM1* identified in the microarray analysis were validated by real-time PCR, and *MMP12* expression was shown to be an independent prognosis predictor for ESCC patients. Functional analyses modulating *FOXM1* expression were performed in the TE1 cell line, but no changes in cell viability, proliferation, or cell cycle were observed.

Keywords: Esophageal squamous cell carcinoma. Microarray. Biomarker. FOXM1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Taxas de incidência e mortalidades dos principais tumores no mundo, ajustado por idade	23
Figura 2 -	Representação geográfica mundial da incidência de câncer de esôfago, ajustado por idade, para ambos os sexos	24
Figura 3 -	Evolução temporal da carcinogênese de tumores epidermóides no esôfago e exemplificação dos momentos fundamentais para a prevenção e diagnóstico da doença	26
Figura 4 -	Cromoendoscopia com lugol exemplificando uma área aparentemente normal em endoscopia de luz branca mas que evidenciou uma displasia de alto grau quando feito o teste de Schiller	28
Figura 5 -	Representação espacial da distribuição das taxas brutas de incidência de câncer de esôfago por 100.000 indivíduos, no Brasil em homens (A) e mulheres (B), estimadas para 2014 pelo INCA	29
Figura 6 -	Representação da associação entre as alterações moleculares associadas a carcinogênese esofágica e a história natural da doença	32
Figura 7 -	Cronologia do desenvolvimento de um biomarcador	38
Figura 8 -	Eletroferograma representando o padrão de RNA encontrado na amostra de tumor 05 analisada no equipamento Bioanalyzer (Agilent)	43
Figura 9 -	Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida global dos pacientes com CEE participantes do estudo	58
Figura 10 -	Representação gráfica do número de GDE em relação ao número de pares de amostras de pacientes com CEE analisado	59
Figura 11 -	Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de DNA entre as amostras tumorais e mucosas não tumorais adjacentes ao tumor	60
Figura 12 -	Gráfico em forma de vulcão representando os GDEs em CEE	61
Figura 13 -	<i>Heatmap</i> apresentando o agrupamento hierárquico bayesiano não supervisionado das amostras de CEE e tecido adjacente ao tumor utilizando valores de expressão dos GDE	63
Figura 14 -	Enriquecimento na plataforma <i>Gene Ontology</i> dos GDEs presentes no <i>cluster</i> gênico 1 no agrupamento das amostras de CEE e mucosa não	

	tumoral adjacente ao tumor	64
Figura 15 -	Enriquecimento na plataforma <i>Gene Ontology</i> dos GDE presentes no <i>cluster</i> gênico 2A no agrupamento das amostras de CEE e mucosa não tumoral adjacente ao tumor	65
Figura 16 -	Enriquecimento na plataforma <i>Gene Ontology</i> dos GDE presentes no <i>cluster</i> gênico 2B no agrupamento das amostras de CEE e mucosa não tumoral adjacente ao tumor	66
Figura 17 -	Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de DNA entre as amostras tumorais e epitélio esofágico saudável	67
Figura 18 -	Gráfico em forma de vulcão representando os GDE na comparação de expressão gênica global entre CEE e mucosa esofágica saudável	68
Figura 19 -	<i>Heatmap</i> apresentando o agrupamento hierárquico bayesiano não supervisionado das amostras de CEE e epitélio esofágico saudável utilizando valores de expressão dos GDE	70
Figura 20 -	Enriquecimento na plataforma <i>Gene Ontology</i> dos GDEs presentes no <i>cluster</i> gênico 1 no agrupamento das amostras de CEE e mucosa esofágica saudável	71
Figura 21 -	Enriquecimento na plataforma <i>Gene Ontology</i> dos GDEs presentes no <i>cluster</i> gênico 2 no agrupamento das amostras de CEE e mucosa esofágica saudável	72
Figura 22 -	Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de cDNA entre as amostras de mucosa não-tumoral adjacente ao CEE e epitélio esofágico saudável	73
Figura 23 -	Gráfico em forma de vulcão representando os GDE na comparação de expressão gênica global entre a mucosa não tumoral adjacente ao CEE e mucosa esofágica saudável	74
Figura 24 -	Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDEs entre mucosa adjacente ao tumor e esôfago saudável e formação de grupos gênicos	76
Figura 25 -	Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de DNA entre todas as amostras analisadas	77
Figura 26 -	Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando valores de	

	expressão dos GDE observados entre CEE e mucosa adjacente	78
Figura 27 -	Correlação de valores de expressão entre microarranjo de DNA e PCR em tempo real. Valores de expressão dos genes <i>FOXM1</i> , <i>PIK3R3</i> , <i>AKT3</i> , <i>HOXD10</i> , <i>ETV5</i> , <i>PLK1</i> , <i>CCNB1</i> , <i>FSCN1</i> , <i>CDK1</i> , <i>MMP12</i> , <i>MMP9</i> , <i>STAT3</i> e <i>GUSB</i> , nas amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor	79
Figura 28 -	Análise do perfil de expressão gênica de <i>FOXM1</i> em amostras de CEE, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável e seu potencial em distinguir estes tecidos	81
Figura 29 -	Associação entre a variação da expressão gênica de <i>FOXM1</i> e <i>ETV5</i> em CEE	82
Figura 30 -	Análise do perfil de expressão gênica de membros da via de <i>FOXM1</i> em CEE	83
Figura 31 -	Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE separados pelos níveis de expressão gênica de <i>MMP12</i> na mucosa adjacente ao tumor	84
Figura 32 -	Expressão de <i>FOXM1</i> e de genes alvo na linhagem de CEE TE1 após tratamento com siRNA- <i>FOXM1</i>	86
Figura 33 -	Expressão de <i>FOXM1</i> e de genes alvo na linhagem de CEE TE1 após tratamento com vetor de expressão de <i>FOXM1</i>	87
Figura 34 -	Ensaio de MTT na linhagem de CEE TE1 após tratamentos para silenciamento e super-expressão de <i>FOXM1</i>	88
Figura 35 -	Ensaio de incorporação de cristal violeta na linhagem de CEE TE1 após tratamentos para silenciamento e super-expressão de <i>FOXM1</i>	89
Figura 36 -	Avaliação da fase do ciclo celular de células da linhagem de CEE TE1 após tratamento de silenciamento e super-expressão de <i>FOXM1</i>	90
Figura 37 -	Análise da expressão gênica de <i>PI3KR3</i> (A) <i>AKT3</i> (B) e <i>STAT3</i> (C) entre amostras de CEE, tecido não tumoral adjacente ao tumor e tecido epitelial esofágico saudável	91
Figura 38 -	Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre epitélio tumoral, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável utilizando como base valores de expressão dos genes <i>STAT3</i> , <i>PI3KR3</i> e <i>AKT3</i>	93
Figura 39 -	Análise da expressão gênica de <i>FSCN1</i> e de <i>HOXD10</i> entre amostras de CEE, tecido pareado adjacente ao tumor e tecido epitelial esofágico	

	saudável e associação entre a expressão gênica destes dois genes	95
Figura 40 -	Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE separados pelos níveis de expressão gênica de <i>FSCN1</i> na mucosa adjacente ao tumor	96
Figura 41 -	Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre epitélio tumoral, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável utilizando como base valores de expressão dos genes <i>FSCN1</i> e <i>HOXD10</i>	97
Figura 42 -	Representação esquemática da atuação de FOXM1 na carcinogênese	103
Figura 43 -	Atuação de FOXM1 nas etapas cruciais da carcinogênese	104
Figura 44 -	Genes diferencialmente expressos em CEE enriquecidos na via de FOXM1 identificados pela técnica de microarranjo de DNA	105
Figura 45 -	Via de sinalização de PI3K – AKT	109
Figura 46 -	Representação da atividade de FSCN1 na organização dos filamentos de actina na célula	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Pesquisa de números trabalhos em câncer relacionados à tecnologia de microarranjo de DNA	35
Quadro 2 –	Estratificação dos trabalhos publicados correlacionando microarranjo de DNA e CEE pela nacionalidade dos pacientes estudados	36
Quadro 3 –	Dados clínico e patológicos das amostras de CEE	41
Quadro 4 –	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores das reações de qPCR	50
Quadro 5 –	Características da linhagem TE1 e capacidade de tumorigenicidade em camundongos	52
Quadro 6 –	Características clínicas e patológicas dos pacientes com CEE participantes do estudo	57
Quadro 7 –	Características clínico-patológicas dos pacientes com CEE e associação com sobrevida global	58
Quadro 8 –	Lista dos 20 genes mais super-expressos e dos 20 mais sub-expressos nos tumores quando comparados com a mucosa não tumoral adjacente ao tumor	62
Quadro 9 –	Lista dos 20 genes mais super-expressos e dos 20 mais sub-expressos entre as amostras tumorais de CEE e o tecido epitelial esofágico saudável	69
Quadro 10 –	Lista dos genes diferencialmente expressos entre mucosa não tumoral adjacente a CEE e mucosa saudável	75
Quadro 11 –	Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando valores da expressão gênica de <i>FOXM1</i> no tumor e na mucosa adjacente a CEE	80
Quadro 12 –	Matriz de correlação entre a expressão gênica dos genes da via de sinalização de FOXM1 analisados	84
Quadro 13 –	Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando valores da expressão gênica de <i>MMP12</i> no tumor e na mucosa adjacente a CEE	85
Quadro 14 -	Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento da influência da expressão gênica de <i>PI3KR3</i> , <i>AKT3</i> e <i>STAT3</i> no tumor e	

	na mucosa adjacente na sobrevida dos pacientes de CEE	92
Quadro 15 -	Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando valores da expressão gênica de <i>FSCN1</i> e <i>HOXD10</i> no tumor e na mucosa adjacente a CEE	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Adenocarcinoma de esôfago
AKT	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
APE	<i>Humanapurinic/ apyrimidinendonuclease</i>
AURKA	<i>Aurora kinase A</i>
Bcl-2	<i>B-cell CLL/Lyphoma 2</i>
Bcl-3	<i>B-cell CLL/Lyphoma 3</i>
Bcl-XL	<i>B-cell lymphoma -extra large</i>
BNT	Banco Nacional de Tumores e DNA
BRAF	<i>V-Raf murine sarcoma viral oncogene</i>
CCNB1	<i>Cyclin B1</i>
CDC25	<i>Cell division cycle 25C</i>
CDK	Cinase dependente de cilcina
CDK1	<i>Cyclin dependent kinase 1</i>
cDNA	DNA complementar
CE	Câncer de esôfago
CEE	Carcinoma epidermóide de esôfago
CENPA	<i>Centromere protein A</i>
CENPB	<i>Centromere protein B</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Cq	Ciclo de quantificação
cRNA	RNA complementar
DIPAT	Divisão de Patologia do INCA
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotideo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor 1</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ETV5	<i>Ets Variant 5</i>
FKHL16	<i>Forkhead, Drosophila, Homolog Like 16</i>
FOXM1	<i>Forkhead Box M1</i>
FOXM1- pcDNA3	Sequencia codificante integral do FOXM1 clonada no vetor pcDNA3
FSCN1	<i>Fascin homolog 1</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDE	Genes diferencialmente expressos
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
GUSB1	<i>Glucuronidase beta1</i>
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
HER-2	<i>Epidermal growth factor receptor 2</i>
HFH-11	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 3 Forkhead Homolog 1</i>

Hox	Homeobox
<i>HOXA5</i>	Homeobox A5
<i>HOXB13</i>	Homeobox B13
<i>HOXC6</i>	Homeobox C6
<i>HOXD10</i>	Homeobox D10
HPV	Papiloma vírus humano
Hsp70	<i>Heat shock protein 70kDa</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ICGC	Internacional Cancer Genome Consortium
<i>IGF2</i>	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MEK	<i>Mitogen activated protein kinase kinase</i>
<i>MMP12</i>	Matriz metaloproteinase 12
<i>MMP9</i>	Matriz metaloproteinase 9
<i>MPP2</i>	<i>M Phase Phosphoprotein 2</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>New Generation Sequencing</i>
<i>P21CIP1</i>	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
<i>P27KIP1</i>	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B</i>
PC1	Primeiro componente principal
PC2	Segundo componente principal
pcDNA3	Vetor plasmidial
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
<i>PIK3R3</i>	<i>Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3</i>
<i>PLK1</i>	<i>Polo-like kinase 1</i>
PSA	Antígeno prostático específico
qPCR	PCR quantitativo
RIN	Medida de integridade de RNA
RMA	<i>Robust Multi-array Average</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
rRNA	RNA ribossomal
SCR	siRNA controle
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	<i>Small interfering RNA, RNA de interferência</i>
SP1	<i>Sp1 transcription factor</i>
<i>SPRR3</i>	<i>Small proline-rich protein 3</i>
ssDNA	<i>Single strand DNA, fita simples de DNA</i>
<i>STAT3</i>	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TCEAL1	<i>Transcription Elongation Factor A (SII)-Like 1</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TdT	Terminal Deoxinucleotidil Transferase
TE-1	Linhagem celular TE-1
<i>TFF1</i>	<i>Trefoil factor 1</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNM	Sistema de estadiamento do tumor
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
Trident	<i>Transcription Factor Trident</i>
UDG	<i>Uracil-DNA Glycosylase</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VEGF	Vascular endothelial growth facto
<i>WDR66</i>	<i>WD repeat domain 66</i>
Win	<i>Winged-Helix Factor From INS-1 Cells</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
μL	Microlitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa
U	Unidade
°C	Graus Celsius
g	Gramas
nm	Nanometros
ng	Nanogramas
μg	Microgramas

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1	OBJETIVOS	39
1.1	Geral	39
1.2	Específicos	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1	Coleta das amostras e dos dados clínico-patológicos dos pacientes	40
2.2	Extração de RNA e determinação da integridade	42
2.2.1	<u>Extração de RNA</u>	42
2.2.2	<u>Quantificação e Determinação da Integridade do RNA</u>	43
2.3	Microarranjo de DNA	44
2.3.1	<u>Fragmentação e Hibridação no Chip Human Exon 1.0 ST</u>	46
2.3.2	<u>Leitura dos Chips e aquisição dos valores de expressão</u>	47
2.3.3	<u>Determinação de genes diferencialmente expressos</u>	47
2.4	Validação do resultado do microarray de DNA por PCR em tempo real	48
2.4.1	<u>Síntese cDNA - Reação da Transcriptase Reversa</u>	48
2.4.2	<u>PCR em tempo real</u>	49
2.5	Análises estatísticas	51
2.6	Ensaio funcionais com linhagem celular de CEE	51
2.6.1	<u>Linhagem Celular</u>	51
2.6.2	<u>Inibição da Expressão Gênica de <i>FOXM1</i> pelo uso de RNA de Interferência (siRNA)</u>	52
2.6.3	<u>Transfecção do Vetor de Expressão de <i>FOXM1</i></u>	53
2.6.4	<u>Ensaio de proliferação celular</u>	54
2.6.5	<u>Avaliação do ciclo celular</u>	54
2.6.6	<u>Ensaio de apoptose</u>	55
3	RESULTADOS	56
3.1	Dados clínicos e patológicos de pacientes com CEE	56
3.2	Análise randômica do perfil de expressão gênica global de carcinoma epidermoide de esôfago através da técnica de microarranjo de DNA	59
3.2.1	<u>Determinação do número de amostras para a análise de expressão global por</u>	

	<u>microarranjo de DNA</u>	59
3.2.2	<u>Comparação do perfil de expressão gênica global do tecido tumoral com a mucosa adjacente ao tumor</u>	60
3.2.2.1	Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDE e formação de grupos gênicos	63
3.2.2.2	Enriquecimento dos <i>clusters</i> gênicos na plataforma <i>Gene Ontology</i>	64
3.2.3	<u>Comparação entre o perfil de expressão gênica global ente o tecido tumoral e mucosa saudável de pacientes livres de câncer</u>	66
3.2.3.1	Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDEs e formação de grupos gênicos	68
3.2.3.2	Enriquecimento dos <i>clusters</i> gênicas na plataforma <i>Gene Ontology</i>	71
3.2.4	<u>Comparação entre o perfil de expressão gênica global ente a mucosa não-tumoral adjacente ao CEE e tecido epitelial saudável de pacientes sem histórico de câncer</u>	73
3.2.4.1	Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDE e formação de grupos gênicos	75
3.2.5	<u>Análise do perfil de expressão gênica global entre os três grupos, tumor, tecido não tumoral adjacente ao tumor e tecido esofágico saudável</u>	76
3.3	Validação da análise randômica de expressão gênica global através de microarranjo de DNA por PCR em tempo real	79
3.3.1	<u>Análise da expressão gênica de <i>FOXMI</i> (“Forkhead box protein M1”) e de membros de sua via de sinalização celular em CEE</u>	80
3.4	Análise da atividade de <i>FOXMI</i> na linhagem de CEE TE1	85
3.4.1	<u>Silenciamento e super-expressão de <i>FOXMI</i> utilizando tratamentos com siRNA e vetor de expressão plasmidial, respectivamente</u>	85
3.4.2	<u>Análise de viabilidade celular após tratamento de silenciamento e super-expressão de <i>FOXMI</i> na linhagem TE1</u>	87
3.4.3	<u>Análise de níveis de proliferação celular após tratamento de silenciamento e super-expressão de <i>FOXMI</i> na linhagem TE1</u>	88
3.4.4	<u>Análise de fase do ciclo celular</u>	89
3.5	Análise da expressão gênica de fosfoinosítídeo 3 quinase – subunidade regulatória gama (<i>PI3KR3</i>) e da proteína quinase AKT3 (<i>AKT3</i>) e do gene da proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3 (<i>STAT3</i>) em	

	CEE	90
3.6	Análise da expressão gênica de <i>FSCN1</i> (“<i>Fascin1</i>”) e de <i>HOXD10</i> (“<i>Homeobox D10</i>”) em CEE	94
	DISCUSSÃO	98
4	Avaliação da via de FOXM1 em CEE	101
4.1	Importância da ativação da via de sinalização PI3K – AKT em CEE	107
4.2	Valor prognóstico da expressão de <i>FSCN1</i>, sua atuação como biomarcador de alterações epiteliais no esôfago e associação de expressão com fator de transcrição	
4.3	HOXD10	110
	CONCLUSÕES	113
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética INCA	129
	ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética HUPE	130

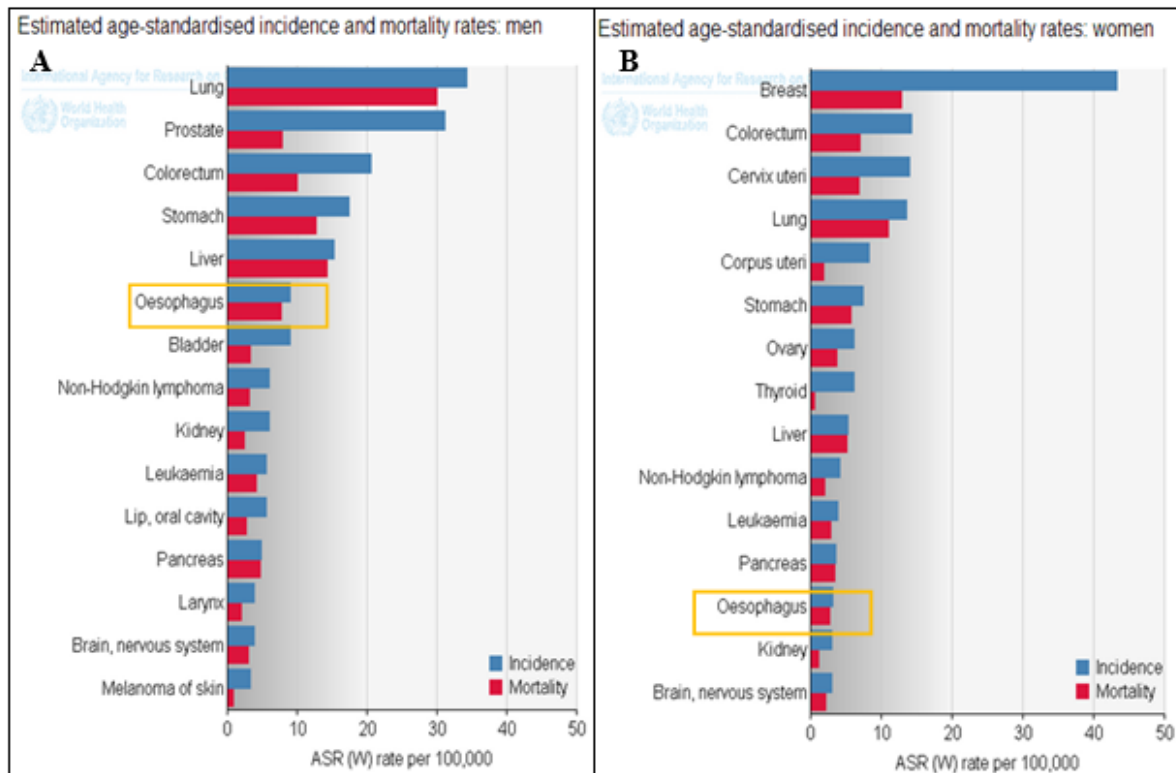
INTRODUÇÃO

Epidemiologia do câncer de esôfago no mundo

O câncer de esôfago (CE) é uma das 10 neoplasias mais incidentes e fatais no mundo. Segundo dados do GLOBOCAN, projeto que estima a incidência e mortalidade dos principais tipos de câncer no mundo, o câncer de esôfago é classificado como a sexta neoplasia mais incidente em homens e a décima terceira entre as mulheres para o ano de 2012. Quanto aos novos casos de CE, são esperados para o sexo masculino aproximadamente 323 mil novos casos, correspondendo a 4,3% dos novos casos de câncer em homens no mundo, e aproximadamente 281 mil mortes em decorrência desta neoplasia, representando 6% das mortes por câncer no sexo masculino. Para o sexo feminino as estimativas de incidência indicam que anualmente ocorrem aproximadamente 132 mil novos casos de CE e 119 mil mortes por essa neoplasia, representando 2,0% dos novos casos e 3,4% das mortes em decorrência de tumores malignos em mulheres no mundo (Figura 1) (Farley *et.al*, 2013). Estimativas indicam que a incidência de CE não irá diminuir nos próximos anos e em 2025 são esperados mais de 640 mil novos casos em ambos os sexos, número 40% maior do que o observado em 2012 (Farley *et. al*, 2013).

A taxa de mortalidade do CE se apresenta muito mais alarmante quando comparado a dados de tumores com maior destaque na mídia, como os tumores de próstata e de mama. Por exemplo, para o câncer de próstata, anualmente são estimados mais de um milhão e cem mil casos e aproximadamente 307.000 mortes no mundo. A razão entre mortalidade e incidência anual desse tipo de tumor é de 0,28, isto é, ocorrem 28 mortes a cada 100 casos. Já a razão entre mortalidade e incidência de câncer de mama é um pouco maior que a de próstata, 31 mortes para cada 100 indivíduos acometidos. Entretanto, para o CE esta razão é de 0,87, ou seja, 87 mortes para cada 100 casos, evidenciando a severa agressividade dessa neoplasia. A sobrevivência de CE de cinco anos é estimada em menos de 20% dos casos (Cohen e Ajani 2011). Este fato é consequência do diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas costumam aparecerem estádios bem avançados, resultando na ineficácia do tratamento (McLarty *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1997).

Figura 1 - Taxas de incidência e mortalidades dos principais tumores no mundo, ajustado por idade. O CE é o sexto mais incidente em homens e o 13º mais incidente em mulheres no mundo. As taxas de incidência e mortalidade são muito próximas, indicando a alta letalidade desta doença.

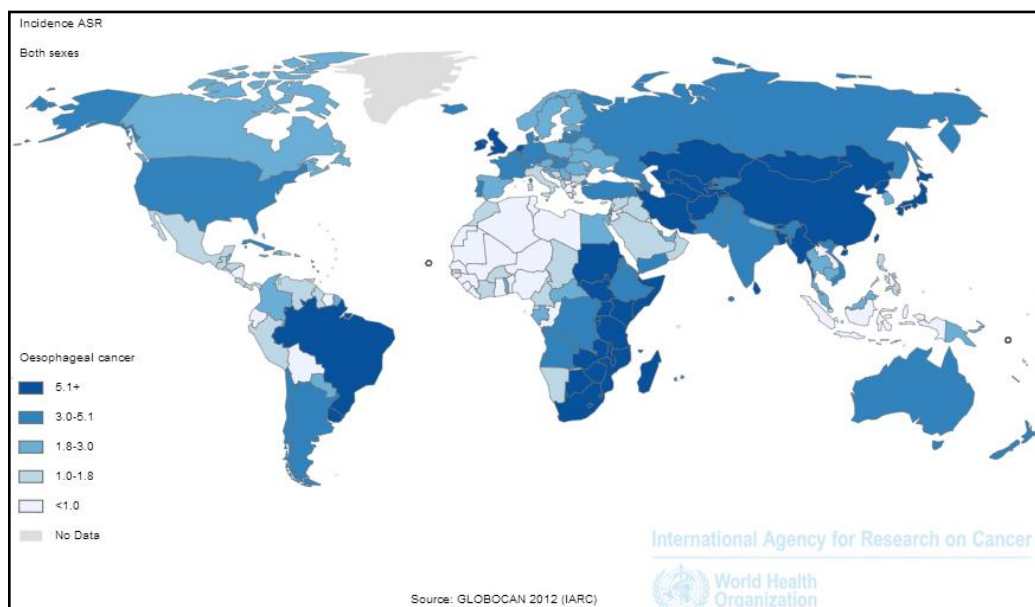


Legenda: A - taxas de incidência e mortalidade para indivíduos do sexo masculino. B - taxas de incidência e mortalidade para indivíduos do sexo feminino.

Fonte: Farley *et al.*, 2013.

A incidência de CE no mundo apresenta uma ampla variação geográfica, podendo variar até 500 vezes de uma parte do mundo para outra (Eslick, 2009), com regiões que apresentam alto risco de CE próximas a regiões que apresentam baixo risco, como pode ser observado no mapa de incidência do CE no mundo, representado pela Figura 2. A variação na incidência reflete a forte influência de fatores socioambientais no desenvolvimento do CE (Smeds *et al.*, 2002), sendo os países em desenvolvimento responsáveis pelas maiores incidências de CE, registrando 83% dos casos e 86% dos óbitos decorrentes da doença. Dentre os países que apresentam maior incidência podemos citar os localizados no sul e leste da África, como o Quênia, no "cinturão asiático do câncer de esôfago", do norte do Irã até a China, no Sul da América do Sul, como Brasil e Uruguai e alguns países desenvolvidos, como a França e Inglaterra (Parkin *et al.*, 2005, Eslick, 2009, Jemal *et al.*, 2011).

Figura 2 - Representação geográfica mundial da incidência de câncer de esôfago, ajustado por idade, para ambos os sexos. As regiões com maiores incidências de CE são Ásia, África, América do Sul e alguns países da Europa, como Inglaterra.



Legenda: Escala em tons de azul de representação de incidência de câncer de esôfago no mundo. Tons mais claros: regiões de menor incidência; Tons mais escuros: regiões de maior incidência.

Fonte: Farley *et al*, 2013.

O CE é subdividido em dois tipos histológicos principais, o carcinoma epidermóide ou de células escamosas (CEE) e o adenocarcinoma de esôfago (ADE), que diferem quanto aos fatores etiológicos associados, às populações afetadas, à localização geográfica e às alterações moleculares envolvidas com a gênese e progressão da doença (Hongo, 2009).

Em termos de estratificação geográfica, regiões desenvolvidas, como a Europa Ocidental e, sobretudo, os Estados Unidos, apresentam uma alta prevalência de ADE, onde este associa-se especialmente às elevadas taxas de obesidade (Seer, 2009). O tabagismo foi identificado como fator de risco para o ADE, mas o etilismo mostrou estar pouco relacionado à gênese da doença (Toh *et al.*, 2010). Além disto, existem condições clínicas pré-disponentes para o desenvolvimento do ADE, como o esôfago de Barrett.

O CEE, como dito anteriormente, apresenta uma grande variação da incidência na distribuição geográfica (Smeds *et al.*, 2002). As áreas de maior incidência deste tipo de câncer são: China (21/100.000 habitantes), América do sul (13/100.000 habitantes), o Oeste Europeu (11/100.000 habitantes), África do sul (10/100.000 habitantes), Japão (9/100.000 habitantes) e

algumas regiões da antiga União Soviética (8/100.000 habitantes). Dentro destas grandes áreas são identificadas regiões menores, nas quais a incidência de CEE pode ser de 10 a 50 vezes maior, tais como regiões que incluem o centro e o norte da China, sul da Tailândia, norte da Itália, regiões montanhosas do Japão, parte da costa do Irã, certas províncias da França (Pickens e Orringer, 2003) e região sul do Brasil (Corley e Buffler, 2001).

Vários trabalhos epidemiológicos, baseados em estudos caso-controle, têm identificado os principais fatores de risco para o CEE. Estes fatores incluem principalmente o consumo moderado/alto de álcool e o hábito de fumar, sendo que, em países ocidentais, o consumo concomitante desses dois fatores apresenta um risco multiplicador (IARC, 1986; Castellsagué *et al.*, 1999). Além disso, há a sugestão de que o fumo tenha um papel importante tanto na iniciação quanto na promoção do tumor, enquanto o álcool teria um papel mais relevante na promoção, uma vez que após 10 anos de abstinência de álcool o risco retorna aos valores dos abstêmios, enquanto após 10 anos sem tabaco o risco diminui apenas 50,0% (Castellsagué *et al.*, 1999).

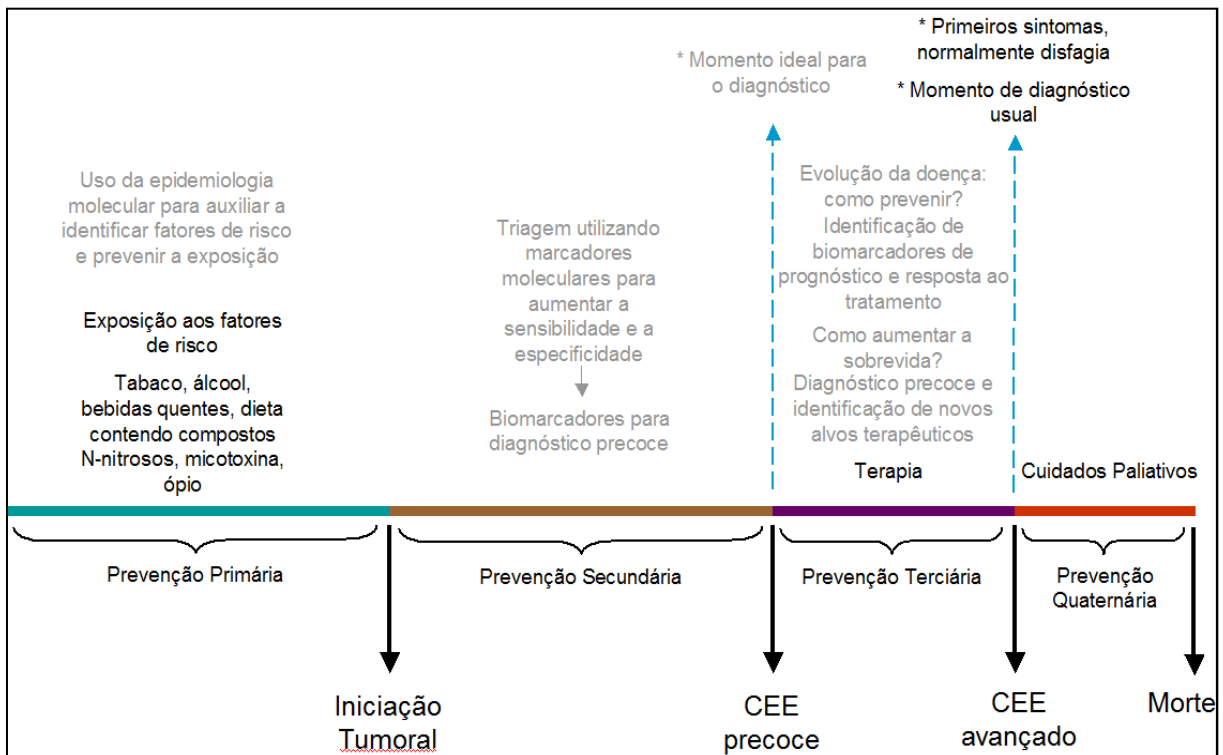
No entanto, outros fatores contribuem para a gênese do CEE. A contaminação de alimentos por nitrosaminas, compostos com ação carcinogênica potente e que apresentam grande organotropismo para o esôfago (Lijinsky, 1992), a desnutrição e o consumo de chá quente estão envolvidos na etiologia deste câncer na China e na Índia. No Irã, além da desnutrição e da ingestão de chá quente, o consumo de ópio aparece entre os principais fatores de risco. No Japão apenas o consumo de chá quente parece ter relação direta na carcinogênese esofágica (Tuyns, 1979; Sepehr *et al.*, 2001).

Historia Natural do CEE

A história natural proposta para o desenvolvimento de CEE se baseia numa exposição de longo prazo do indivíduo aos agentes etiológicos que ocasionarão a transformação neoplásica na mucosa esofágica. Essas alterações são raramente detectadas nos primeiros estádios, quando a cirurgia curativa, isto é, a excisão do tumor *in situ* é possível (Chen *et al.*, 1999). Infelizmente, para a maioria dos pacientes o tumor é detectado em fases tardias, quando a quimiorradioterapia neoadjuvante seguida ou não por esofagectomia são os procedimentos empregados. Entretanto, a resposta à esses tratamentos raramente apresenta sucesso em permitir uma sobrevida a longo prazo (da Costa *et al.*, 2013).

Intervenções podem ocorrer a fim de impedir o desenvolvimento da doença, como a identificação e diminuição da exposição aos principais fatores etiológicos (etilismo e tabagismo), ao passo que a prevenção secundária pode ocorrer por meio de programas de rastreamento de grupos de alto risco para desenvolvimento da doença, como indivíduos com tumores da cavidade oral ou de laringe, 30% dos quais apresentam displasia de alto grau no epitélio esofágico ou um segundo tumor primário no esôfago (Fukuhara *et al.*, 2010). A prevenção terciária ocorreria por meio da detecção precoce de CEE e a quaternária permitiria ao paciente uma melhor sobrevida, com tratamentos paliativos (Figura 3) (Chen *et al.*, 2013).

Figura 3 - Evolução temporal da carcinogênese de tumores epidermóides no esôfago e exemplificação dos momentos fundamentais para a prevenção e diagnóstico da doença. A prevenção primária refere-se a identificação dos fatores de risco relacionados a carcinogênese esofágica e prevenção a exposição. A prevenção secundária é importante para identificar um tumor em estágios iniciais, com utilização de biomarcadores de diagnóstico precoce e rastreamento em grupos de alto risco. A prevenção terciária está relacionada a terapias contra o CEE, com utilização de biomarcadores de prognóstico e preditores de resposta ao tratamento. Entretanto, devido ao diagnóstico tardio, os pacientes são encaminhados a cuidados paliativos.



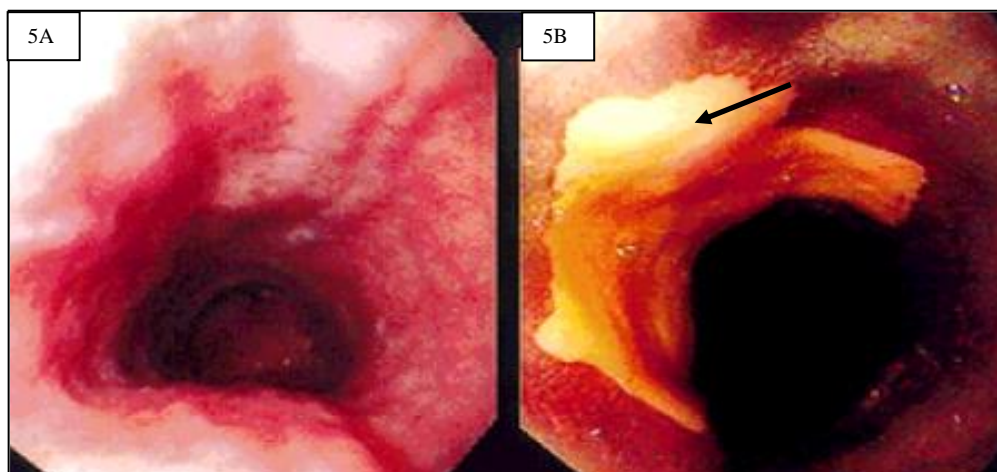
Fonte: adaptado de daCosta *et al.*, 2013.

Técnicas para triagem citológica de CEE têm sido desenvolvidos na tentativa de ser possível uma detecção precoce desse tipo tumoral. A necessidade de um diagnóstico precoce de CEE tem seu valor aumentado especialmente em regiões de elevada incidência da doença, como Linxian na China, norte do Irã e também o Brasil, onde há um grande número de pessoas assintomáticas portadoras da doença (Fitzgerald e Bird-Lieberman, 2009). O uso de balão citológico, um balão coberto de rede inflado no estômago e recolhido ao longo do esôfago, é um dos métodos mais utilizados. Células capturadas na membrana que recobrem o balão são examinadas em lâminas e avaliadas quanto a presença de processos neoplásicos (Dawsey *et al.*, 1997) . Entretanto, este diagnóstico citológico apresenta baixa sensibilidade (14 a 36% de acerto) numa comparação de técnicas, onde a biópsia endoscópica foi mais eficiente (Dawsey *et al.*, 1997) .

Tradicionalmente, a endoscopia de luz branca pode identificar características macroscópicas de tumores, tais como nódulos, úlceras ou estenoses. Infelizmente, os CEE precoces, especialmente a displasia de alto grau, não são comumente observados pois apresentam características macroscópicas semelhantes ao epitélio esofágico normal ou com processo inflamatório.

Para aumentar a sensibilidade é utilizada a cromoendoscopia com lugol (*Schiller test*), técnica que consiste na aplicação de lugol no esôfago resultando na coloração diferencial do tecido, possibilitando a detecção de displasias e lesões neoplásicas em estágios iniciais, pois 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. Com o processo de desdiferenciação do epitélio esofágico, a reserva de glicogênio deste tecido é perdida e o lugol não cora o tecido (Figura 4) (Dawsey *et al.*, 1998). Com a cromoendoscopia utilizando o lugol é possível visualizar aproximadamente 90% das áreas com displasias de alto grau e CEE (Mori *et al.*, 1993; Shimizu *et al.* 2001, Fukuhara *et al.*, 2010).

Figura 4 - Cromoendoscopia com lugol exemplificando uma área aparentemente normal em endoscopia de luz branca mas que evidenciou uma displasia de alto grau quando feito o teste de Schiller.



Legenda: Figura 4A: endoscopia de luz branca; 5B: cromoendoscopia com lugol. Seta: área não corada com lugol, posteriormente diagnosticado como displasia de alto (carcinoma estadio 1A).

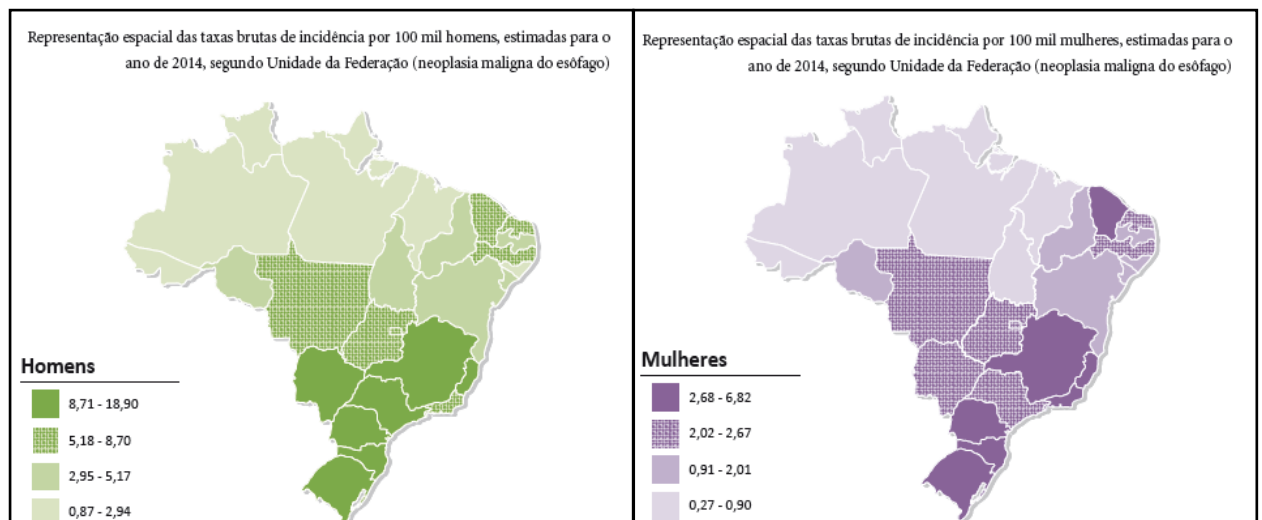
Fonte: Dawsey *et al.*, 1998

Câncer de Esôfago no Brasil

Segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2014, esperam-se mais de 10 mil novos casos de CE, sendo 8.010 casos em homens e 2.770 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 8,18 casos novos a cada 100 mil homens e 2,70 a cada 100 mil mulheres. No Brasil o CEE representa cerca de 90% do total dos casos de CE, acomete principalmente pacientes do sexo masculino com idade entre 55 e 65 anos e a localização preferencial desses tumores é no terço médio do esôfago (INCA, 2014). Na região sul do Brasil há uma situação mais complexa, pois além do elevado consumo de álcool e tabaco, há o consumo de chimarrão (chá da erva mate consumido em uma temperatura de aproximadamente 70°C), hábito que contribui para o desenvolvimento do CEE por gerar uma lesão térmica recorrente (IARC, VOL. 51; Castellsagué *et al.*, 1999 e 2000).

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de esôfago em homens é o quinto mais frequente na região Sul (15,97/100 mil), o sexto na região Centro-Oeste (6,88/100 mil), o sétimo nas regiões Sudeste (9,45/100 mil) e Nordeste (4,50/100 mil), e o 11º na região Norte (1,88/100 mil). Para as mulheres, é o 13º mais frequente nas regiões Sul (5,27/100 mil), Sudeste (2,86/100 mil) e Nordeste (1,80/100 mil). Já nas regiões Centro-Oeste (2,39/100 mil) e Norte (0,67/100 mil), é o 14º (Figura 5) (INCA, 2014).

Figura 5 - Representação espacial da distribuição das taxas brutas de incidência de câncer de esôfago por 100.000 indivíduos, no Brasil em homens (A) e mulheres (B), estimadas para 2014 pelo INCA. Pode-se observar maior incidência de CE nas regiões Sudeste e Sul do Brasil.



Fonte: INCA, 2014

Alterações Moleculares e CEE

A gênese do CEE esta intimamente associada à exposição aos diferentes agentes cancerígenos, apresentando variação de frequência nas populações de acordo com o tipo de agente e a quantidade / frequência de exposição. Os agentes cancerígenos influenciam no tipo de alterações genéticas, genômicas e epigenéticas presentes no tumor, levando em alguns casos a mudanças que são "assinaturas" destes agentes específicos. Essas alterações moleculares podem nos ajudar a entender a história natural do CEE (Figura 6).

Mutações no gene *TP53* são as mais frequentes alterações em CEE, estando presente em aproximadamente 45% dos tumores (Olivier *et al.*, 2002), surgindo precocemente na progressão neoplásica, uma vez que pode ser detectado também no tecido adjacente ao tumor (Mandard, *et al.* 2000). Estudos tem relatado que a prevalência de mutações no gene *TP53* em CEE variam de 35 a 89%, dependendo da região geográfica. Em 2010, Rossini e colaboradores observaram que o perfil mutacional do gene *TP53* de tumores do sudeste brasileiro é semelhante ao encontrado no sul da França e o perfil de mutações em tumores da região sul do Brasil é comparável ao observado em tumores de indivíduos chineses. Os principais fatores etiológicos para a carcinogênese esofágica no sudeste brasileiro é o etilismo e o tabagismo, semelhante a região da Normandia da França, enquanto que o sul do Brasil e a China apresentam a ingestão de bebidas quentes se apresenta como o principal fator etiológico relacionados a tumorigênese esofágica.

Além de mutações no gene *TP53*, alterações na expressão da esofagina (SPRR3) parecem estar associadas a eventos iniciais no processo de carcinogênese esofágica. A proteína SPRR3 é altamente expressa durante a diferenciação de queratinócitos epidermóides do epitélio esofágico e tem sido considerada um marcador de diferenciação deste tecido (Zhang *et al.*, 2008). Alterações na expressão gênica e proteica de SPRR3 tem sido observado na mucosa adjacente ao tumor, indicando que alterações na expressão de SPRR3 são eventos precoces na carcinogênese esofágica, entando associado ao fenomeno denominado campo de cancerização, proposto por Slaughter em 1953 (Simao *et al.*, 2011).

Por outro lado, a infecção pelo vírus HPV (vírus do papiloma humano), extremamente relacionada a tumores de colo de útero e de orofaringe, apresenta um valor tumorigênico ainda controverso para CEE (Costa *et al.*, 2013). A incerteza sobre a atividade do HPV na carcinogênese esofágica está relacionada a alguns fatores como baixo número de casos, variação na sensibilidade das técnicas de detecção do vírus, metodologias de processamento das amostras e organização e desenho dos estudos (Syrjänen, 2002). Entretanto, estudos recentes sugerem que o papel do HPV na carcinogênese esofágica é nulo ou baixo e além disso, diferentemente de tumores de orofaringe (D'Souza *et al.*, 2007), os pacientes de CEE com HPV positivos não apresentam um melhor prognóstico quando comparados com pacientes com tumores HPV negativos (Herbster *et al.*, 2012).

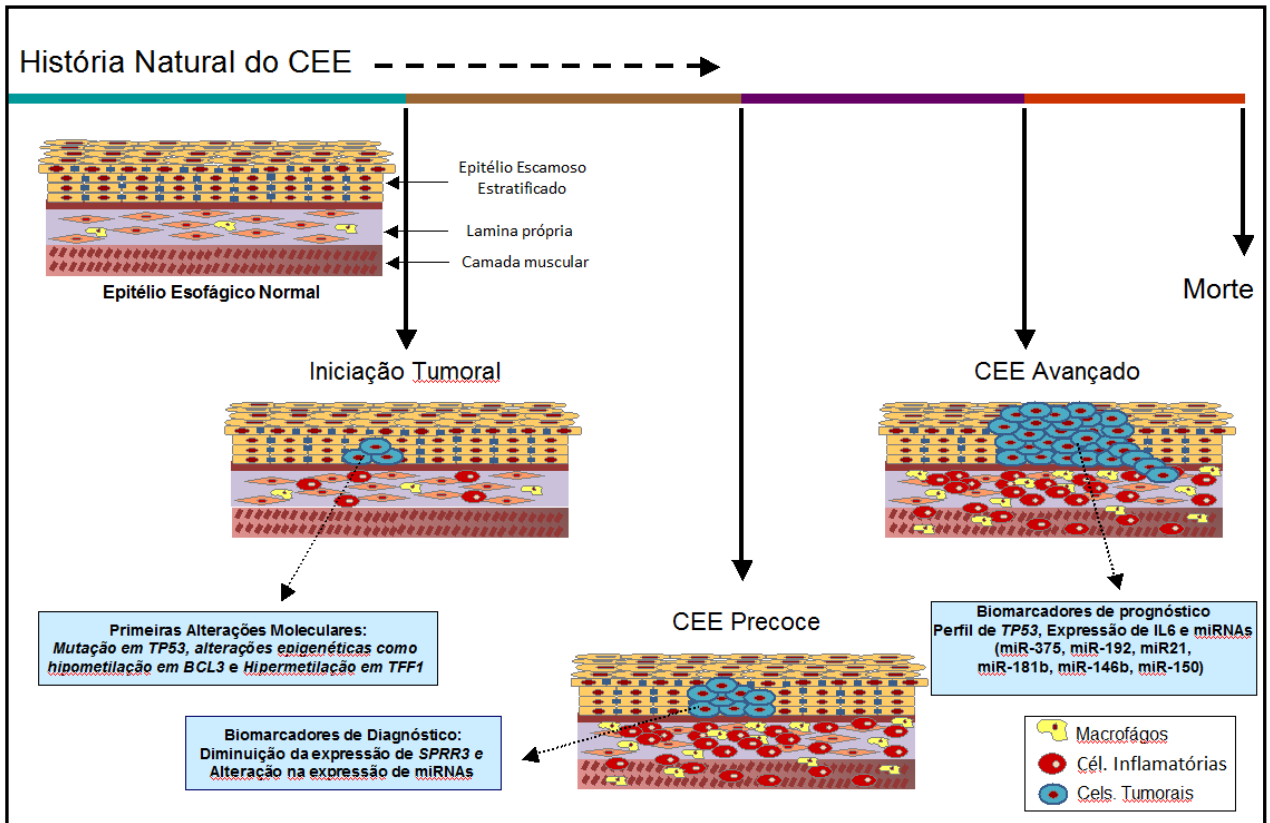
O avanço no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, em particular terapias direcionadas com base no conhecimento da biologia e da genética da doença que oferecem uma melhoria na resposta ao tratamento e da qualidade de vida para os pacientes oncológicos ainda se encontra distante dos pacientes de CEE. Medicamentos visando os

receptores humanos fator de crescimento epidérmico (HER), como o gefitinib usada para tratar câncer de pulmão de células não-pequenas, o cetuximab usado para tratar pacientes diagnosticados com câncer colorretal avançado, e, particularmente, trastuzumab usado para tratar pacientes com câncer de mama, têm mostrado uma melhora substancial na resposta do tumor, quando comparado com quimioterapia convencional. Entretanto, a superexpressão de EGFR e HER-2 bem como mutações nos genes *EGFR*, *KRAS* e *BRAF* são eventos raros em CEE. Assim, a maioria dos pacientes de CEE não apresentam o perfil molecular necessário para serem beneficiados com a terapia-alvo anti-HER (Gonzaga *et al*, 2012).

Somado às alterações genéticas, modificações epigenéticas também tem sido descritos como importantes contribuintes durante o desenvolvimento de CEE. Especificamente, alterações epigenéticas parecem ocorrer precocemente durante este processo e, portanto, surgiram como potenciais biomarcadores de diagnóstico deste tumor. Um exemplo disso é a presença de alterações no perfil de metilação dos genes *BCI3* e *TFF1*, tanto no tumor quanto no tecido circundante normal adjacente sem mutação no gene *TP53*, evidenciando que alterações epigenéticas pode ocorrer mesmo antes das supostas primeiras alterações genéticas (Lima *et al*, 2011).

Além de alterações no perfil de metilação, alterações no perfil de expressão de microRNAs (miRNAs) estão sendo descritas como eventos relacionados a carcinogênese esofágica (Costa *et al*, 2013). Já foi observado que os miRNAs miR-338-3p, miR-218 e miR-139-5p apresentam expressão suprimida no tumor em relação ao tecido adjacente não tumoral enquanto que os miRNAs miR-183, miR-574-5p, miR-21 e miR-601 apresentam superexpressão no tumor (Yang *et al*, 2013). Portanto, a expressão diferencial de miRNAs em CEE pode ser associada com a incidência e desenvolvimento de CEE e até mesmo com exposição aos fatores de risco associados, apresentando valor prognóstico em CEE (Li *et al*, 2013; Zhao *et al*, 2013).

Figura 6 - Representação da associação entre as alterações moleculares associadas a carcinóese esofágica e a história natural da doença. Alterações genéticas e epigenéticas já foram descritas em lesões pré-neoplásicas no epitélio estratificado do esôfago. Alguns biomarcadores de diagnóstico precoce e de diagnóstico também já foram descritos, entretanto poucos trabalhos de larga escala foram realizados, havendo a necessidade de maiores estudos para elucidar a carcinogênese neste tecido e melhorar o prognóstico dos paciente.



Fonte: Costa *et al*, 2013.

Apesar da alta incidência de CEE no mundo, dentre os 10 tipos de tumor mais incidentes o CEE   aquele com o menor número de publica es científicas em periódicos indexados. Assim, mesmo com todo o avanço nas diversas áreas da medicina e da pesquisa, a compreensão das altera es moleculares envolvidas na gênese do CE, assim como biomarcadores de diagnóstico precoce ou de prognóstico está distante de ser estabelecida. Algumas ferramentas de análises moleculares de nova gera o como a análise do perfil de transcri o através de microarranjo de cDNA podem ser fundamentais para aprimorar os conhecimentos sobre a carcinogênese esofágica, com a identifica o de possíveis biomarcadores de detec o precoce dos tumores e genes candidatos para terapia-alvo.

Microarranjo de DNA e Câncer

A tecnologia de microarranjo de DNA é um instrumento revolucionário para o rastreamento simultâneo de milhares de genes a fim de identificar possíveis expressões genéticas diferenciais entre diferentes condições. Sob a premissa de que alguns genes seriam diferencialmente expressos como uma consequência direta de um processo de uma determinada doença, o monitoramento de padrões de expressão gênica fornece dados extremamente valiosos para a compreensão dos processos biológicos e celulares subjacentes a uma doença, podendo ter utilização até na identificação de alvos de novas drogas (Amaratunga *et al*, 2007).

O microarranjo de DNA e o sequenciamento de nova geração (NGS) são atualmente as duas técnicas mais importantes para análises genômicas em larga escala. Nos últimos 20 anos, a tecnologia de microarranjo de DNA tem evoluído e encontra-se bem estabelecida (Alminana e Fazeli, 2012).

A técnica de microarranjo de DNA baseia-se na capacidade do DNA localizar e ligar-se espontaneamente a uma sequência de bases complementares (sondas), de uma forma altamente específica, rápida e reversível (Sassolas *et al*, 2008). Os dados oriundos da análise de microarranjo de DNA devem ser depositados em repositórios públicos, como o *Gene Expression Omnibus* (GEO) (Barrett *et al*, 2013). Ao longo dos anos esta tecnologia tem sido aplicada na análise do genoma em diferentes áreas da pesquisa em saúde, permitindo realizar associações entre alterações no perfil de expressão gênica e patologias específicas (Mello-Coelho e Hess, 2005; Beltrami *et al*, 2007; Paratore *et al*, 2012). Embora as informações coletadas possam ser relevantes do ponto de vista médico, eles não são facilmente acessíveis na rotina clínica. Até o momento, poucos estudos translacionais foram realizados com esta técnica. O principal motivo está relacionado com a complexidade desta tecnologia, que é adequada para pesquisa mas não para os diagnósticos de rotina (Guarnaccia *et al*, 2014).

Os principais benefícios da tecnologia microarranjo de DNA são a análise de alto rendimento, a miniaturização e a segurança (Timlin, 2006). A análise de alto rendimento permite paralelismo através de uma comparação direta entre milhares de sondas alvo hibridadas em um *chip* e com os alvos complementares. Esta vantagem foi atingida através da miniaturização da superfície da matriz, conduzindo também a uma melhoria significativa em termos de diminuição do volume de reação, o aumento da concentração da amostra e de aceleração da cinética de hibridação. O aumento da segurança deriva da utilização de métodos

de marcação com fluorocromos, que evitam o manuseamento por parte do operador de compostos radioativos ou tóxicos durante o processo experimental (Held *et al*, 2006).

O câncer é uma doença altamente complexa, que pode abranger várias alterações genômicas, incluindo mutações pontuais, translocações, ampliações de genes, modificações epigenéticas, *splicing* aberrantes e alterações no padrão de expressão gênica. Estas alterações podem ser herdadas ou adquiridas somaticamente durante a progressão de uma célula normal a uma célula cancerosa. Durante a última década cada vez mais resultados de pesquisa têm determinado como estas perturbações genômicas podem conduzir a sobrevivência de células tumorais, alterando mecanismos de controle do ciclo celular, reparo do DNA, diferenciação celular, fuga da apoptose, vascularização do tumor e do metabolismo tumoral. Ao melhorar a compreensão destes mecanismos moleculares obtem-se uma maior compreensão sobre a iniciação da carcinogênese, sua progressão e sua sensibilidade à terapêutica (Garraway *et al*, 2005).

O tratamento do câncer de mama foi potencializado com os avanços na classificação dos tumores proporcionados por microarranjo de DNA. Esta ferramenta foi fundamental para quebrar os paradigmas de diagnóstico e estabelecer uma assinatura molecular de expressão gênica. A classificação do câncer da mama com base no perfil de expressão gênica capta a complexidade molecular destes tumores. Por esta razão, os padrões que distinguem os subtipos parecem oferecer uma estratificação mais refinada dos pacientes em comparação com marcadores tumorais individuais, como receptor de estrogênio e de progesterona. Estes estudos contribuíram no conhecimento do perfil de transcrição gênica nas células dos tumores de mama, na compreensão das alterações genéticas presentes nestas neoplasias e em última análise, na evolução da doença e tratamento do paciente (Perou *et al*, 2000; Sorlie *et al*, 2003).

Observamos a importância da técnica de microarranjo fazendo uma rápida pesquisa dos trabalhos publicados no site pubmed.gov utilizando palavras-chave relacionadas a “pesquisa em câncer” (Quadro 1). Mais de 14 mil trabalhos foram publicados até a redação desta tese relacionando a análise de expressão gênica por microarranjo (microarranjo de DNA) e câncer, evidenciando com isso que esta metodologia é de grande relevância.

Quadro 1 - Pesquisa de números trabalhos em câncer relacionados à tecnologia de microarranjo de DNA

Palavras-chave	Número de trabalhos publicados (PUBMED)
<i>Microarray</i>	60014
<i>Gene expression microarray</i>	41825
<i>Gene expression microarray cancer</i>	14287
<i>Gene expression microarray breast cancer</i>	2496
<i>Gene expression microarray lung cancer</i>	1250
<i>Gene expression microarray colorectal cancer</i>	1030
<i>Gene expression microarray esophageal cancer</i>	252
<i>Gene expression microarray esophageal squamous cell carcinoma</i>	35

Fonte: pubmed.gov

Entretanto, enquanto que para algumas neoplasias existem mais de 1.000 trabalhos publicados utilizando a técnica de microarranjo de DNA, o CEE tem somente 35 trabalhos publicados desde o advento da técnica, sendo 26 realizados na China e Japão e nenhum feito na América do Sul (Quadro 2). Este fato evidencia a necessidade de aumentar a implementação de metodologias de larga escala na pesquisa de CEE, uma vez que esta doença apresenta uma alta letalidade.

Quadro 2 - Estratificação dos trabalhos publicados correlacionando microarranjo de DNA e CEE pela nacionalidade dos pacientes estudados

Nacionalidade dos pacientes analisados nos trabalhos	Número de trabalhos
Japão	16
China	10
Alemanha	1
Australia	1
Estados Unidos	1
Índia	1
Irã	1
Singapura	1
Taiwan	1

Biomarcadores no diagnóstico e tratamento câncer

A prática clínica tem observado que pacientes com as mesmas características clinico-patológicas apresentam perfis de resposta distintos ao tratamento oncológico. Essa observação pode ser melhor explicada com as novas tecnologias de pesquisas moleculares que permitem nos aprofundar nos eventos genômicos e moleculares que sustentam a carcinogênese, tendo assim uma oportunidade de entender melhor a resposta, melhorando o uso das terapias atuais e fomentar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Willyard *et al.*, 2013).

Um melhor conhecimento da patologia molecular do câncer permite aprofundar os conhecimentos acerca da complexidade e diversidade que definem o câncer como um conjunto de múltiplas doenças. Iniciativas em pesquisa em larga escala, através de consórcios, para mapear as alterações moleculares, como a *Internacional Cancer Genome Consortium* (ICGC), *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e outros projetos estão focados em revelar a grande heterogeneidade intertumoral e intratumoral, mesmo em tumores que são morfológicamente indistinguíveis. Munido deste conhecimento novo, talvez não seja surpreendente que se descubra uma variabilidade substancial na capacidade de resposta terapêutica entre os pacientes portadores de um mesmo tipo de tumor. Esta nova gama de

conhecimento coloca desafios consideráveis, mas apresenta oportunidades para o avanço na terapia oncológica (Kim *et al.*, 2014).

Apesar de menos de 10% dos tumores serem originados de alterações herdadas via herança mendeliana, a capacidade das células malignas para proliferar e formar metástases pode e deve ser atribuída em grande parte a alterações genéticas somáticas. Essas alterações normalmente levam à ativação de proto-oncogenes, inativação de genes supressores de tumor e / ou inativação dos mecanismos de reparo do DNA. Embora esse paradigma genético geralmente seja verdadeiro, ele não leva em conta a complexidade molecular do câncer. Uma melhor apreciação da complexidade molecular tumoral vem sendo descoberta com os recentes avanços em tecnologias de alta rendimento, que tem proporcionado a descoberta de um número maior de genes candidatos a biomarcadores, com valor projetado para avaliação de risco, rastreamento, diagnóstico, prognóstico e seleção e monitoramento das terapias (Negm, *et al.*, 2002).

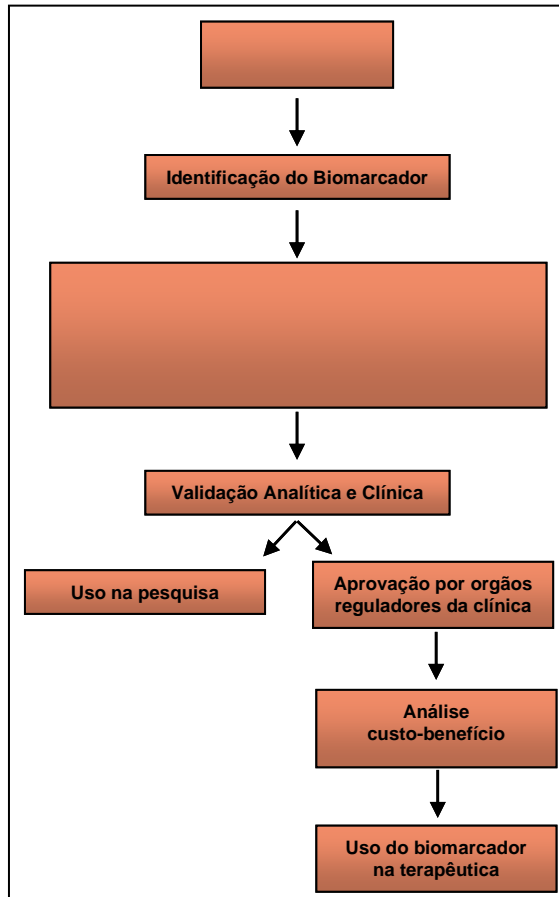
Avanços nas análises gênicas de alto rendimento têm sido desenvolvidos para avaliar a expressão de RNAm de forma global. Entre as principais empresas estão Affymetrix e NimbleGen, produtoras de matrizes capazes de realizar análises globais de perfil de expressão de uma amostra (Mischel *et al.*, 2004). Como dito anteriormente, a classificação do câncer de mama baseada em padrões de expressão gênica identificou subtipos moleculares previamente desconhecidas que estão associados com a sobrevivência dos pacientes e prognóstico (Perou *et al.*, 2000; Sorlie *et al.*, 2003). Os níveis de expressão gênica de enzimas-chave para o metabolismo de drogas têm sido usados antes do início do tratamento para prever a resposta à quimioterapia em câncer de pulmão (Rosell *et al.*, 2004) e colon (Salonga, *et al.* 2000). Abordagens similares têm levado a novas descobertas para outros tumores, incluindo melanoma, leucemias, linfomas, câncer de próstata e outros (Ludwig e Weinstein, 2005).

A validação de um biomarcador é um processo longo e complexo. Independentemente do seu uso pretendido, essas moléculas devem passar por uma série de testes para que possam ser consideradas na clínica. Para isso, foram propostas cinco fases conceituais de desenvolvimento de biomarcadores (Figura 7): exploratória pré-clínica (I), ensaio clínico e validação (II), retrospectiva longitudinal (III), o rastreamento prospectivo (IV) e controle do câncer (V) (Pepe, *et al.* 2001).

Idealmente, os biomarcadores devem ser validados de forma análoga em estudos prospectivos, bem controlados em grupos de pacientes de diferentes instituições, com padrões bem estabelecidos para todas as etapas do processo. Essas medidas incluem, por exemplo, a coleta de tecido, a purificação do RNA, a amplificação (se necessário), hibridação, a captura

de dados, normalização dos resultados e análise estatística. Além disso, deve haver reprodutibilidade dentro e entre laboratórios (Hammond e Taube, 2002).

Figura 7 - Cronologia do desenvolvimento de um biomarcador. Após a identificação de candidatos a biomarcadores, estas moléculas ou alterações devem passar por diversos processos de validação antes de serem empregados na rotina clínica.



Fonte: adaptado de Ludwig & Weinstein, 2005.

Assim, a identificação de biomarcadores de diagnóstico e predição de tratamento e uma caracterização molecular do perfil de expressão gênica do CEE se mostra fundamental para a compreensão desta doença, uma vez que ela apresenta um prognóstico muito ruim e pouco se sabe sobre a gênese deste tumor, mesmo ele sendo um dos tumores mais incidentes e fatais no mundo.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo Geral.

Avaliar o perfil de expressão gênica global em carcinomas epidermóides de esôfago e identificar genes diferencialmente expressos com potencial biomarcador de diagnóstico ou prognóstico e aumentar o conhecimento acerca da biologia deste tumor.

1.2. Objetivos Específicos.

- Determinar o perfil de expressão gênica global em CEE, selecionando os genes diferencialmente expressos através da técnica de microarranjo de DNA, comparando tecido tumoral, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável;
- Realizar o enriquecimento dos genes diferencialmente expressos na plataforma *Gene Ontology* no intuito de identificar os processos biológicos alterados em CEE;
- Validar o resultado do microarranjo de DNA através de PCR em tempo real;
- Avaliar os dados clínicos e patológicos dos pacientes e correlacionar os dados com a sobrevida dos pacientes;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da expressão dos genes diferencialmente expressos selecionados em discriminar alterações no epitélio esofágico através de curva ROC
- Avaliação da relação da expressão gênica de genes diferencialmente expressos selecionados com a sobrevida dos pacientes com CEE;
- Realizar ensaios funcionais alterando o perfil de expressão de *FOXMI* em linhagem de CEE, verificando níveis de viabilidade celular, proliferação, apoptose e morte celular e fases do ciclo celular

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras e dos dados clínico-patológicos dos pacientes

O presente estudo teve como base uma coorte prospectiva composta de 43 pacientes portadores de CEE primário. Foram considerados os seguintes critérios para a inclusão dos pacientes no estudo:

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

Além dos procedimentos vinculados ao BNT-INCA, o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob o número 116/11 (ANEXO A).

Foram coletadas biópsias de CEE e do tecido adjacente ao tumor de cada paciente incluído no trabalho. Além das biópsias para o estudo, foram coletadas biópsias para análise histopatológicas para confirmação da histologia do material coletado. As biópsias foram preservadas em solução de RNAlater (Ambion), à -80°C, seguindo orientações do fabricante. Os dados clínicos e patológicos de cada paciente estão listados na Quadro 3.

Também foram coletadas biópsias de esôfago de 08 pacientes sem qualquer alteração nesse tecido e sem histórico de câncer. Esses pacientes foram recrutados no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto - HUPE/UERJ, com o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob o número 416 - CEP/HUPE (ANEXO B).

Quadro 3 - Dados clínico e patológicos das amostras de CEE

Nº	Data de matrícula INCA	Sexo	Idade (anos)	Óbito	Data do Óbito	Última Consulta	Sobrevida	Subsítio	Diferenciação	T	N	M	Estadio Tumor
1	23/06/2006	M	56	S	23/04/2008	N/A	22.3	NA	moderadamente	3	0	0	2
2	03/11/2006	F	62	S	11/05/2008	N/A	18.5	C15.4	pouco	3	1	1	4
3	16/01/2007	F	61	S	13/03/2007	N/A	1.9	C15.4	pouco	2	0	0	2
4	09/03/2007	M	66	s	29/05/2010	N/A	39.2	C15.4	moderadamente	4	0	0	2
5	30/03/2007	M	49	s	21/06/2007	N/A	2.8	C15.4	moderadamente	3	1	1	4
6	18/01/2008	M	73	S	23/06/2011	N/A	41.7	C15.3	moderadamente	4	0	0	3
7	10/03/2008	F	79	S	31/01/2009	N/A	10.9	C15.4	Bem	3	0	0	2a
8	13/03/2008	M	59	S	25/09/2009	N/A	18.7	C15.4	moderadamente	3	1	0	3
9	14/04/2008	F	56	s	10/09/2009	N/A	17.1	C15.5	moderadamente	3	1	0	3
10	18/07/2008	F	53	S	05/08/2009	01/08/2009	12.8	C15.3	moderadamente	3	0	0	2a
11	10/09/2008	M	67	n	NA	01/04/2014	67.6	C15.4	moderadamente	1	0	X	1
12	29/09/2008	M	46	S	05/02/2012	N/A	40.8	C15.4	pouco	3	1	0	3
13	10/12/2008	F	61	S	06/04/2012	N/A	40.4	C15.4	moderadamente	1	1	0	2b
14	03/03/2009	M	69	s	09/09/2009	N/A	6.3	C15.5	moderadamente	3	1	0	3
15	10/06/2011	M	49	s	28/08/2012	N/A	14.8	NA	moderadamente	4	0	0	3
16	16/09/2011	M	54	S	28/01/2012	N/A	4.5	C15.4	moderadamente	2	0	0	2
17	10/10/2011	M	73	S	24/12/2011	N/A	2.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	NA
18	31/08/2012	M	56	N	N/A	30/04/2014	20.2	C15.5	moderadamente	1	0	0	1a
19	06/09/2012	M	70	N	N/A	09/02/2013	5.2	C15.4-C15.5	pouco	4	1	0	3
20	27/08/2012	M	66	S	06/04/2013	N/A	7.4	C15.4	moderadamente	3	0	0	2
21	03/09/2012	M	50	S	15/12/2013	N/A	15.6	C15.4	moderadamente	2	1	0	2b
22	18/09/2012	M	51	S	26/03/2013	N/A	6.3	C15.4	moderadamente	3	0	0	2a
23	20/09/2012	M	57	S	10/08/2013	N/A	10.8	C15.4	pouco	3	1	0	3
24	22/10/2012	M	59	S	08/11/2013	N/A	12.7	C15.3-C15.4	moderadamente	3	0	0	2a
25	13/12/2012	M	72	S	24/01/2013	N/A	1.4	C15.3	moderadamente	4	0	0	3
26	14/12/2012	M	62	n	NA	07/05/2014	17.0	C15.4-C15.5	pouco	4	0	0	3
27	04/03/2013	F	78	S	09/05/2013	N/A	2.2	C15.3	moderadamente	N/A	N/A	N/A	2
28	22/01/2013	M	64	S	04/05/2013	N/A	3.4	C15.0	moderadamente	N/A	N/A	N/A	4
29	14/01/2013	M	56	n	NA	02/05/2014	15.8	C15.4-C15.5	moderadamente	3	0	0	2a
30	14/02/2013	m	58	n	NA	28/04/2014	14.6	C15.4	moderadamente	1b	N/A	N/A	3
31	05/03/2013	F	67	N	NA	27/09/2013	6.9	C15.4	pouco	N/A	N/A	N/A	4
32	14/03/2013	F	58	S	14/10/2013	28/06/2013	7.1	C15.3	pouco	3	0	0	2
33	18/03/2013	M	62	S	16/06/2013	N/A	3.0	C15.0	pouco	N/A	N/A	N/A	4
34	12/03/2013	M	60	N	NA	29/08/2013	5.7	C15.5	moderadamente	3	1	0	3
35	17/04/2013	M	55	S	17/12/2013	N/A	8.1	C15.5	moderadamente	3	0	0	2
36	25/04/2013	F	49	S	13/08/2013	N/A	3.7	C15.0-C15.3	moderadamente	N/A	N/A	N/A	NA
37	17/04/2013	M	52	N	NA	03/12/2013	7.7	C15.4-C15.5	moderadamente	N/A	1	0	2
38	25/04/2013	M	73	S	16/01/2014	N/A	8.9	C15.4	pouco	N/A	N/A	N/A	3
39	10/05/2013	F	58	S	16/07/2013	N/A	2.2	C15.3	moderadamente	3	0	0	2
40	19/04/2013	M	48	N	NA	10/04/2014	11.9	C15.5	moderadamente	3	N/A	N/A	4
41	22/04/2013	M	60	N	NA	06/06/2014	13.7	C15.3-C15.4	moderadamente	1B	N/A	N/A	2
42	11/06/2013	M	75	N	NA	29/04/2014	10.7	C15.3-C15.4	moderadamente	3	0	0	2
43	04/06/2013	M	59	S	23/06/2013	N/A	0.6	C15.0-C15.3-C15.4	moderadamente	4	N/A	N/A	3

2.2. Extração de RNA e determinação da integridade

2.2.1. Extração de RNA

As amostras de CEE e tecido adjacente coletadas foram processadas no laboratório do BNT-INCA, como determina o regimento da instituição. Para a extração do RNA total, foi utilizado o RNeasy Mini kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante:

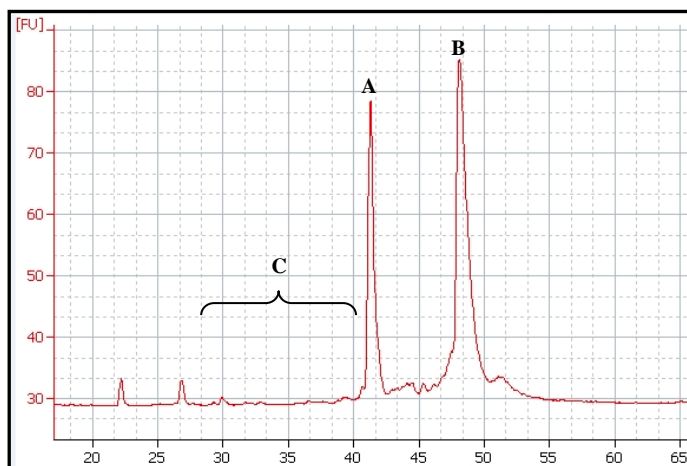
- Um fragmento da biópsia de até 30 mg foi colocado em um microtubo de 1,5 mL junto com 200 μ L do tampão RLT com beta-mercaptoetanol. Após macerar o tecido, com auxílio de um pilão, foram adicionados mais 400 μ L do tampão RLT e posteriormente foram centrifugados em microcentrífuga por 3 min à velocidade de 12.000 x g para sedimentar o material não lisado. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 volume de etanol 70% foi adicionado. Após homogeneização, 700 μ L 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 μ L do tampão RW1 foram adicionados na coluna de purificação e centrifugados por 15 s a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e 500 μ L do tampão RPE foram adicionados a 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 μ L de água foram adicionados no centro da membrana sem encostar a ponteira na mesma a fim de eluir o RNA total. Após 1 minuto a 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.

2.2.2. Quantificação e Determinação da Integridade do RNA

A concentração de RNA nas amostras foi determinada a partir de 1,0 μL de RNA extraído das amostras, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience) com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm. O cálculo da concentração do RNA tomou por base a informação de que uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de RNA.

Para determinarmos a integridade do RNA extraído, utilizamos o equipamento Bioanalyzer (Agilent), com o chip RNA 6000 Nano, seguindo o protocolo do fabricante. Como resultado, o Bioanalyzer fornece um número de integridade do RNA (RIN) e amostras com RIN inferior a 8 foram descartadas. A integridade do RNA foi determinada pela razão entre os rRNAs 18S e 28S e a presença de material degradado, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 - Eletroferograma representando o padrão de RNA encontrado na amostra de tumor 05 analisada no equipamento Bioanalyzer



Legenda: A: pico representando o rRNA 18S; B: pico representando o rRNA 28S; C: Área de análise de RNA degradado.

2.3. Microarranjo de DNA

Nesta etapa foram utilizados 15 RNAs extraídos de amostras coletadas de CEE e do tecido adjacente de cada paciente e 5 RNAs extraídos de amostras saudáveis do HUPE/UERJ. A preparação das amostras para a análise de microarranjo de DNA foi realizada com a utilização do WT Expression Kit (Ambion), conforme recomendação da Affymetrix, produtora dos chips para microarranjo utilizados nessa tese (Gene Chip Expression Analysis Technical Manual - Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

O RNA total de cada tumor e tecido adjacente foi convertido em cDNA dupla-fita utilizando o oligonucleotídeo iniciador T7-Oligo(dT)24 de sequência 5' – GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)24 – 3'. Para tanto, 3,0 µL contendo 100 ng de RNA foram adicionados em um microtubo contendo 2,0 µL do controle Poly-A e 5,0 µL do mix para síntese da primeira fita de cDNA. Os tubos contendo cada uma das reações foram incubados no termociclador Veriti (Applied Biosystems) com as seguintes condições:

$$\left\{ \begin{array}{l} - 1 \text{ hora à } 25^{\circ}\text{C}; \\ - 1 \text{ hora à } 42^{\circ}\text{C}; \\ - 2 \text{ min à } 4^{\circ}\text{C}. \end{array} \right.$$

Após este processo, os tubos foram colocados no gelo e a síntese da segunda fita de cDNA foi feita imediatamente em seguida, formando um cDNA dupla-fita. Após a adição de 50,0 µL do Second-Strand Mix em cada uma das reações, e os microtubos foram incubados no termociclador Veriti (Applied Biosystems) com as seguintes condições:

$$\left\{ \begin{array}{l} - 1 \text{ hora à } 16^{\circ}\text{C}; \\ - 10 \text{ min à } 65^{\circ}\text{C}; \\ - 2 \text{ min à } 4^{\circ}\text{C}. \end{array} \right.$$

Para a síntese do cRNA biotilado, o volume total do cDNA sintetizado (60,0 µL) foi utilizado em uma reação de transcrição in vitro, contendo 24,0 µL de tampão e 6,0 µL da

enzima para a transcrição *in vitro*. A reação foi realizada incubando a mistura por 16 horas a 40°C no termociclador Veriti (Applied Biosystems).

Após o final do processo, o cRNA foi purificado utilizando *beads* magnéticas (Nucleic Acid Binding Beads, Ambion®, Life Technologies™, USA), utilizando o seguinte protocolo:

- Em cada tubo contendo cRNA foram adicionados 50,0 µL do tampão das *beads* magnéticas e 10,0 µL das *beads* magnéticas, homogeneizando por pipetagem. Essa solução foi transferida para placa em U fornecida pelo kit e 60,0 µL de isopropanol (MERCK) foram adicionados em cada tubo, homogeneizando por pipetagem. Após agitação em placa por dois minutos a 400 rpm, a mesma foi retirada e colocada sobre uma placa magnética por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado sem perturbar as *beads*, que estão ligadas ao cRNA. Em seguida, as *beads* foram lavadas duas vezes com solução de lavagem de ácidos nucleicos fornecida pelo kit, utilizando o misturador de placas e a placa magnética como descrito anteriormente, retirando o sobrenadante no final. Posteriormente, o cRNA foi eluído adicionando 40,0 µL de solução de eluição, fornecida pelo kit, pré-aquecida por 10 min à 58°C. Em seguida a placa foi incubada por 2 min, com subsequente rotação vigorosa no misturador de placas por 3 min. A placa em U foi colocada em sobre a placa magnética e o sobrenadante contendo o cRNA purificado foi transferido para tubos de 0,5 mL. A solução foi armazenada em gelo e foi feita a nova síntese de cDNA.

Antes de proceder com a nova síntese de cDNA, a eficiência da reação foi verificada através de quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience) com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm. As reações foram consideradas eficientes quando a concentração de cRNA foi maior ou igual a 455 ng/µL.

O segundo ciclo de síntese de cDNA foi realizado com 10,0 µg de cRNA purificado e 2,0 µL de oligonucleotídeos randômicos com incubação de 5 min a 70°C, 5 min a 25°C e 2 min a 4°C. Um total de 16,0 µL do produto da reação foi adicionado a 8,0 µL de tampão e 8,0 µL de enzima, ambos fornecidos pelo kit, e posteriormente incubados por 10 min a 25°C, 90 min a 42°C, 10 min a 72°C e 2 min a 4°C. Para hidrolização, 2,0 µL de *RNaseH* foi adicionada à mistura, a qual foi submetida a incubação por 45 min a 37°C, 5 min a 95°C e 2 min a 4°C. O produto do segundo ciclo de cDNA foi então purificado utilizando *beads* magnéticas da mesma forma descrita anteriormente no item “Síntese e purificação de cRNA”, utilizando etanol (MERCK) no lugar do isopropanol, fornecendo um cDNA simples fita (ssDNA) que foi quantificado para avaliar a eficiência da reação no espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience) com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm.

As reações foram consideradas eficientes quando apresentaram concentração de ssDNA maior ou igual a 185,0 ng/ μ L.

2.3.1. Fragmentação e Hibridação no *Chip Human Exon 1.0 ST*

Para hibridação, 5,5 μ g de cRNA (em um volume de 10 μ L) de cada amostra foram fragmentados com 4,8 μ L de tampão de fragmentação 10X, 1,0 μ L da enzima *Uracil-DNA Glycosylase* (UDG), 1,0 μ L da enzima *Humanapurinic/ apyrimidinendonuclease* (APE) e água para completar o volume final de 48,0 μ L. Essa mistura foi posteriormente incubada a 60 min a 37°C, 2 min a 95°C e 2 min a 4°C. O tamanho dos fragmentos foi verificado por eletroforese em gel de agarose. Antes da fragmentação as bandas devem ser equivalentes a 0,5 kb e, após a fragmentação devem serequivalentes a fragmentos de 35 a 200 bases. A primeira marcação foi realizada com 45,0 μ L do produto da fragmentação e 12,0 μ L de tampão concentrado (5x) da *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT), 2,0 μ L de TdT e 1,0 μ L de *DNA labelling reagent*, incubada a 60 min a 37°C, 10 min a 70°C e 2 min a 4°C.

Para cada amostra de tecido tumoral ou adjacente ao tumor será utilizado um chip de microarranjo *Human Exon 1.0 ST* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). As sondas dos *arrays* são produzidas utilizando tecnologias que combinam fotolitografia e química combinatória, sendo que até 1,3 milhão de diferentes sondas de oligonucleotídeos são sintetizadas em cada *array*. Cada um desses oligonucleotídeos está localizado em uma área específica do *array* chamada de *probecell* e cada uma delas pode conter milhares até milhões de cópias de um determinado oligonucleotídeo. Os *arrays* foram previamente equilibrados a temperatura ambiente. Uma mistura de reação para cada amostra foi preparada, tomando-se o cuidado de aquecer previamente a solução estoque de controles de hibridação eucarióticos 20X a 65°C por 5 minutos para a completa ressuspensão do ssDNA. A mistura de reação é composta por água ultrapura em quantidade suficiente para 100,0 μ L, 27,0 μ L da reação ssDNA fragmentada, 1,7 μ L de oligonucleotídeo B2 Controle (Affymetrix), 5,0 μ L de controles de hibridação eucarióticos 20X (bioB, bioC, bioD, cre) (Affymetrix), 50,0 μ L de tampão de hibridação 2X e 7,0 μ L de DMSO. Essa mistura foi aquecida a 99°C por 5 min e logo em seguida resfriada a 45°C por 5 min. Os microtubos contendo as misturas de reação foram centrifugados por 5 min na velocidade de 12.000 x g para remover qualquer material

insolúvel. A solução tampão foi removida dos cartuchos e substituída pela mistura de reação clarificada. Os *arrays* foram acondicionados em caixas *rotisserie* em forno de hibridação a 45°C e hibridados por 17 horas com rotação de 60 rpm. Todo o processo de lavagem e coloração foram feitos na estação fluídica *GeneChip® Fluidics Station 450* de acordo com a seguinte programação: 10 ciclos de 2 mixes/ciclo com tampão A a 30°C, 6 ciclos de 15 mixes/ciclo com tampão B a 50°C, tampão SAPE por 5 min a 35°C, 10 ciclos de 4 mixes/ciclo com tampão A a 30°C, solução de anticorpo por 5 min a 35°C, tampão SAPE por 5 min a 35°C e 15 ciclos de 4 mixes/ciclo com tampão A a 35°C.

2.3.2. Leitura dos Chips e aquisição dos valores de expressão

Para a leitura óptica dos chips *Human Exon 1.0 ST* os arranjos de sonda foram lidos em scanner *GeneArray® Scanner 7G* (Affymetrix), equipado com laser de íon argônio, programado segundo as instruções do fabricante, atribuindo-se 3 µm para o valor de pixel e comprimento de onda de 570 nm. A captura das imagens e análise inicial das hibridações foram feitas com o *software Affymetrix® Expression Console™* e os arquivos gerados foram salvos em formato *.cel.

2.3.3. Determinação de genes diferencialmente expressos

Os dados obtidos na aquisição dos sinais de fluorescência presentes nos arquivos *.cel foram normalizados e sumarizados utilizando o *software Expression Console* (Affymetrix). Para tanto foi utilizado o algoritmo RMA (*Robust Multi-array Average*), que gerou uma matriz formada pelas sondas nas linhas e amostras nas colunas. Após a normalização e sumarização, os dados foram analisados no *software R / Bioconductor(Development core team, 2004)*, utilizando os pacote *Limma*. O *Limma* foi desenvolvido para análises de expressão diferencial gênica de dados oriundos de experimentos de microarranjo de DNA (Wettenhal e Smyth, 2004).

Uma análise de componente principal foi realizada utilizando todos os dados presentes no RMA, visando observar como a variância na expressão de todas as sondas impactaria no agrupamento das amostras. Para tanto foi utilizado o pacote "*pcaMethods*".

Após a adequação no modelo linear os genes foram classificados como diferencialmente expressos aplicando-se os seguintes critérios: valor de p ajustado menor que 0,05, odds probability maior que 95% e \log_2 *Fold Change* absoluto maior ou igual a 1.

Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico bayesiano das amostras nas duas dimensões (Heller e Ghahramani, 2003), havendo a formação de grupos gênicos. Cada grupo gênico formado foi enriquecido utilizando as plataformas *GeneOntology* (GO) (*The Gene Ontology Consortium*, 2000) e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa et al., 2004)

2.4. Validação do resultado do microarray de DNA por PCR em tempo real

2.4.1. Síntese cDNA - Reação da Transcriptase Reversa

O RNA total extraído dos tumores foi reversamente transcrito em cDNA para análises de PCR em tempo real utilizando a transcriptase reversa *SuperScript II*® (Invitrogen), conforme descrito abaixo:

- Em um microtubo foram adicionados 250 ng de *primer* randômico (Promega), 500 ng de RNA alvo, 1µL do set de dNTPs a 10mM e água RNase *FREE* suficiente para completar o volume final de 20 µL de reação, aquecer por 5 minutos à 65°C. Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão da enzima transcriptase reversa (5X) fornecido pelo fabricante (Invitrogen) e 2 µL de DTT 0,1M, incubar por 2 min à 25°C. Em seguida, foi adicionado 1 µL de *SuperScript II*® contendo 200 U e as reações foram incubadas no termociclador por 10 min à 25°C, 50 min à 42°C e inativar a enzima a 70°C por 15 min. Após a síntese, o cDNA foi armazenado à -20°C

2.4.2. PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas na plataforma Rotor-gene (Qiagen). Em cada reação foi adicionado 7,5 µL de tampão *SYBR green* FAST 2x (Qiagen), 0,3 µL de cada um dos oligonucleotídeos específicos da reação à 10 µM, 1,0 µL de cDNA diluídos 1:20 e 5,5 µL de água deionizada autoclavada. As reações ocorreram com a seguinte ciclagem:

- 1ª etapa: 1 X 95°C por 5 min
- 2ª etapa: 40X 95°C por 5 seg
60°C por 10 seg com posterior captura de fluorescência.

Para a quantificação dos resultados e determinação da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada gene foi estabelecido uma curva padrão de expressão utilizando uma diluição seriada de cDNA de um controle positivo da reação.

Após a amplificação dos produtos foi feita a análise da curva de dissociação (curva de *Melt*). Essa etapa é importante para verificar se os produtos observados na PCRq são específicos e para verificar se há formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos e contaminação na reação

A quantificação relativa de cada gene contra o controle interno, *GAPDH* e *GUSB1*, foi possível pelo método de ΔCq . 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 houve 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. Foi determinado, então, um limiar de detecção de fluorescência fixo acima da linha de base durante a fase exponencial da PCR. O parâmetro Cq (limiar) foi definido como o número de ciclos, inteiro ou não, no qual a fluorescência ultrapassou os limiares previamente fixados. A diferença entre as médias (de três experimentos) do gene de interesse e dos genes de referencia, *GAPDH* e *GUSB1*, foi calculada pelo programa Microsoft Excel e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta Cq}$. (Livak e Schmittgen, 2001).

As sequencias dos oligonucleotídeos iniciadores da reação de PCR estão descritas na Quadro 4.

Quadro 4 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores das reações de qPCR

Gene	Sentido	Sequência (5' - 3')
<i>FOXM1</i>	Senso	AACCTTTCCCTGCACGACAT
	Anti-senso	GGTCCAGTGGCTTAAACACC
<i>PLK1</i>	Senso	AGTACGGCCTTGGGTATCAG
	Anti-senso	GTGCCGTCACGCTCTATGTA
<i>AKT3</i>	Senso	GCAAAGGATGAAGTGGCACA
	Anti-senso	AAAACAGCTCGCCCCCATTA
<i>PI3KR3</i>	Senso	TATATCTCCTGGCGACCTGC
	Anti-senso	GCTTTGGTGGGAAGAGCTGGA
<i>CDK1</i>	Senso	AAACTGCTCGCACTTGGCTT
	Anti-senso	GGTATGGTAGATCCCGGCTTAT
<i>STAT3</i>	Senso	AGAAACAGTTGGGACCCCTG
	Anti-senso	GCTCCATTGGGAAGCTGTCA
<i>MMP9</i>	Senso	GCGCTGGGCTTAGATCATTC
	Anti-senso	G TTCAGGGCGAGGACCATAG
<i>MMP12</i>	Senso	GACTACACATTCAGGAGGCACA
	Anti-senso	TGCCACGTATGTCATCAGCA
<i>CCNB1</i>	Senso	GTAATGTTGTAGAGTTGGTGTCC
	Anti-senso	CATGGTGCACCTTTCCTCCTT
<i>ETV5</i>	Senso	ACTGGAAGGCAAAGTCAAACA
	Anti-senso	GCTGGGTCATCAAGAAGGGTGA
<i>FSCN1</i>	Senso	GCCTCCAGCAAGAATGCCAG
	Anti-senso	ATGATGGGGCGGTTGATGAG
<i>HOXD10</i>	Senso	CAGGAGAAGGAAAGCAAAGAGGA
	Anti-senso	CCAGCGTTTGGTGCTTAGTG
<i>GUSB1</i>	Senso	TCGATGACATCACCGTCACC
	Anti-senso	GTCCCATTCGCCACGACTTT
<i>GAPDH</i>	Senso	CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA
	Anti-senso	AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT

2.5. Análises Estatísticas

A análise de diferença de expressão entre os grupos de amostra analisados foi realizada no *software GraphPad Prism 5.0*. Para tanto, foi realizado um teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os valores de expressão gênica das amostras de cada grupo são paramétricos, isto é, apresentaram uma distribuição normal. Em seguida, na análise de diferença de expressão entre amostras de tumores e de tecidos adjacentes pareados com valores paramétricos, foi aplicado o teste t para amostras pareadas. Se os grupos fossem não paramétricos foi utilizado o *Wilcoxon matched pairs test*. Já na análise de diferença de expressão entre amostras não pareadas utilizou-se teste t não pareado quando os grupos foram paramétricos ou o teste de Mann-Whitney para grupos não paramétricos.

As correlações entre a expressão dos genes nas diferentes amostras foram realizadas utilizando o teste de correlação de Pearson, quando os dados se apresentaram paramétricos ou correlação de Spearman, quando os dados não foram paramétricos. A análise de correlação da sobrevida dos pacientes com os valores de expressão dos genes selecionados foi realizada utilizando a curva de Kaplan-Meier. Para todas as análises utilizou-se $p < 0,05$ como critério para determinar valores significativos.

2.6. Ensaios funcionais com linhagem celular de CEE

2.6.1. Linhagem celular

Neste estudo foi utilizada a linhagem de células provenientes de carcinoma epidermóide de esôfago, TE-1. A linhagem celular TE-1 é derivada de carcinoma epidermóide de esôfago e apresenta uma mutação termo-sensível em *TP53*, representada pela troca de uma valina para uma metionina no códon 272 do gene (V272M) (Barnas *et al.*, 1997). As características da linhagem TE1 estão listadas na Quadro 5.

A linhagem celular foi periodicamente testada com MycoAlert[®] Mycoplasma Detection Kit (Cambrex Bio Science, EUA) para a certificação de ausência de infecção

por micoplasma. Foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% do coquetel de penicilina/glutamina/estreptomicina (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, EUA), e foi mantida em estufa à 37°C sob 10% de CO₂.

Quadro 5 - Características da linhagem TE1 e capacidade de tumorigenicidade em camundongos

	Indivíduo		Tumor			Origem	Tumorigenicidade em camundongos
	Idade	Sexo	Histologia	Estágio	Diferenciação		
TE-1	58	M	CEE	II	Bem	Lesão primária	+

2.6.2. Inibição da Expressão Gênica de *FOXM1* pelo uso de RNA de Interferência (siRNA)

A expressão gênica de *FOXM1* foi inibida na linhagem celular TE-1 pelo uso de siRNA, seguindo as etapas descritas abaixo:

- As células foram cultivadas de 2 X 10⁵ células TE-1 / mL / poço em placas 06-poços à 37°C, por 24 horas;

- A incubação das linhagens foi realizada com um mix contendo água nas amostras controle, siRNA controle (SCR) ou anti-*FOXM1* nas amostras por 24 horas. O Mix foi constituído de 93 mL de meio OptiMEM (PAA), 1 mL de água destilada ou de siRNA controle 10 mM ou de siRNA anti-*FOXM1* 10 mM, 6 µL do reagente de transfecção lipofectamina LTX (Invitrogen) e 11 µL do reagente PLUS. Os siRNAs controle e anti-*FOXM1* foram comprados na empresa Santa Cruz.

- Troca do meio de cultura RPMI e adição de novo Mix, conforme descrito na etapa anterior e incubação com as amostras por mais 24 horas;

- As células das diferentes amostras foram coletadas com a utilização de tripsina (usando solução de 0,25% de tripsina, com EDTA, durante 5-10 min, à 37°C, 5% CO₂).

- centrifugação das células por 5 minutos à 1500 rpm;
- lavagem do precipitado obtido com PBS 1x gelado e transferência para um tubo eppendorf;
- centrifugação por 5 minutos à 1500 rpm;
- descarte do sobrenadante e armazenamento do precipitado em freezer -80°C para posterior extração de RNA e proteínas;

2.6.3. Transfecção do Vetor de Expressão de *FOXM1*

A super-expressão de FOXM1, na linhagem celular TE-1, foi realizada por transfecção de plasmídeo contendo vetor de expressão contendo o gene FOXM1 em concentrações crescentes (0,5; 1,0 e 2,0 µg), de acordo com o seguinte protocolo:

- cultivo de 3×10^5 células / 1mL / poço por 24 horas;

Preparação do Mix:

- 96 µL de meio OptiMEM + 6 µL do reagente transfectante Lipofectamina LTX (Invitrogen) deixados à temperatura ambiente por 5 minutos;
 - adição de 0,5; 1,0 ou 2,0 µg de vetor de expressão de FOXM1 (FOXM1-pcDNA3 – sequência codificante integral do FOXM1 clonada no vetor pcDNA3) nas amostras teste ou quantidade equivalente de vetor vazio (pcDNA3, Invitrogen – mesmo vetor não contendo a sequência codificante do FOXM1) nas amostras controle;
 - temperatura ambiente por 15 minutos;
- distribuição de 100 µL do respectivo Mix para cada amostra e incubação por 24 horas;
 - coleta das células das diferentes amostras, conforme descrito anteriormente.

2.6.4. Ensaio de proliferação celular

A taxa de proliferação celular após os tratamentos realizados foi medida pelo ensaio de cristal violeta, seguindo o protocolo descrito abaixo:

As células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 100% por 10 minutos e realizada a coloração com cristal violeta 0,05% (Vetec) por 10 minutos. A seguir, lavamos as células com água destilada após a incorporação do corante cristal violeta e incubamos com metanol por 5 minutos em uma placa agitadora. O sobrenadante foi coletado após a solubilização do corante pelo metanol e realizamos a leitura da absorbância utilizando espectrofotômetro leitor de ELISA (iMARK BIO-RAD) no comprimento de onda de 490 nm.

2.6.5. Avaliação do ciclo celular

A análise do perfil do ciclo celular das células utilizadas após os tratamentos efetuados foi realizada pela incorporação de iodeto de propídeo às células, seguindo o protocolo descrito abaixo:

- As células foram coletadas e contadas após o término dos tratamentos e reconstituídas na concentração de 1×10^5 células em 200 μ L da solução de iodeto de propídeo (PBS; Triton X-100 0,1%; Rnase 0,1% e iodeto de propídeo 50 μ g/mL – Sigma), seguida de incubação no gelo por 5 minutos; Após o tempo de incubação, o ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo (FACScalibur Becton Dickison) após a aquisição de 20.000 eventos. A excitação do fluorocromo foi realizada a partir de um laser de argônio com um comprimento de onda de 488 nm e a emissão coletada através de um filtro de 630/22 nm.

2.6.6. Ensaio de apoptose

Os níveis de apoptose das células após os tratamentos realizados foram avaliados pela marcação das mesmas com o anticorpo anti-anexina V, de acordo com as etapas descritas em seguida:

- As células foram coletadas e contadas após término dos tratamentos e ressuspensas na concentração de 1×10^5 células em 400 μL de tampão de ligação acrescido de 5 μL de anexina V FITC e 5 μL de iodeto de propídeo (Apoptosis Detection Kit II BD Biosciences) por 15 à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, a porcentagem de células positivas para anexina V foi avaliada por citometria de fluxo (FACScalibur Becton Dickison), após a aquisição de 20.000 eventos. A excitação do fluorocromo foi feita a partir de um laser de argônio com um comprimento de onda de 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro de 530/30 nm.

3. RESULTADOS

3.1. Dados clínicos e patológicos de pacientes com CEE

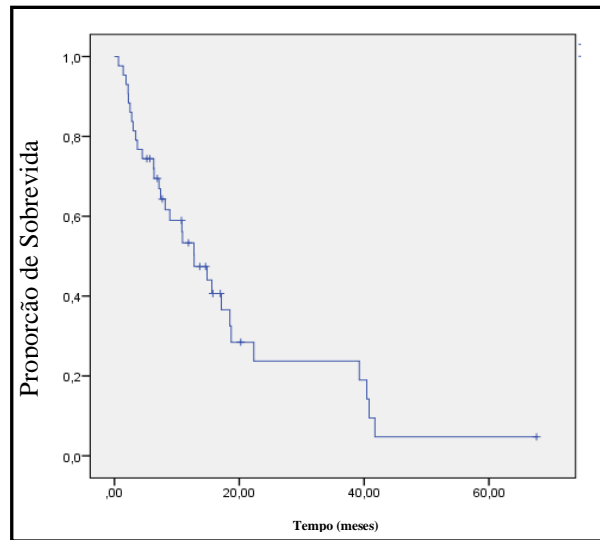
As características clínico-patológicas dos pacientes que fizeram parte deste estudo estão listadas na Quadro 6. Os pacientes foram predominantemente do sexo masculino (74,0%) com idade média de 59 anos (46-79 anos). Os tumores foram localizados preferencialmente no terço médio do esôfago (44,0%), sendo a maioria (70,0%) classificada como moderadamente diferenciado. Quanto ao estadiamento clínico, a maior parte desses tumores foi classificado como II e III, 44,0% e 32,0% respectivamente.

Em relação à sobrevida global desses pacientes, foi observada uma mediana de 12,8 meses (DP = 2,691; IC 95% 7,493 - 18,040), sendo a menor sobrevida de 0,6 meses e a maior de 67 meses. Assim, foi possível notar que somente 22,5% dos pacientes apresentou sobrevida maior que 20 meses e apenas um paciente apresentou sobrevida maior que 5 anos (Figura 9).

Quadro 6 - Características clínicas e patológicas dos pacientes com CEE participantes do estudo

Características clínicas e patológicas	Frequência
Idade	
< 60	23
≥ 60	20
Total	43
Sexo	
Masculino	32
Feminino	11
Total	43
Óbito	
Não	12
Sim	31
Total	43
Localização do tumor	
Esôfago Cervical	2
Esôfago Cervical-Terço Superior	1
Esôfago Cervical-Terço Superior-Terço Médio	1
Terço Inferior	6
Terço Médio	19
Terço Médio-Terço Inferior	4
Terço Superior	7
Terço Superior-Terço Médio	3
Total	43
Estadiamento clínico	
I	2
II	19
III	14
IV	6
Total	42
Diferenciação do Tumor	
Pouco	11
Moderadamente	30
Bem	2
Total	43

Figura 9 - Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida global dos pacientes com CEE participantes do estudo



Em seguida, verificamos se alguma característica clínica e patológica influenciou na sobrevida desses pacientes, mas nenhuma das características analisadas impactou com significância estatística na sobrevida global (Quadro 7).

Quadro 7 - Características clínico-patológicas dos pacientes com CEE e associação com sobrevida global

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Valor de p
		Mediana	DP	IC 95% (Mín/máx)		
Idade						
< 60	23	14,83	2,06	10,79	18,87	0,731
≥ 60	20	10,9	3,12	4,77	17,02	
Total	43	12,76				
Estadiamento clínico						
I – IIA	19	12,733	4,306	4,293	21,174	0,974
IIB - IV	22	15,600	3,538	8,666	22,534	
Total	41					
Diferenciação do Tumor						
Bem – Moderadamente	32	14,833	2,636	9,667	20,000	0,566
Pouco	11	8,867	2,513	3,941	13,792	
Total	43					

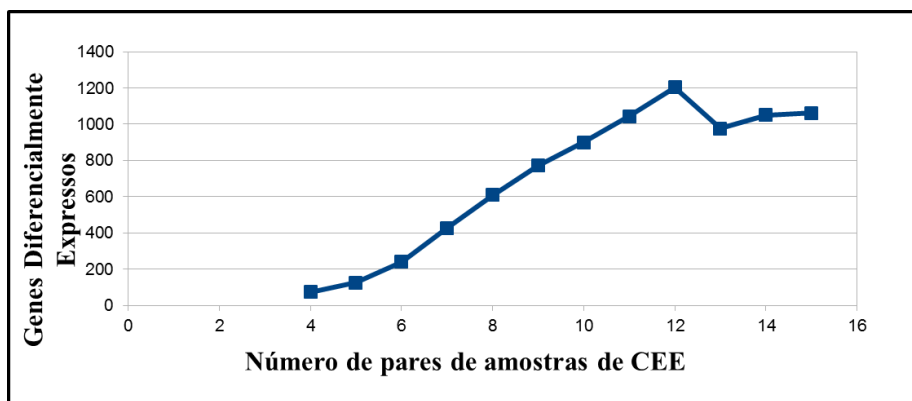
Legenda: DP – desvio padrão; IC – intervalo de confiança 95%

3.2. Análise randômica do perfil de expressão gênica global de carcinoma epidermóide de esôfago através da técnica de microarranjo de DNA

3.2.1. Determinação do número de amostras para a análise de expressão global por microarranjo de DNA

Com a finalidade de determinar o número de pares de amostras (tecido tumoral e mucosa não tumoral adjacente ao tumor) necessário para identificar a maioria dos genes diferencialmente expressos (GDE) em CEE, verificamos o número de GDE em relação ao aumento dos pares de amostras (Figura 10).

Figura 10 - Representação gráfica do número de GDE em relação ao número de pares de amostras de pacientes com CEE analisados. O aumento no número de GDEs cessa a partir da análise com 13 pares de amostras de CEE e tecido adjacente.

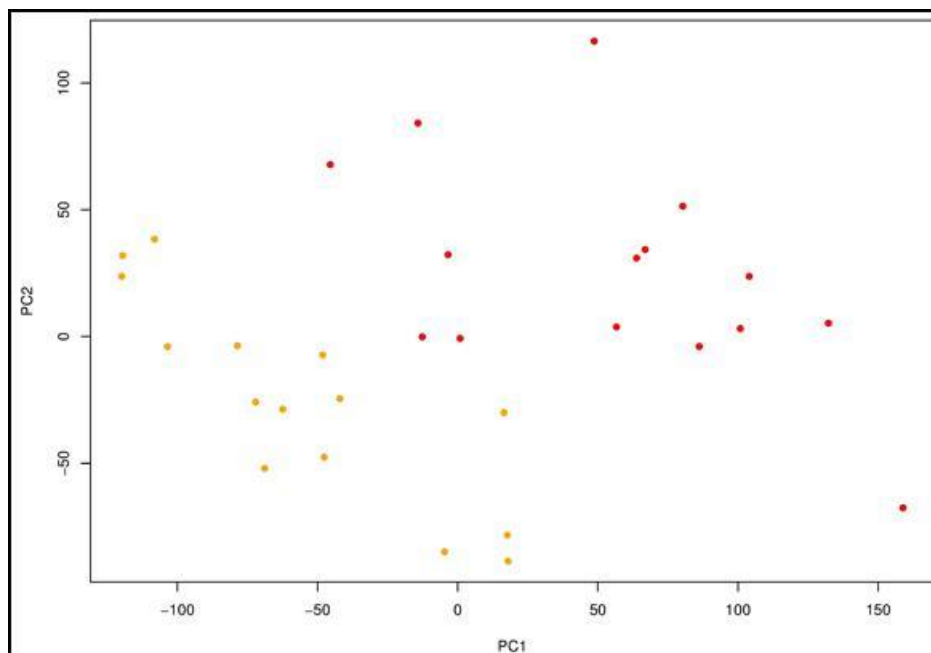


Foi possível observar que a partir de 13 pares de amostras não houve ganho considerável no número de genes diferencialmente expressos, ou seja, os GDE mais homoganeamente alterados no tumor em relação ao tecido adjacente estão presentes a partir da análise com 13 pares de amostras.

3.2.2. Comparação do perfil de expressão gênica global do tecido tumoral com a mucosa adjacente ao tumor

A análise de componente principal foi utilizada, uma transformação linear ortogonal que transforma todos os dados de expressão de cada amostra em um novo sistema de coordenadas de forma que a maior variância por qualquer projeção dos dados fica ao longo da primeira coordenada (o chamado primeiro componente – PC1), a segunda maior variância fica ao longo da segunda coordenada (PC2), e assim por diante. Nesta análise, foi possível observar a separação das amostras em dois grupos, um grupo formado pelas amostras tumorais e o outro pelas amostras de tecido não-tumoral adjacente ao tumor (Figura 11).

Figura 11 - Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de DNA entre as amostras tumorais e mucosas não tumorais adjacentes ao tumor. Pode-se observar a formação de dois grupos de amostras dispostos nas dimensões PC1 e PC2, um grupo composto das amostras adjacentes ao tumor e o outro com as amostras de CEE.

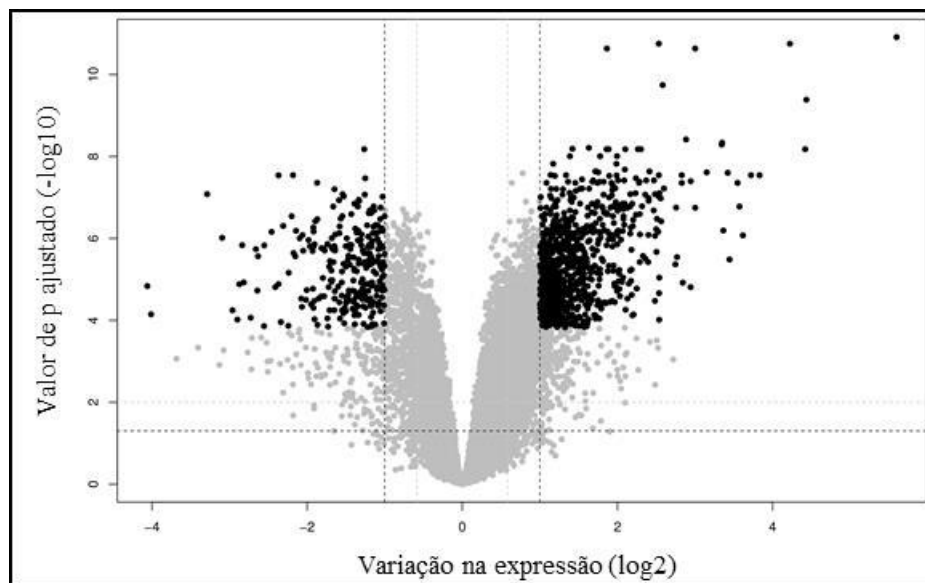


Legenda: Pontos Vermelhos: amostras tumorais; Pontos Amarelos: Amostras não-tumorais adjacentes aos tumores; PC1: componente principal 1; PC2: componente principal 2

A determinação de quais genes estariam diferencialmente expressos em CEE foi realizada utilizando como critérios estatísticos o valor de p ajustado menor que 0,05, *odds*

probability maior que 95% e \log_2 *Fold Change* absoluto maior ou igual a 1. Assim, após a utilização desses critérios, foram encontrados 1064 GDE, sendo 791 super expressos e 270 menos expressos nos tumores quando comparados com a mucosa não tumoral adjacente ao tumor (Figura 12). Os 20 genes mais super-expressos e os 20 genes mais sub-expressos nas amostras tumorais em comparação com o a mucosa adjacente estão listados na Quadro 8. A lista completa dos GDEs está presente no adendo 1 desta tese.

Figura 12 - Gráfico em forma de vulcão representando os GDEs em CEE



Legenda: Pontos cinzas: genes que não apresentaram diferença de expressão significativa entre os grupos;
Pontos pretos: genes diferencialmente expressos entre os grupos analisados

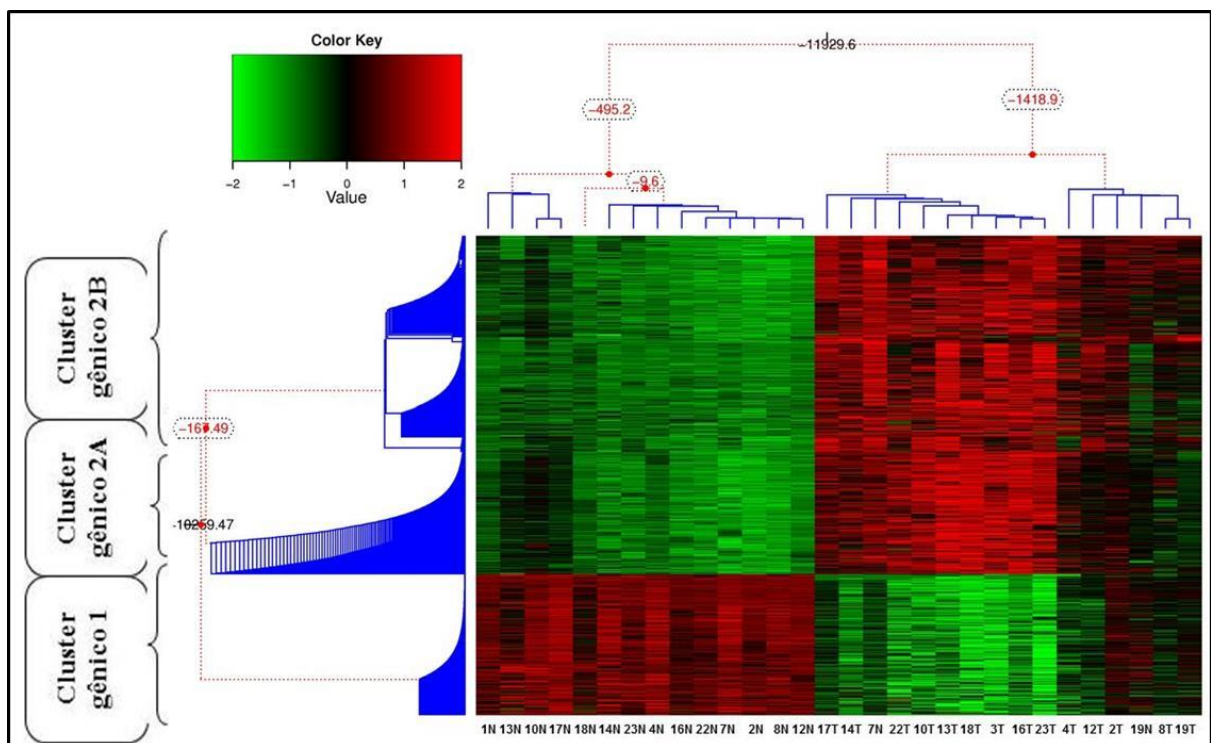
Quadro 8 - Lista dos 20 genes mais super-expressos e dos 20 mais sub-expressos nos tumores quando comparados com a mucosa não tumoral adjacente ao tumor

Genes Super-Expressos em CEE		
Gene Symbol	Variação na Expressão	valor de p
MMP12	21.40	6.6E-09
LUM	18.66	1.8E-11
CCL18	14.23	2.9E-08
GREM1	13.19	2.9E-08
SPP1	12.26	8.4E-07
IL8	11.90	1.7E-07
MMP3	11.69	4.4E-08
IGJ	10.88	3.3E-06
COL12A1	10.71	2.5E-08
FN1	10.30	6.4E-07
IFI44L	10.18	4.6E-09
LAMC2	10.15	5.1E-09
SEMA3C	8.88	2.4E-08
MMP10	8.01	1.8E-07
PLA2G7	8.00	2.3E-11
TGFBI	7.70	4.0E-08
POSTN	7.68	1.6E-05
MMP2	7.38	3.8E-09
CXCL13	7.17	1.2E-05
C1S	7.11	4.4E-08
Genes Sub-Expressos em CEE		
Gene Symbol	Variação na Expressão	valor de p
TMPRSS11B	-4.06	1.5E-05
CRISP3	-4.01	7.1E-05
ACER1	-3.29	8.3E-08
ENDOU	-3.10	9.7E-07
KRT78	-2.96	5.7E-05
PPP1R3C	-2.90	9.6E-05
SLURP1	-2.87	1.3E-05
GYS2	-2.84	1.5E-06
PLA2G2A	-2.82	1.2E-05
SCEL	-2.73	8.6E-05
SH3BGRL2	-2.66	1.8E-06
HPGD	-2.64	1.9E-05
GCOM1	-2.63	2.7E-06
CWH43	-2.56	1.4E-04
PADI1	-2.55	1.5E-06
RAET1E	-2.46	6.9E-07
ANXA9	-2.41	1.5E-05
ECM1	-2.37	1.3E-05
DPCR1	-2.37	2.9E-08
MT1G	-2.34	1.1E-04

3.2.2.1. Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDE e formação de grupos gênicos

Após a determinação dos GDE, as amostras foram agrupadas em uma clusterização hierárquica bayesiana não supervisionada, utilizando os valores de expressão dos GDE de cada amostra. Esta análise resultou em amostras organizadas em dois grandes grupos, conforme demonstrado na Figura 13.

Figura 13 - *Heatmap* apresentando o agrupamento hierárquico bayesiano não supervisionado das amostras de CEE e tecido adjacente ao tumor utilizando valores de expressão dos GDE. Dois grandes agrupamentos de amostras foi formado, sendo um composto de amostras de tecido adjacente ao CEE e o segundo formado pelas amostras de CEE, havendo somente uma amostra agrupando de forma equivocada.



Legenda: Tons de verde crescente: diminuição da expressão gênica; Tons de vermelho crescente: aumento da expressão gênica; N – amostras adjacentes ao tumor; T – amostras de CEE.

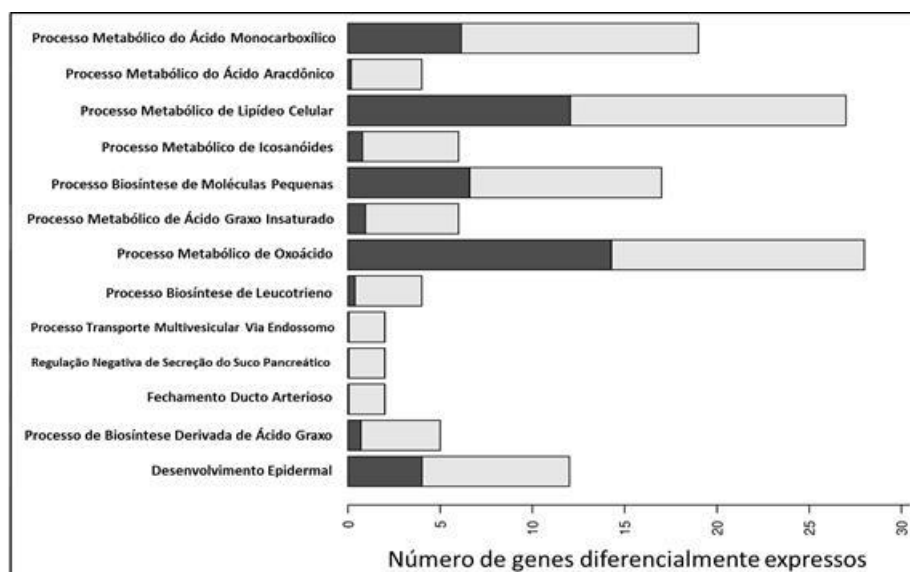
Podemos observar que os GDE foram divididos entre genes super-expressos (*cluster* gênico 2 A e B) e genes sub-expressos no tumor (*cluster* gênico 1). Essa variação na expressão foi responsável pela separação das amostras no agrupamento hierárquico não supervisionado em dois grandes grupos, um contendo as amostras tumorais (T) e outro as amostras adjacentes ao tumor (N), havendo somente uma amostra de tecido adjacente ao tumor clusterizando de forma errônea, ficando localizado junto as amostras de CEE.

Também observamos uma separação significativa entre as amostras no grupo CEE, com base na expressão dos genes presentes nos *cluster* 2A e 2 B. Não observamos associação entre os dados clinicopatológicos e qualquer dos dois grupos.

3.2.2.2. Enriquecimento dos *clusters* gênicos na plataforma *Gene Ontology*

Após o enriquecimento dos GDE presentes no *cluster* gênico 1 na plataforma *Gene Ontology*, observamos que os genes sub-expressos no tumor em relação a mucosa adjacente estão envolvidos principalmente em processos metabólicos, transporte e disponibilidade de biomoléculas e desenvolvimento epidermal (Figura 14).

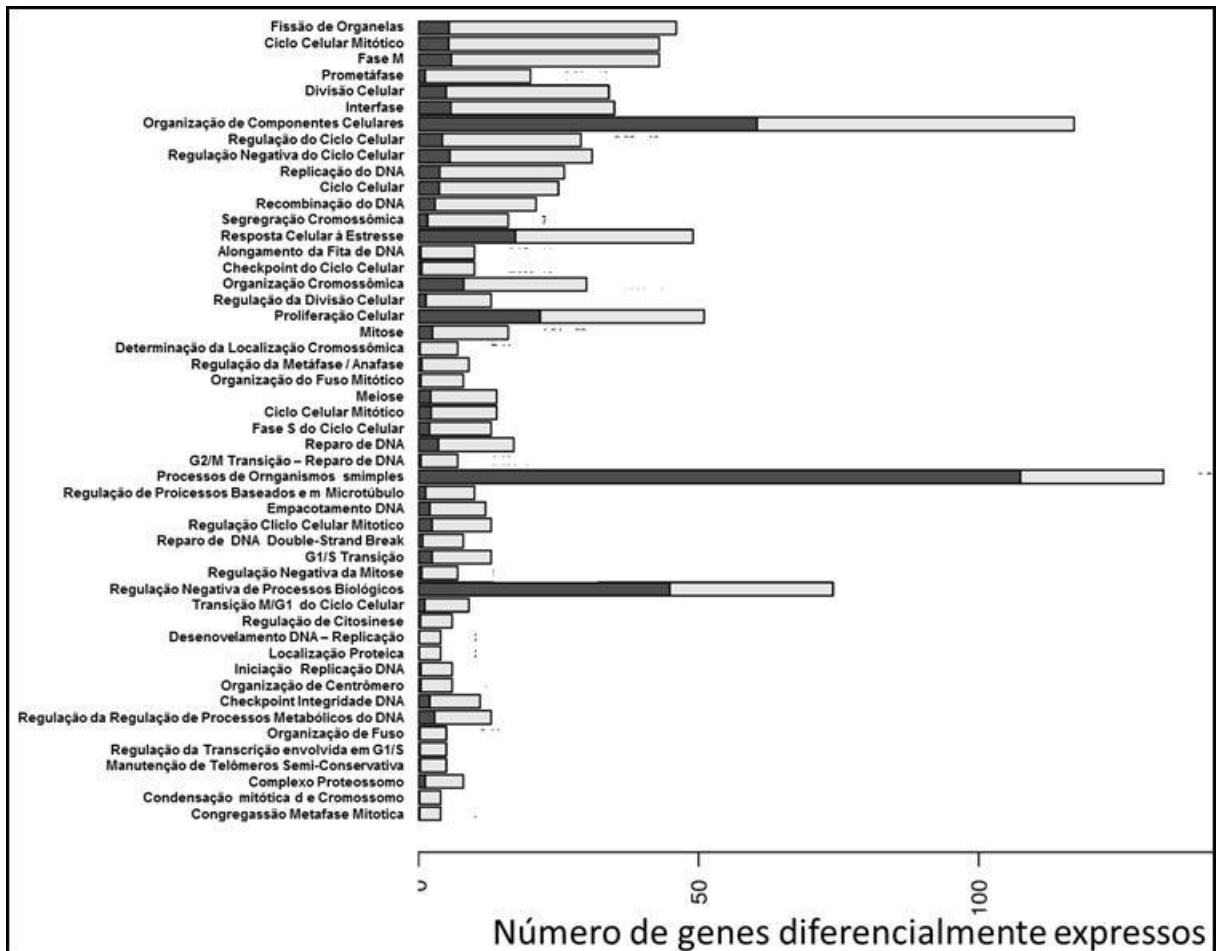
Figura 14 - Enriquecimento na plataforma *Gene Ontology* dos GDEs presentes no *cluster* gênico 1 no agrupamento das amostras de CEE e mucosa não tumoral adjacente ao tumor.



Legenda: Barras escuras: número de GDE esperado; Barras claras: número de GDE observado

O enriquecimento do *cluster* gênico 2A na plataforma *Gene Ontology*, mostrou, principalmente, processos biológicos relacionados ao controle do ciclo celular, segregação cromossômica, divisão celular e reparo de DNA, dentre outros (Figura 15).

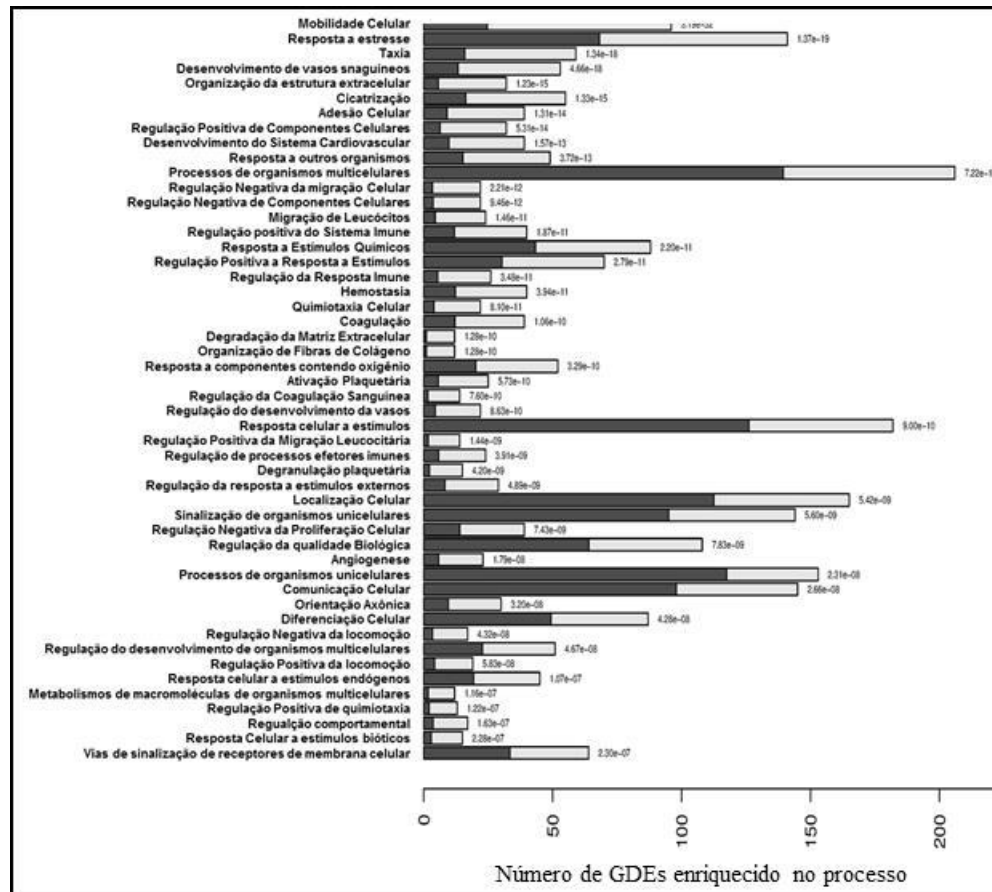
Figura 15 - Enriquecimento na plataforma *Gene Ontology* dos GDE presentes no *cluster* gênico 2A no agrupamento das amostras de CEE e mucosa não tumoral adjacente ao tumor



Legenda: Barras escuras: número de GDE esperado; Barras claras: número de GDE observado

O enriquecimento do *cluster* gênico 2B na plataforma *Gene Ontology*, nos apresenta, principalmente, processos biológicos relacionados ao comportamento e atividade celular, como resposta à estresse, mobilidade, adesão, síntese de matriz extracelular, estímulo à síntese de vasos sanguíneos, estímulo de receptores de membrana e outros (Figura 16)

Figura 16 - Enriquecimento na plataforma *Gene Ontology* dos GDE presentes no *cluster* gênico 2B no agrupamento das amostras de CEE e mucosa não tumoral adjacente ao tumor



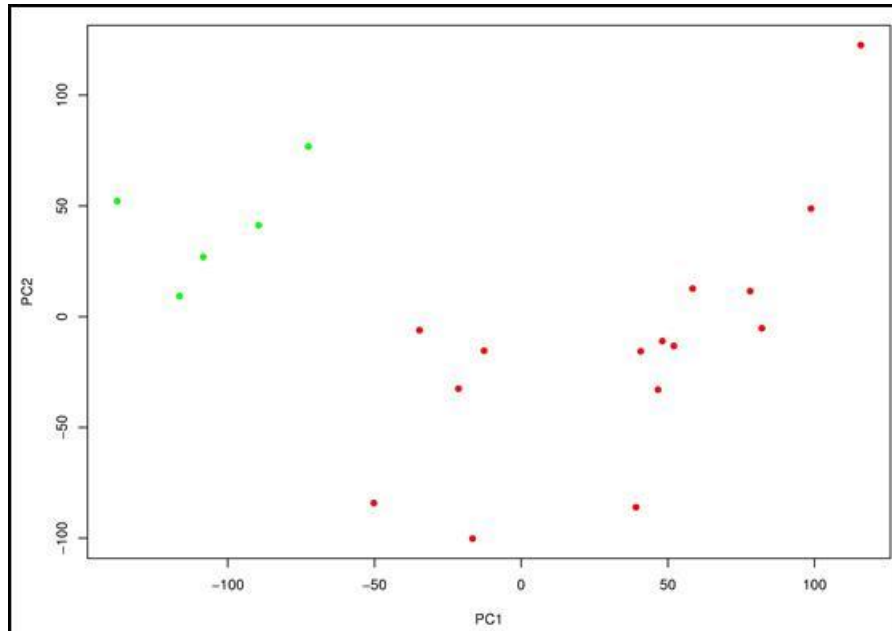
Legenda:

Barras escuras: número de GDE esperado; Barras claras: número de GDE observado

3.2.3. Comparação entre o perfil de expressão gênica global ente o tecido tumoral e mucosa saudável de pacientes livres de câncer

Nesta análise, foi possível observar a separação das amostras em dois grupos, um grupo formado pelas amostras tumorais e o outro pelas amostras de epitélio esofágico saudável (Figura 17).

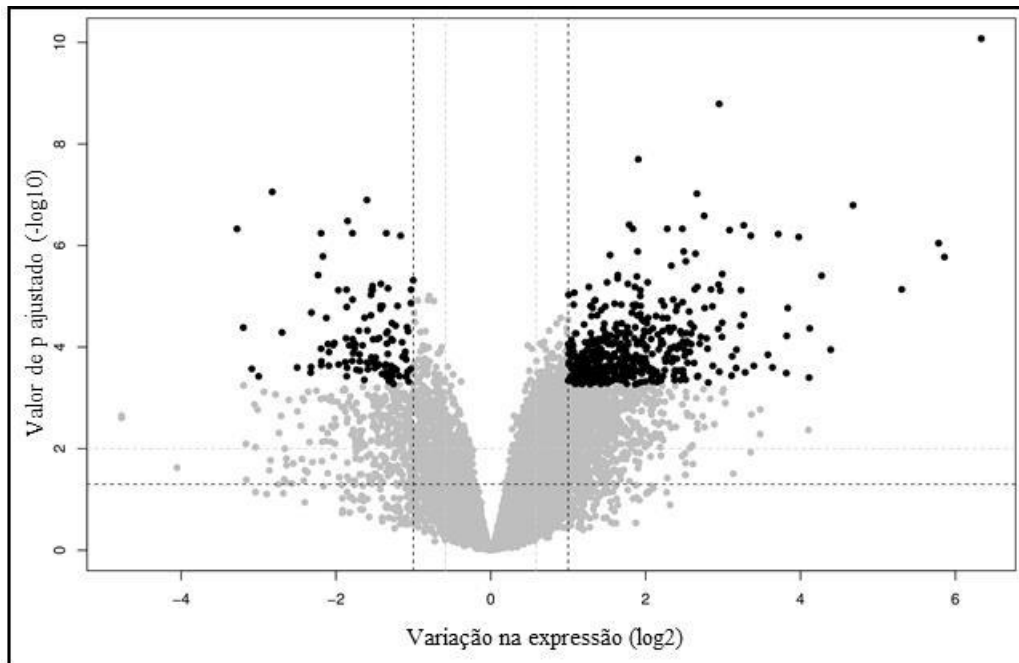
Figura 17 - Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de DNA entre as amostras tumorais e epitélio esofágico saudável. Pode-se observar a formação de dois grupos de amostras dispostos nas dimensões PC1 e PC2, um grupo composto das amostras de epitélio esofágico saudável e o outro com as amostras de CEE.



Legenda: Pontos Vermelhos: amostras tumorais; Pontos Verdes: Amostras não-tumorais adjacentes aos tumores; PC1: componente principal 1; PC2: componente principal 2

A determinação de quais genes estariam diferencialmente expressos entre amostras de CEE e epitélio esofágico saudável foi realizada utilizando os mesmos critérios estatísticos já descritos. A análise resultou em 535 GDEs, sendo 437 super-expressos e 98 sub-regulados no tumor em relação à mucosa saudável (Figura 18). Os 20 genes mais super-expressos e os 20 mais sub-expressos nas amostras tumorais em comparação com a mucosa saudável estão listados na Quadro 9.

Figura 18 - Gráfico em forma de vulcão representando os GDE na comparação de expressão gênica global entre CEE e mucosa esofágica saudável



Legenda: Pontos cinzas: genes que não apresentaram diferença de expressão significativa entre os grupos; Pontos pretos: genes diferencialmente expressos entre os grupos analisados

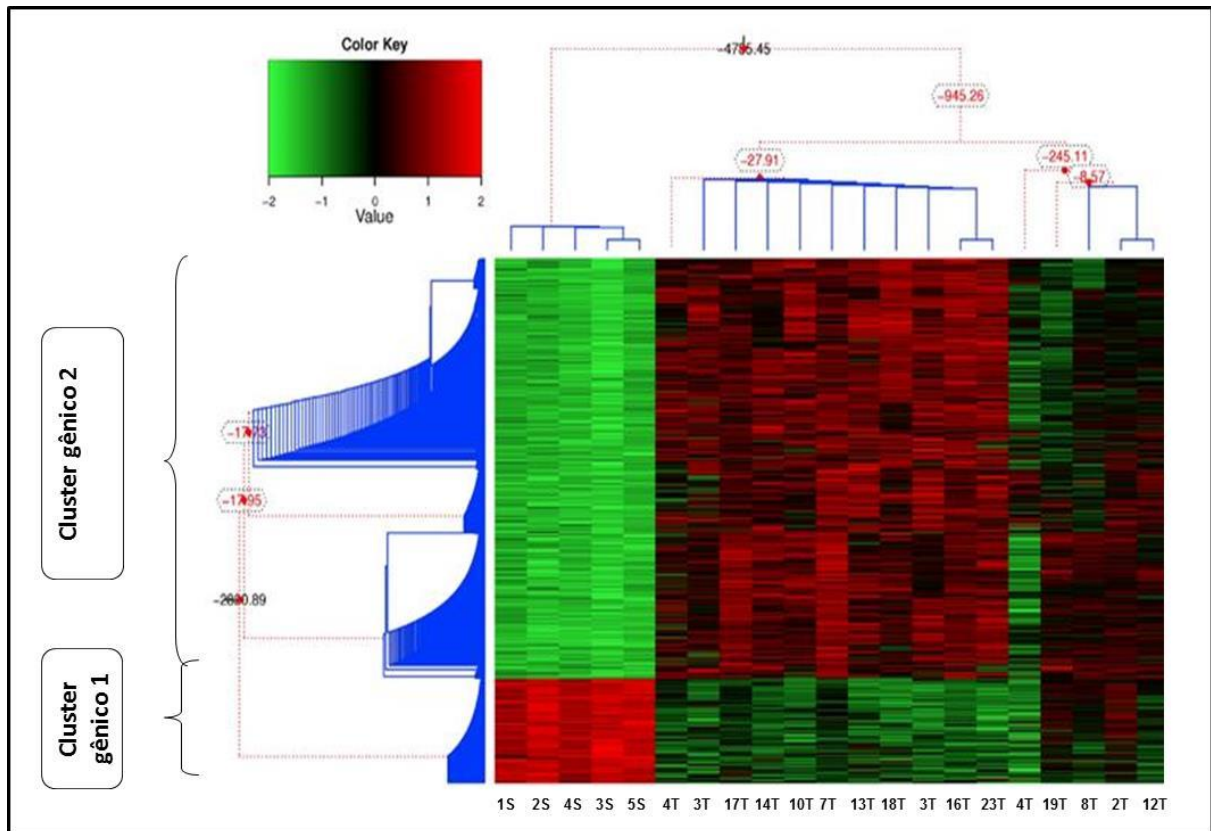
3.2.3.1. Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDEs e formação de grupos gênicos

Após a determinação dos GDEs, as amostras foram agrupadas em uma clusterização hierárquica bayesiana não supervisionada, utilizando os valores de expressão dos GDE. Esta análise resultou em amostras organizadas em dois grandes grupos, um contendo as amostras de epitélio saudável e o segundo as amostras tumorais (Figura 19).

Quadro 9 - Lista dos 20 genes mais super-expressos e dos 20 mais sub-expressos entre as amostras tumorais de CEE e o tecido epitelial esofágico saudável

Genes Super-Expressos nos Tumores		
Gene Symbol	Varição na expressão	valor de p
MMP1	58.03	1.68085E-06
MMP12	55.08	9.01787E-07
IGJ	39.59	7.31543E-06
LUM	25.60	1.60999E-07
CCL18	20.97	0.000112514
IL8	19.32	0.000003921
GREM1	17.37	4.27993E-05
SPP1	17.27	0.000398017
IFI6	15.75	6.79757E-07
SEMA3C	14.27	1.69913E-05
IFI44L	14.14	6.01187E-05
FN1	14.09	0.0003259
C1S	13.10	5.94935E-07
MMP3	12.44	0.000251723
COL12A1	11.95	0.000141119
CXCL10	10.53	0.000234012
PLA2G7	10.25	6.40666E-07
LAMC2	9.75	0.000314903
TMEM45A	9.63	2.32741E-05
PMP22	9.62	4.00231E-07
Genes Sub-Expressos nos Tumores		
Gene Symbol	Varição na expressão	valor de p
GYS2	-9.16	4.12292E-05
PADI1	-8.50	0.000268791
SCIN	-7.99	0.000376858
DPCR1	-7.07	8.8039E-08
IL18	-6.48	5.14715E-05
AIF1L	-5.66	0.00025186
LYPD2	-5.01	0.000318156
MGLL	-5.00	0.000246546
GGTA1P	-4.98	0.000020965
TFAP2B	-4.57	5.72683E-07
ZNF431	-4.57	0.000107548
CAB39L	-4.56	0.000227658
ABLIM3	-4.55	0.00019092
CTTNBP2	-4.49	1.63912E-06
LPIN1	-4.30	8.71331E-05
FUT6	-4.26	0.000232496
UBL3	-4.26	0.000124998
LNX1	-4.10	9.12739E-05
CGNL1	-4.06	8.30581E-05
VSIG2	-3.91	0.000219985

Figura 19 - *Heatmap* apresentando o agrupamento hierárquico bayesiano não supervisionado das amostras de CEE e epitélio esofágico saudável utilizando valores de expressão dos GDE. Dois grandes agrupamentos de amostras foram formados, sendo um composto de amostras de epitélio esofágico saudável e o segundo formado pelas amostras de CEE.



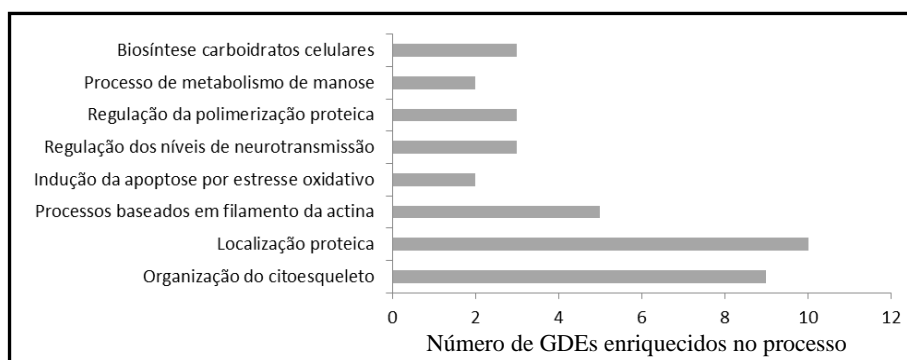
Legenda: Tons de verde crescente: diminuição da expressão gênica; Tons de vermelho crescente: aumento da expressão gênica. M – mucosa esofágica saudável; T – amostras de CEE.

Podemos observar que os GDEs foram divididos entre super-expressos (*cluster* gênico 2) e sub-expressos no tumor (*cluster* gênico 1). No agrupamento das amostras tumorais observa-se uma maior heterogeneidade na organização das amostras, isto devido à comparação com o epitélio saudável.

3.2.3.2. Enriquecimento dos *clusters* gênicas na plataforma *Gene Ontology*

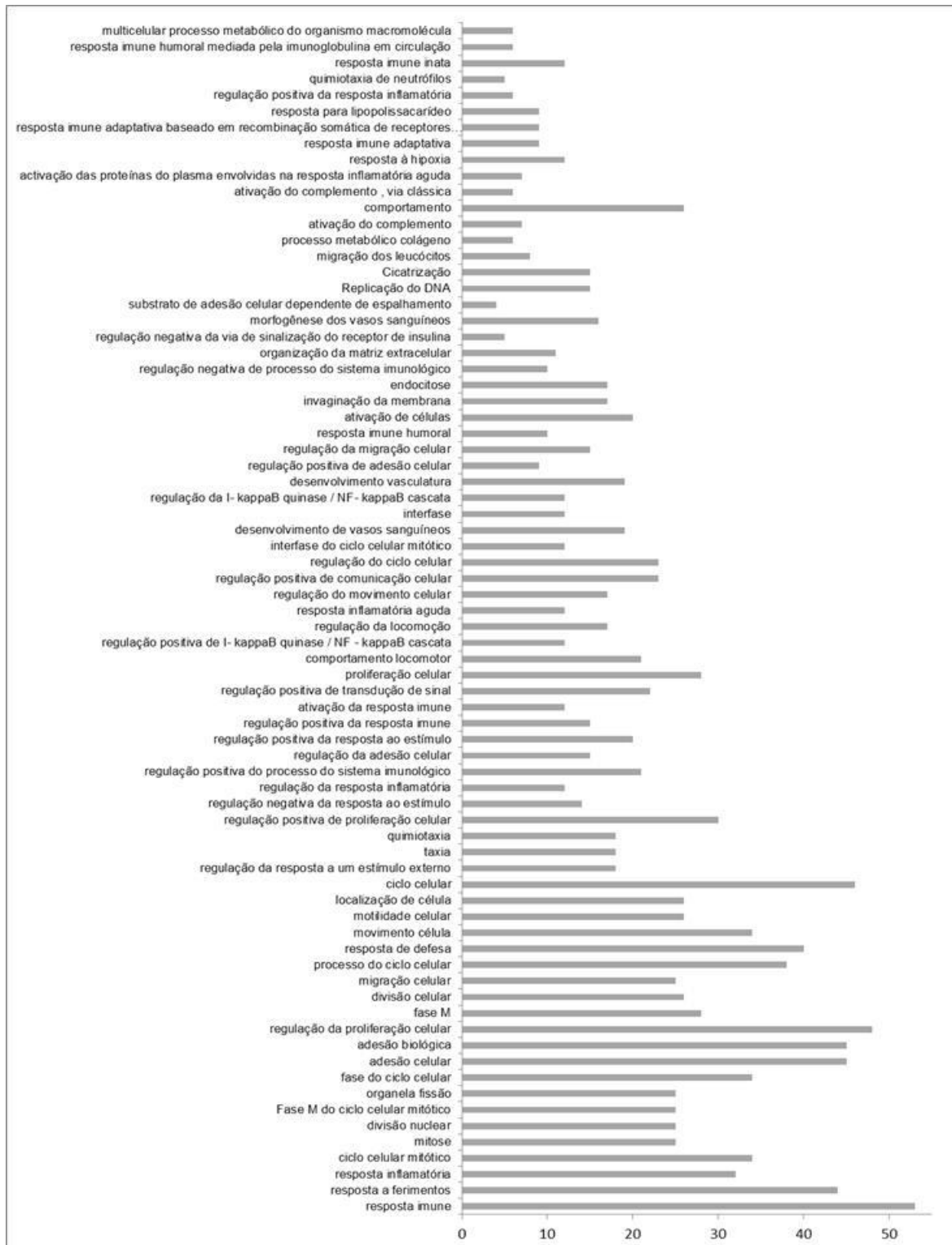
O enriquecimento dos GDE presentes no *cluster1*, isto é genes sub-expressos no tumor em relação a mucosa esofágica saudável, resultou em processos biológicos relacionados a metabolismo de carboidratos, indução a apoptose, organização de citoesqueleto, dentre outros (Figura 20).

Figura 20 - Enriquecimento na plataforma *Gene Ontology* dos GDEs presentes no *cluster* gênico 1 no agrupamento das amostras de CEE e mucosa esofágica saudável



O enriquecimento dos GDE presentes no *cluster2*, isto é genes super-expressos no tumor em relação a mucosa esofágica saudável, resultou em processos biológicos relacionados a resposta imune, síntese de vasos sanguíneos, controle do ciclo celular, divisão celular, proliferação, dentre outros (Figura 21).

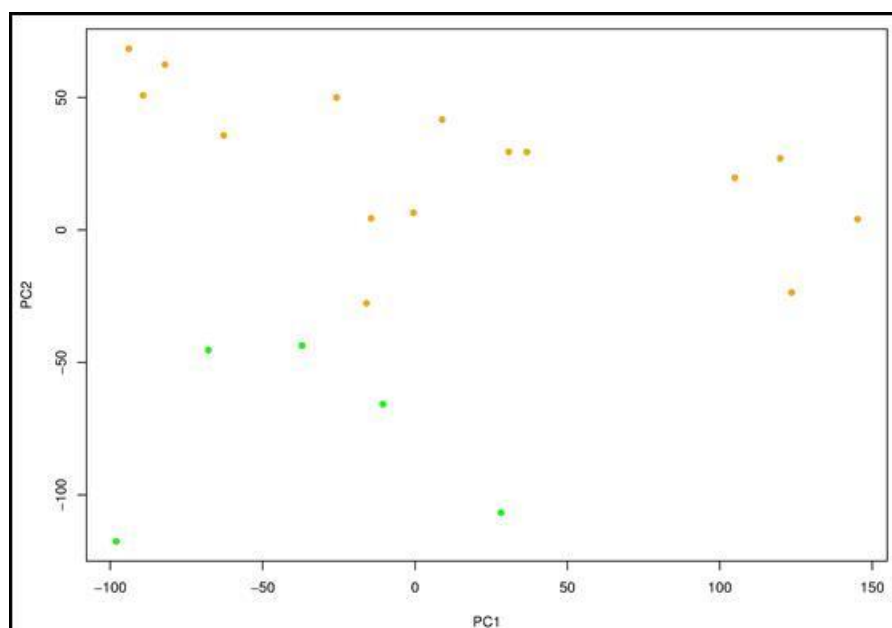
Figura 21 - Enriquecimento na plataforma *Gene Ontology* dos GDEs presentes no *cluster* gênico 2 no agrupamento das amostras de CEE e mucosa esofágica saudável



3.2.4. Comparação entre o perfil de expressão gênica global ente a mucosa não-tumoral adjacente ao CEE e tecido epitelial saudável de pacientes sem histórico de câncer

Nesta análise foi possível observar a separação das amostras em dois grupos, um grupo formado pelas amostras não-tumorais adjacentes ao CEE e o outro pelas amostras de epitélio esofágico saudável (Figura 22)

Figura 22 - Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de cDNA entre as amostras de mucosa não-tumoral adjacente ao CEE e epitélio esofágico saudável. Pode-se observar a formação de dois grupos de amostras dispostos nas dimensões PC1 e PC2, um grupo composto das amostras de epitélio esofágico saudável e o outro com as amostras adjacente a CEE.

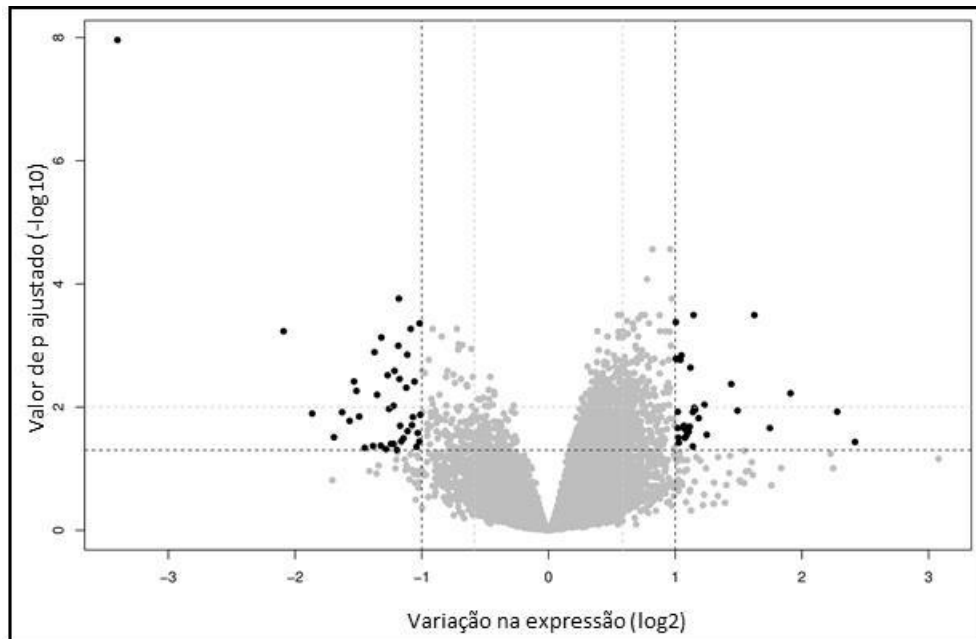


Legenda: Pontos Verdes: amostras de epitélio saudável; Pontos amarelos: Amostras não-tumorais adjacentes aos tumores; PC1: componente principal 1; PC2: componente principal 2

Este resultado evidencia as diferenças presentes no epitélio escamoso do esôfago adjacente a CEE acometido pelos fatores de risco inerente à carcinogênese esofágica.

A determinação de quais genes estariam diferencialmente expressos entre amostras de mucosa esofágica não tumoral adjacente ao tumor e o epitélio esofágico saudável foi realizada utilizando os mesmos critérios estatísticos já descritos. A análise resultou em 27 GDEs, sendo 23 super-expressos e 4 sub-regulados na mucosa não-tumoral adjacente ao tumor (Figura 23). Na Quadro 10 são listados os GDE.

Figura 23 - Gráfico em forma de vulcão representando os GDE na comparação de expressão gênica global entre a mucosa não tumoral adjacente ao CEE e mucosa esofágica saudável



Legenda: Pontos cinzas: genes que não apresentaram diferença de expressão significativa entre os grupos; Pontos pretos: genes diferencialmente expressos entre os grupos analisados

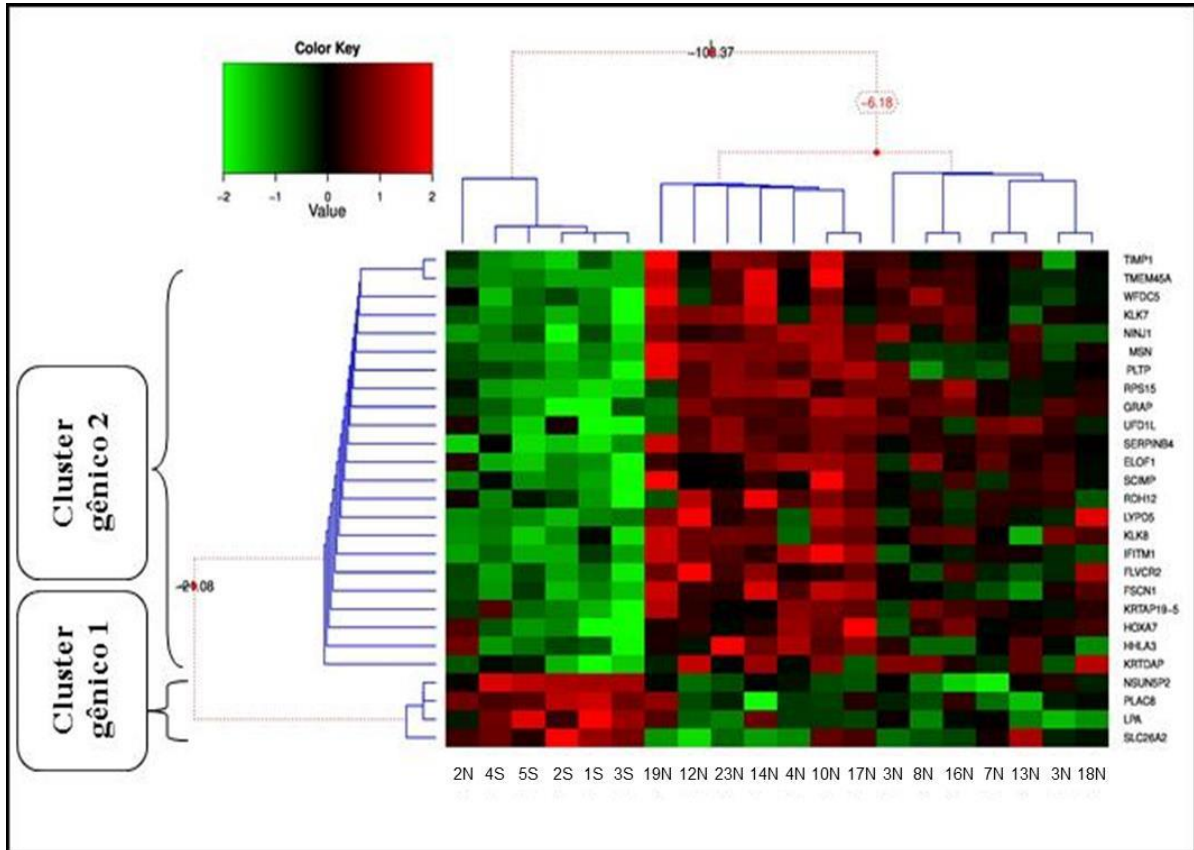
Quadro 10 - Lista dos genes diferencialmente expressos entre mucosa não tumoral adjacente a CEE e mucosa saudável

Genes Super-Expressos em Tecido Adjacente a CEE		
Gene Symbol	Varição na expressão	valor de p
KRTDAP	5.35	0.0368
TMEM45A	4.85	0.0119
KLK7	3.76	0.006
MSN	2.81	0.0114
UFD1L	2.72	0.0042
SERPINB4	2.35	0.0091
NINJ1	2.27	0.0151
TIMP1	2.23	0.0111
ELOF1	2.21	0.0003
IFITM1	2.2	0.0434
GRAP	2.17	0.0023
FLVCR2	2.17	0.0207
KRTAP19-5	2.15	0.025
SCIMP	2.13	0.0291
FSCN1	2.13	0.0238
LYPD5	2.11	0.0315
PLTP	2.1	0.0222
HHLA3	2.04	0.0378
KLK8	2.03	0.0313
RDH12	2.03	0.0219
WFDC5	2.03	0.0119
HOXA7	2.02	0.0017
RPS15	2.01	0.0004
Genes Sub-Expressos em Tecido Adjacente CEE		
Gene Symbol	Varição na expressão	valor de p
PLAC8	2.73	0.046
NSUN5P2	2.49	0.001
SLC26A2	2.37	0.04
LPA	2.18	0.005

3.2.4.1. Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDE e formação de grupos gênicos

Após a determinação dos GDE, as amostras foram agrupadas em uma clusterização hierárquica bayesiana não supervisionada, utilizando os valores de expressão dos GDE. Esta análise resultou em amostras separadas em dois grandes grupos, um contendo as amostras de epitélio saudável e o segundo as mucosas adjacentes ao tumor (Figura 24), entretanto uma amostra de mucosa adjacente ao tumor ficou agrupada junto com as amostras de epitélio saudável.

Figura 24 - Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDEs entre mucosa adjacente ao tumor e esôfago saudável e formação de grupos gênicos. Dois grandes agrupamentos de amostras foram formados, sendo um composto de amostras de epitélio esofágico saudável e o segundo formado pelas amostras adjacentes a CEE, havendo somente uma amostra agrupada de forma errônea (2N).

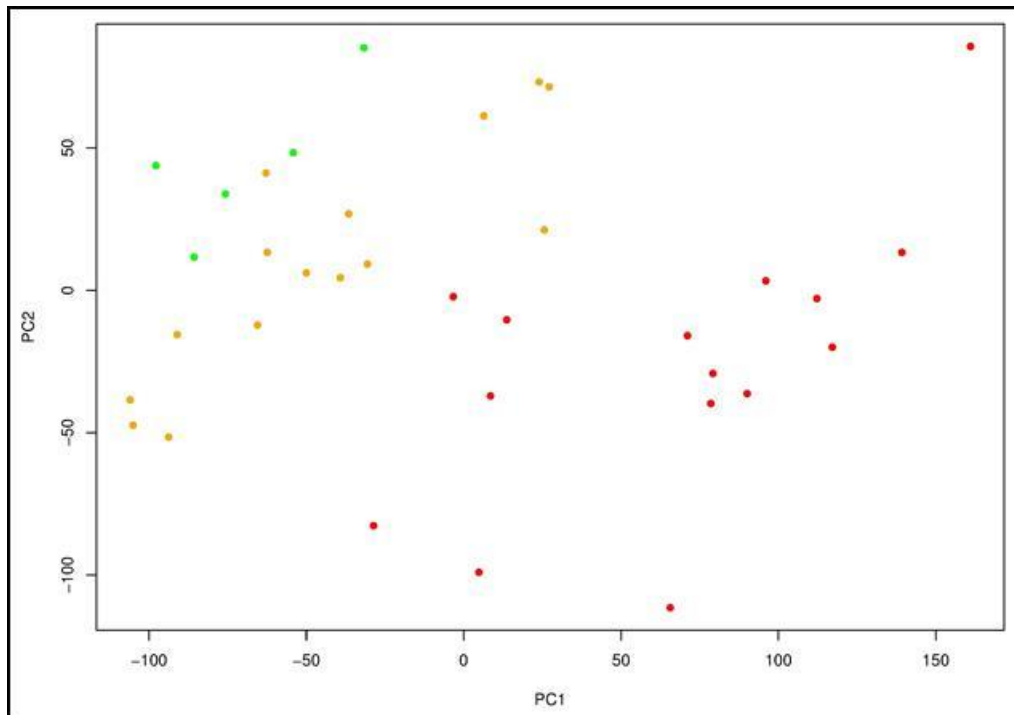


Legenda: Tons de verde crescente: diminuição da expressão gênica; Tons de vermelho crescente: aumento da expressão gênica. N – amostras adjacentes ao tumor; S – mucosa esofágica saudável.

3.2.5. Análise do perfil de expressão gênica global entre os três grupos, tumor, tecido não tumoral adjacente ao tumor e tecido esofágico saudável

A análise do componente principal resultou na separação dos tecidos em três grupos (Figura 25). É possível observar uma relação direta entre o tipo de amostra em relação a sua transformação neoplásica e o aumento dos valores de PC1 e PC2, pois amostras saudáveis livres de tumores estão agrupadas em posições de valores menores destes vetores, enquanto que os tumores apresentam perfil oposto, se localizando em coordenadas maiores de PC1 e PC2.

Figura 25 - Análise de componente principal utilizando os valores de expressão por microarranjo de DNA entre todas as amostras analisadas. Pode-se observar a formação de três grupos de amostras dispostos nas dimensões PC1 e PC2, um grupo composto das amostras de epitélio esofágico saudável, o segundo formado por amostras adjacente a CEE e o terceiro por amostras de CEE.

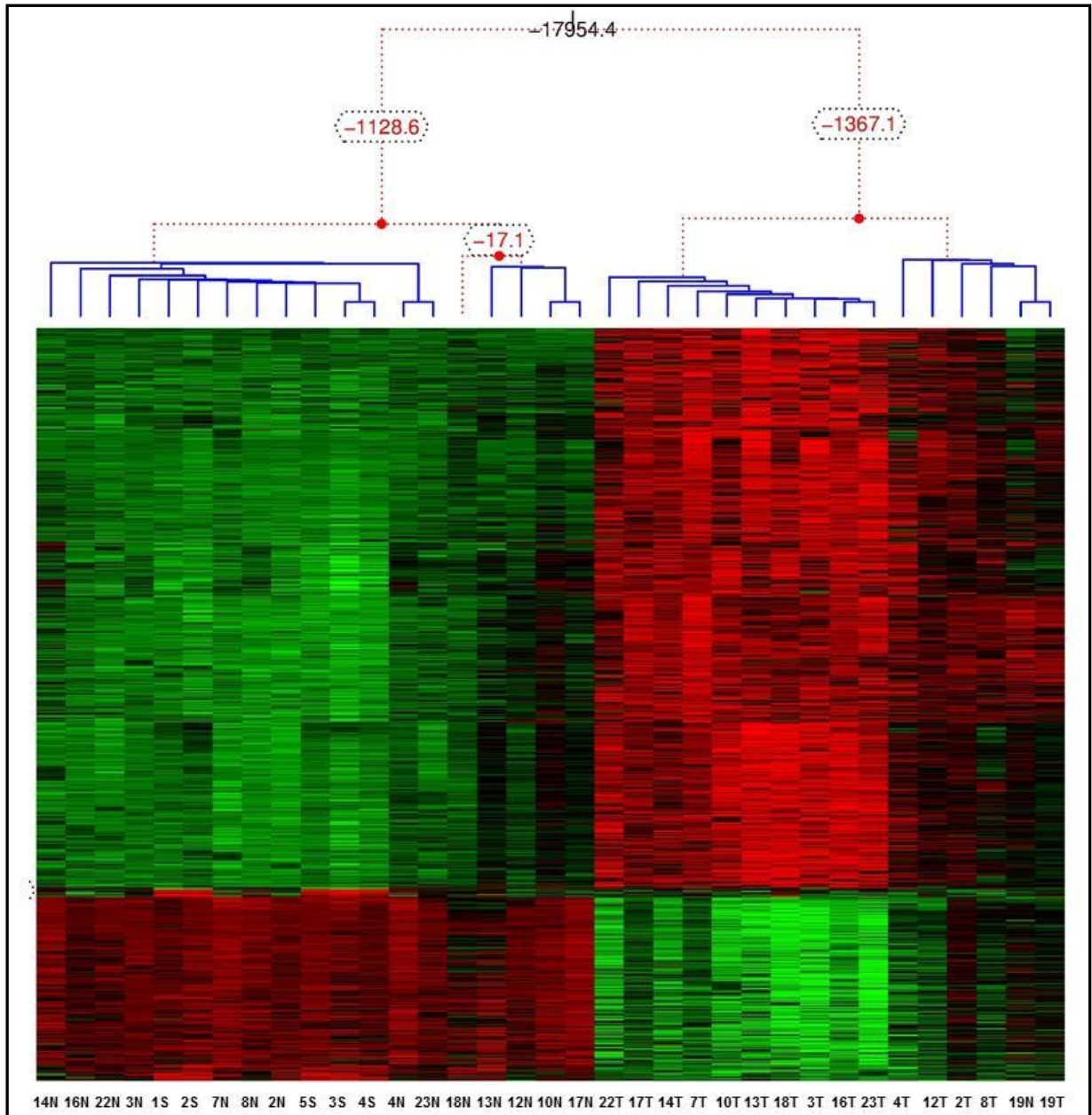


Legenda: Pontos Vermelhos: amostras tumorais CEE; Pontos Amarelos: Amostras não-tumorais adjacentes aos tumores CEE; Pontos Verdes: amostras de epitélio saudável. PC1: componente principal 1; PC2: componente principal 2

3.2.5.1. Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando a expressão dos GDE e formação de grupos gênicos

Utilizamos como variáveis para a clusterização das amostras dos três grupos os GDE oriundos da análise de tumor contra mucosa adjacente não tumoral. Observa-se a formação de dois grandes grupos de amostras, o primeiro formado por amostras adjacentes aos tumores e amostras de mucosa saudável e o outro pelos CEE (Figura 26).

Figura 26 - Agrupamento hierárquico bayesiano das amostras utilizando valores de expressão dos GDE observados entre CEE e mucosa adjacente. Nota-se a formação de dois grandes grupos de amostras, sendo o primeiro formado por amostras não tumorais (adjacentes e saudáveis) e o segundo pelas amostras de CEE



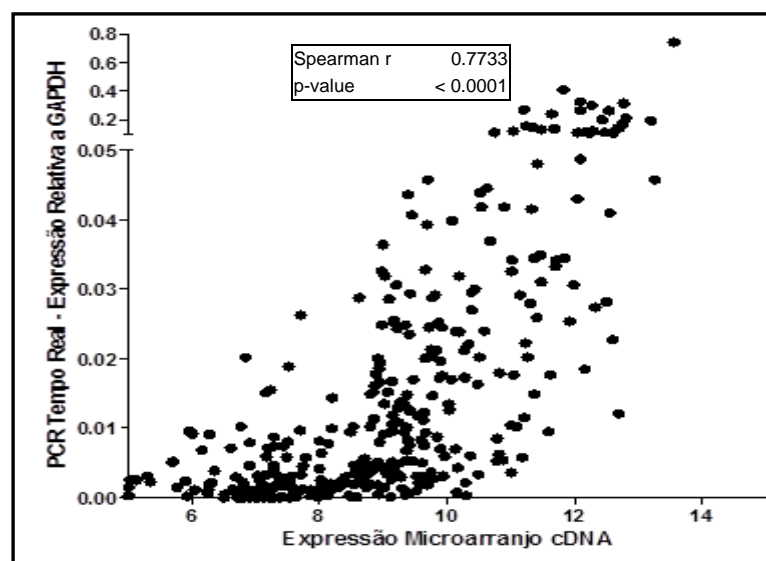
Legenda: Tons de verde crescente: diminuição da expressão gênica; Tons de vermelho crescente: aumento da expressão gênica. N – amostras adjacentes ao tumor; S – mucosa esofágica saudável; T – amostra de CEE

3.3. Validação da análise randômica de expressão gênica global através de microarranjo de DNA por PCR em tempo real

Mesmo utilizando um número de amostras significativo e com critérios de seleção de GDE elevados, validamos a técnica de microarranjo de DNA através de PCR em tempo real (qPCR), com os mesmos 15 pares de amostras tumoral e adjacente. Para tanto, selecionamos 13 genes, sendo 11 GDE (*FOXM1*, *PIK3R3*, *AKT3*, *HOXD10*, *ETV5*, *PLK1*, *CCNB1*, *FSCN1*, *CDK1*, *MMP12* e *MMP9*) e dois sem diferença de expressão (*STAT3* e *GUSB*) entre o tumor e a mucosa não tumoral adjacente ao tumor e os resultados foram normalizados pela expressão de *GAPDH*. O *GAPDH* foi selecionado como gene referência após avaliação da sua expressão no software RefFinder, disponível no site da web “<http://www.leonxie.com/>”.

O resultado do PCR em tempo real foi totalmente ao encontro do observado pelo microarranjo de DNA, isto é, os GDE no microarranjo apresentaram-se como GDE no PCR em tempo real e os genes sem diferença de expressão no microarranjo, apresentaram o mesmo perfil de expressão no PCRq, apresentando correlação de 77% entre todas as análises (Figura 27).

Figura 27 - Gráfico de correlação de valores de expressão gênica entre microarranjo de DNA e PCR em tempo real. Valores de expressão dos genes *FOXM1*, *PIK3R3*, *AKT3*, *HOXD10*, *ETV5*, *PLK1*, *CCNB1*, *FSCN1*, *CDK1*, *MMP12*, *MMP9*, *STAT3* e *GUSB*, nas amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor.



Legenda: r: valor de correlação entre os dados do microarranjo e qPCR.

3.3.1. Análise da expressão gênica de *FOXM1* (“Forkhead box protein M1”) e de membros de sua via de sinalização celular em CEE

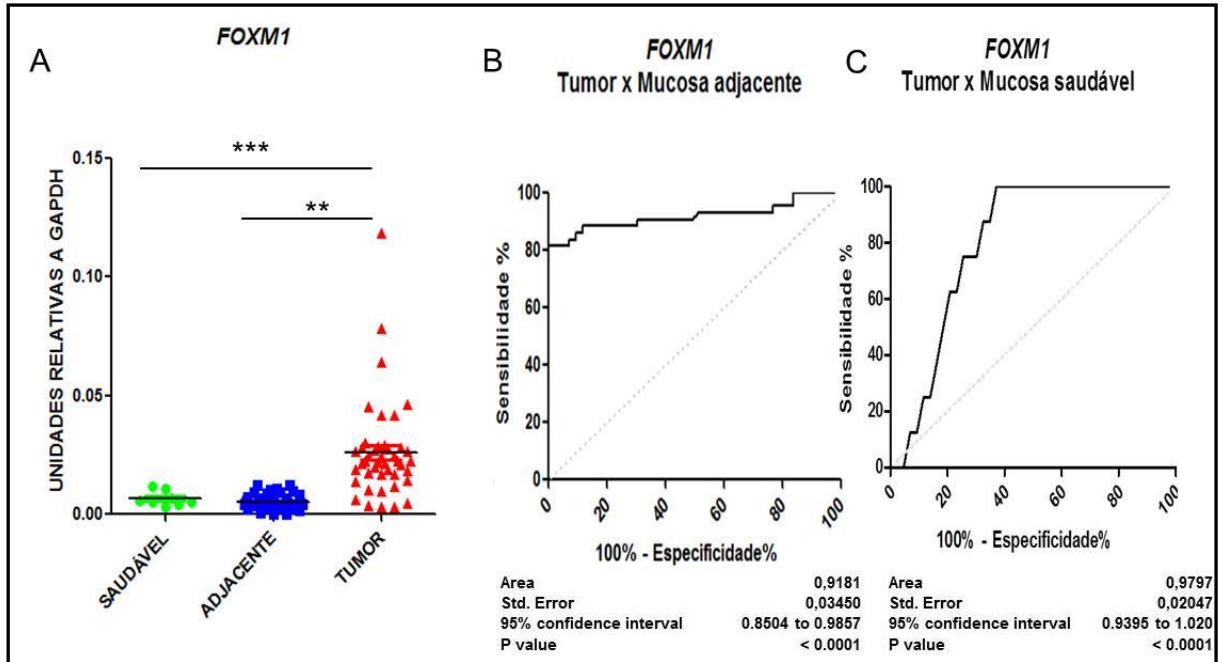
Após observarmos que *FOXM1* se apresenta super-expresso em CEE em relação à mucosa adjacente por microarranjo de DNA (3,34 vezes mais expresso), analisamos seu perfil de expressão por PCR em tempo real e observamos uma mediana de aumento de expressão no tumor de 4 vezes (Figura 28-A). Além disso, fizemos um teste de associação entre a expressão de *FOXM1*, tanto no tumor como na mucosa normal adjacente, e a sobrevida dos pacientes e não observamos significância estatística (Quadro 11). Entretanto, a expressão de *FOXM1*, através de análise de curva ROC, mostrou-se capaz de distinguir a mucosa tumoral da mucosa adjacente ao tumor com sensibilidade de 91% (Figura 28-B) e também foi capaz de distinguir o epitélio tumoral da mucosa saudável livre de doença com sensibilidade de 79,9% (Figura 28-C).

Quadro 11 - Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando valores da expressão gênica de *FOXM1* no tumor e na mucosa adjacente a CEE

Gene	Expressão no Tumor	Tempo de sobrevida				valor de p
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>FOXM1</i>	Baixa	11,665	1,511	8,703	14,626	p = 0,895
	Alta	11,352	1,34	8,726	13,978	
Gene	Expressão Tecido Adjacente ao Tumor	Tempo de sobrevida				valor de p
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>FOXM1</i>	Baixa	11,052	1,433	8,243	13,86	p = 0,787
	Alta	12	1	9	15	

Legenda: Alta expressão – expressão maior que a mediana; Baixa Expressão – expressão menor que a mediana.

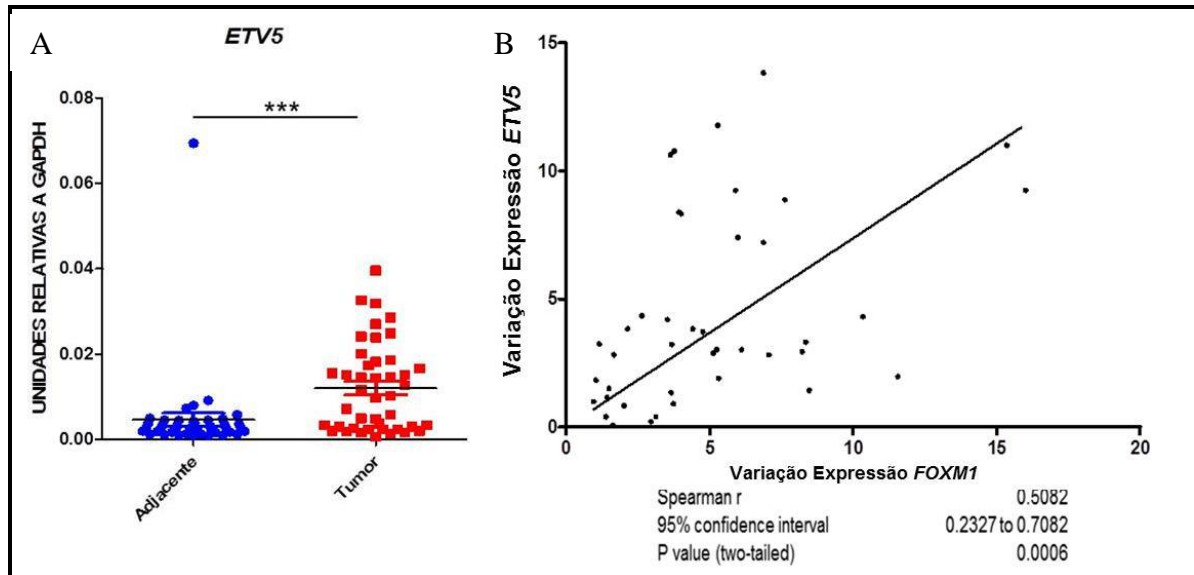
Figura 28 - Análise do perfil de expressão gênica de *FOXM1* em amostras de CEE, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável e seu potencial em distinguir estes tecidos. Foi observado super-expressão de *FOXM1* em CEE em comparação a mucosa adjacente ao tumor e ao tecido saudável (A). A expressão de *FOXM1* foi capaz de discriminar tumor de mucosa adjacente com acurácia de 91% (B) e de mucosa saudável com acurácia de 97,9% (C).



Legenda: A – Análise do perfil de expressão gênica de *FOXM1* na mucosa esofágica de indivíduos saudáveis, mucosa adjacente ao tumor e CEE; B – Curva ROC exibindo a capacidade da expressão de *FOXM1* em distinguir tecido tumoral de mucosa adjacente; C – Curva ROC exibindo a capacidade da expressão de *FOXM1* em distinguir tecido tumoral de mucosa saudável. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Buscando uma explicação para o aumento de expressão de *FOXM1* em CEE, observamos através de análises *in silico* que o promotor do gene *FOXM1* apresenta sítio de ligação para um GDE presente em nossa análise, o gene *ETV5* (Figura 29 A). A variação da expressão destes genes entre a mucosa adjacente e o epitélio tumoral apresentou associação, com r de 0,50 e $p = 0,0006$ (Figura 29 B).

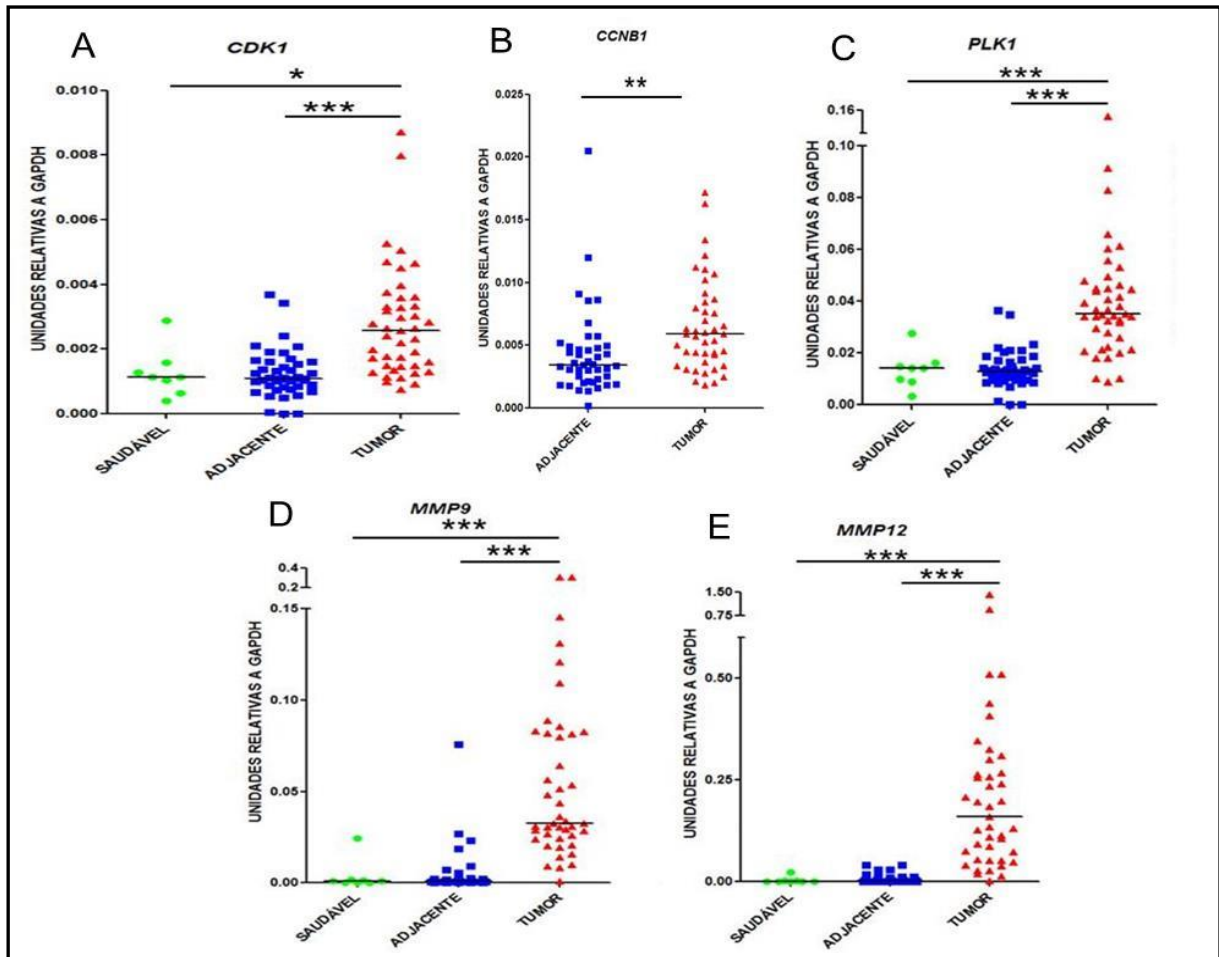
Figura 29 - Associação entre a variação da expressão gênica de *FOXM1* e *ETV5* em CEE. O gene *ETV5* apresentou-se super-expresso no tumor em relação a mucosa adjacente (A) e o aumento de expressão de *FOXM1* foi associada com o aumento da expressão de *ETV5* em amostras de CEE (B)



Legenda: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

Os genes *CDK1*, *CCNB1*, *PLK1*, *MMP9* e *MMP12*, que participam da via de sinalização de *FOXM1*, foram selecionados para avaliação de sua atividade em CEE. Todos esses genes foram selecionados por apresentarem diferença de expressão entre o tumor e a mucosa adjacente na avaliação por microarranjo de DNA e todos tiveram o valor de expressão diferencial comprovada por PCR em tempo real (Figura 30), apresentando-se, assim como *FOXM1*, super-expressos. A análise de expressão de *CCNB1* com amostras de mucosa saudável não foi realizada por falta de material.

Figura 30 - Análise do perfil de expressão gênica de membros da via de *FOXM1* em CEE. O gene *CDK1* apresentou-se super-expresso no CEE em relação a mucosa adjacente e ao tecido saudável (A), enquanto que só foi possível avaliar a presença de diferença de expressão de *CCNB1* entre CEE e mucosa adjacente (B). Os genes *PLK1*, *MMP9* e *MMP12* apresentaram o mesmo perfil de diferença de expressão de *CDK1* (C, D e E respectivamente).



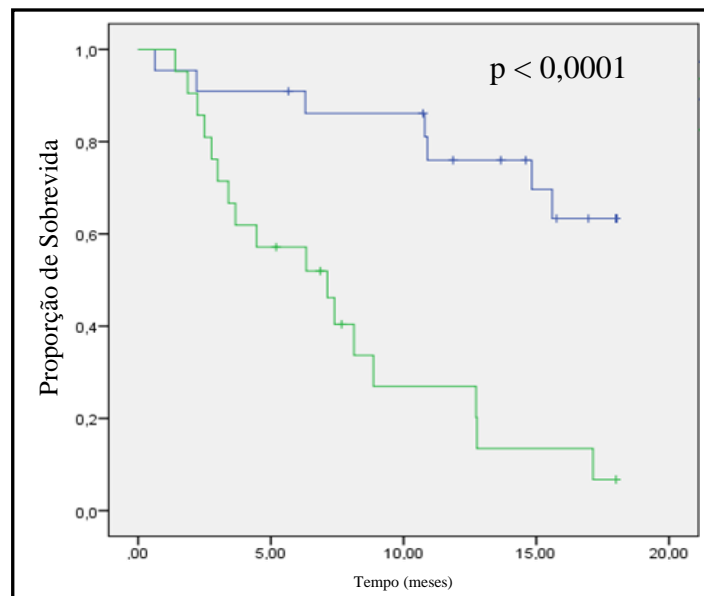
Buscando melhor visualizar a associação entre a expressão dos membros da via de sinalização de *FOXM1*, realizamos análise de correlação e observamos associação positiva entre a expressão desses genes, com exceção de associação entre *ETV5* e *CCNB1* cuja análise mostrou valor de p não significativo (Quadro 12).

Quadro 12 - Matriz de correlação entre a expressão gênica dos genes da via de sinalização de *FOXM1* analisados

	FOXM1	CDK1	CCNB1	PLK1	MMP9	MMP12	ETV5
FOXM1		p < 0.0001	p < 0.01	p < 0.0001	p < 0.001	p < 0.001	p < 0.003
CDK1	r = 0.7		p < 0.0001	p < 0.0001	p < 0.01	p < 0.05	p < 0.05
CCNB1	r = 0.48	r = 0.64		p < 0.0001	p < 0.01	p < 0.001	NS
PLK1	r = 0.61	r = 0.73	r = 0.66		p < 0.0001	p < 0.01	p < 0.05
MMP9	r = 0.5	r = 0.47	r = 0.39	r = 0.57		p < 0.0001	p < 0.002
MMP12	r = 0.46	r = 0.38	r = 0.5	r = 0.47	r = 0.66		p < 0.05
ETV5	r = 0.41	r = 0.36	r = 0.28	r = 0.32	r = 0.46	r = 0.359	

Dentre os alvos de *FOXM1* analisados, a expressão gênica de *MMP12* na mucosa adjacente ao tumor apresentou impacto na sobrevida dos pacientes (Figura 31), sendo pacientes com expressão mais elevada com pior prognóstico (Quadro 13). Para os demais genes não houve impacto de suas expressões na sobrevida dos pacientes com CEE analisados neste estudo.

Figura 31 - Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE separados pelos níveis de expressão gênica de *MMP12* na mucosa adjacente ao tumor



Legenda: Reta Azul – sobrevida de pacientes com tecido adjacente expressando baixos níveis de *MMP12*; Reta verde – sobrevida de pacientes com tecido adjacente expressando altos níveis de *MMP12*.

Quadro 13 - Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando valores da expressão gênica de *MMP12* no tumor e na mucosa adjacente a CEE

Gene	Expressão no Tumor	Tempo de sobrevida				valor de p
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>MMP12</i>	Baixa	11,964	1,455	9,112	14,816	0,356
	Alta	11,002	1,375	8,307	13,696	
Gene	Expressão Tecido Adjacente ao Tumor	Tempo de sobrevida				valor de p
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>MMP12</i>	Baixa	14,856	1,147	12,607	17,104	< 0,0001
	Alta	7,600	1,204	5,241	9,959	

Legenda: Alta expressão – expressão maior que a mediana; Baixa Expressão – expressão menor que a mediana.

Além dos genes selecionados, *CCNB2*, *CDK2*, *AURKA*, *AURKB*, *MMP2*, *BRCA2*, *CDC25B*, *CCL2*, *IL1* e outros alvos de *FOXMI* também foram classificados como GDE em nossa análise randômica, indicando que a sinalização transcricional realizada por *FOXMI* está amplamente ativa em CEE.

3.4. Análise da atividade de *FOXMI* na linhagem de CEE TE1

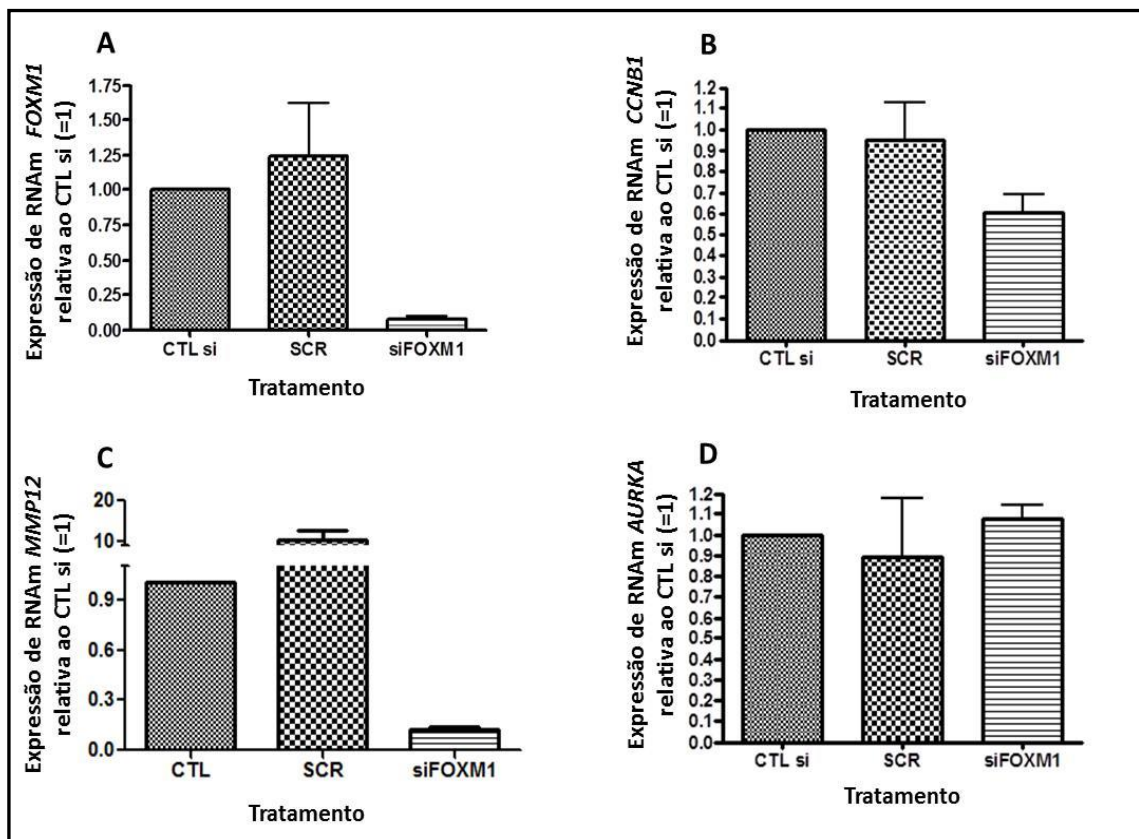
3.4.1. Silenciamento e super-expressão de *FOXMI* utilizando tratamentos com siRNA e vetor de expressão plasmidial, respectivamente

A fim de tentarmos entender melhor o papel da alteração de *FOXMI* para a carcinogênese esofágica, fizemos ensaios *in vitro*, conforme descrito a seguir. O silenciamento de *FOXMI* foi realizado utilizando siRNA contra *FOXMI*. Após transfecção do oligonucleotídeo na linhagem de CEE TE1 foi possível observar que a expressão gênica de *FOXMI* foi diminuída (Figura 32-A), assim como a expressão gênica de *CCNB1* e *MMP12* (Figura 32-B e C respectivamente). Entretanto, os níveis de expressão gênica de *AURKA*, outro alvo de *FOXMI*, não apresentou alteração (Figura 32-D).

A indução da expressão de *FOXMI* na linhagem de CEE TE1 pela técnica de transfecção plasmidial do gene resultou em aumento dose-dependente da expressão de *FOXMI* bastante significativo, conforme demonstra a Figura 33-A. Porém, não observamos

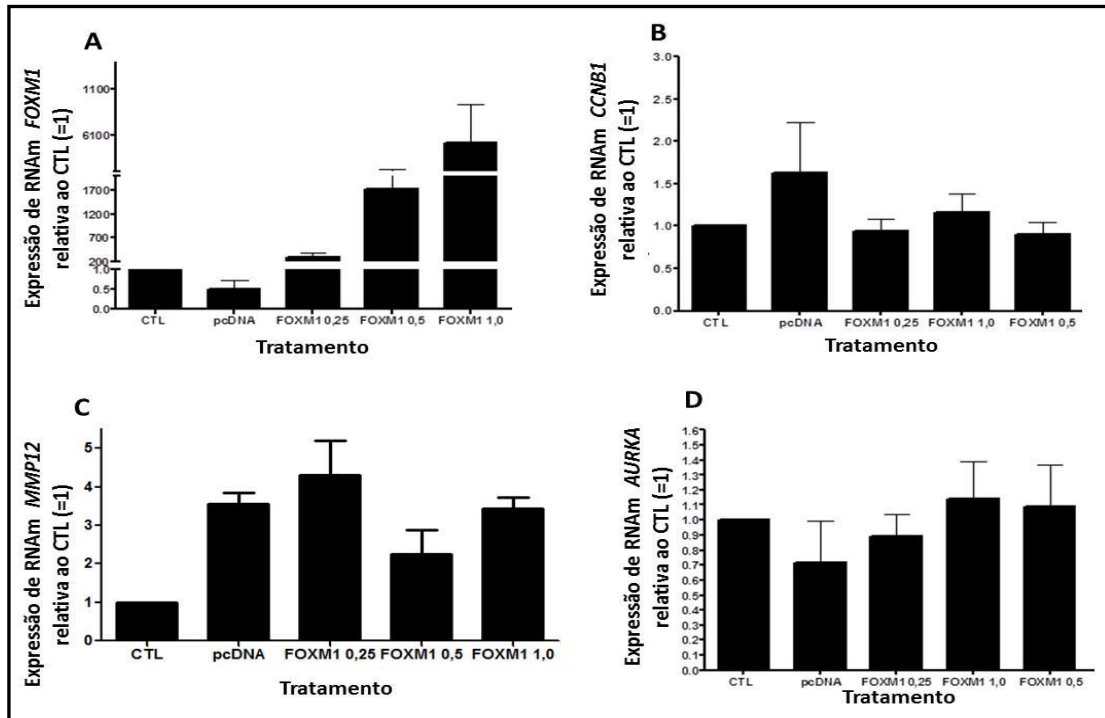
relação entre o aumento da expressão de *FOXM1* e os valores de expressão dos genes alvo analisados, *CCNB1*, *MMP12* e *AURKA* (Figura 33 B-D).

Figura 32 - Expressão de *FOXM1* e de genes alvo na linhagem de CEE TE1 após tratamento com siRNA-*FOXM1*. Foi realizado o silenciamento da expressão de *FOXM1* com siRNA na linhagem TE1 (A) e pode-se observar diminuição da expressão gênica de dois alvos de *FOXM1*, *CCNB1* (B) e *MMP12* (C). Entretanto, não foi observada diferença de expressão de *AURKA* com o silenciamento de *FOXM1* (D).



Legenda: A – análise de expressão de *FOXM1* na linhagem TE1 após tratamento com siRNA-*FOXM1*; B - A – análise de expressão de *CCNB1* na linhagem TE1 após tratamento com siRNA-*FOXM1*; C – análise de expressão de *MMP12* na linhagem TE1 após tratamento com siRNA-*FOXM1*; D – análise de expressão de *AURKA* na linhagem TE1 após tratamento com siRNA-*FOXM1*

Figura 33 - Expressão de *FOXM1* e de genes alvo na linhagem de CEE TE1 após tratamento com vetor de expressão de *FOXM1*. Observa-se o aumento da expressão de *FOXM1* no tratamento da linhagem TE1 com vetor de expressão do gene (A). Entretanto nenhum dos alvos de *FOXM1* analisados apresentaram-se modulados (B-D).



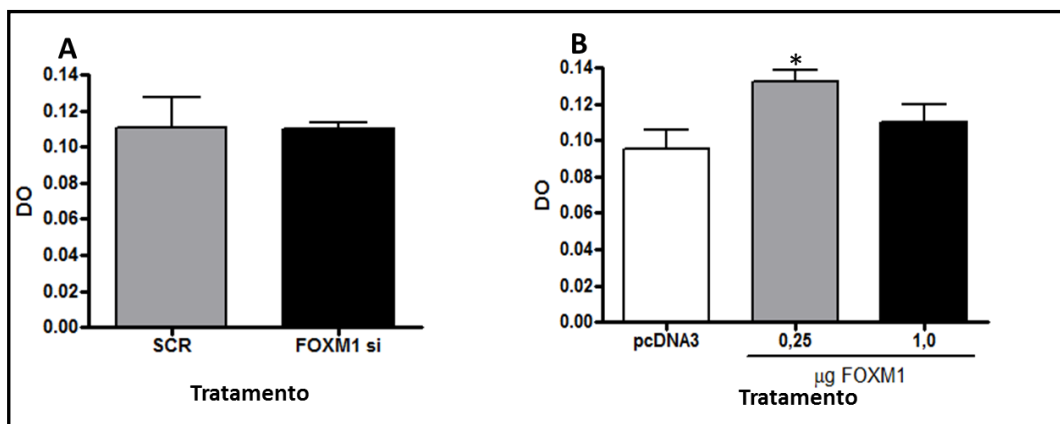
Legenda: A – análise de expressão de *FOXM1* na linhagem TE1 após tratamento com vetor de expressão de *FOXM1*; B – análise de expressão de *CCNB1* na linhagem TE1 após tratamento com vetor de expressão de *FOXM1*; C – análise de expressão de *MMP12* na linhagem TE1 após tratamento com vetor de expressão de *FOXM1*; D – análise de expressão de *AURKA* na linhagem TE1 após tratamento com vetor de expressão de *FOXM1*

3.4.2. Análise de viabilidade celular após tratamento de silenciamento e super-expressão de *FOXM1* na linhagem TE1

Avaliamos a viabilidade celular após os tratamentos da linhagem TE1 através do ensaio de MTT. Não observamos diferença na viabilidade celular entre o *scramble* e células tratadas com siRNA-*FOXM1* (Figura 34–A). Já no tratamento com vetor de expressão, observa-se um aumento na viabilidade celular quando transfectamos 0,25 ug de vetor contendo o gene *FOXM1* em comparação com a transfecção com o vetor pcDNA3 sem o gene

(Figura 34–B). Porém essa diferença de viabilidade não foi observada no tratamento com 1,0 ug do vetor contendo o gene *FOXM1*

Figura 34 - Ensaio de MTT na linhagem de CEE TE1 após tratamentos para silenciamento e super-expressão de *FOXM1*. O tratamento da linhagem TE1 com siRNA-*FOXM1* não influenciou na viabilidade celular (A) enquanto que o tratamento com o vetor de expressão promoveu um aumento da viabilidade na dose de 0,25 ug, mas essa variação na viabilidade não apresentou-se dose-dependente (B)

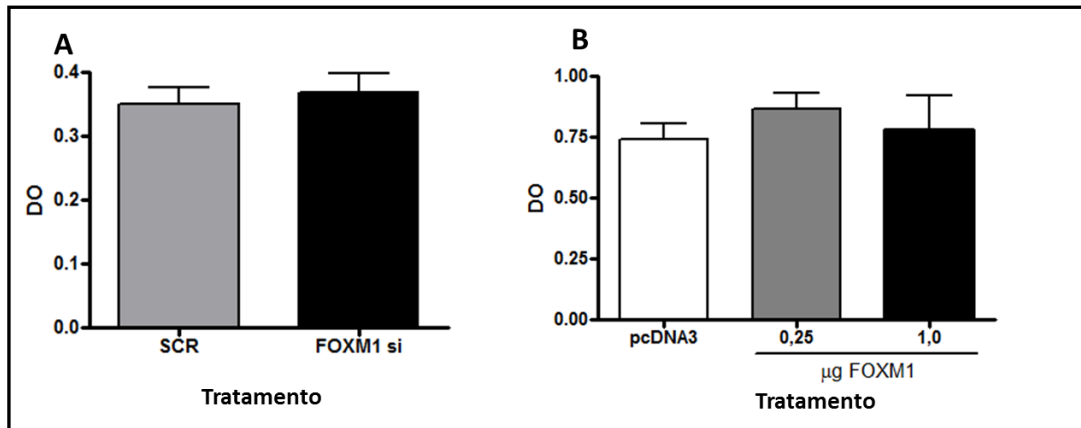


Legenda: A – Tratamento na linhagem de CEE TE1 com siRNA; SCR: *scramble*; B – Tratamento na linhagem de CEE TE1 com plasmídeo de expressão de *FOXM1*; pcDNA3: vetor sem o gene *FOXM1*; DO – densidade ótica; * - $p < 0,05$

3.4.3. Análise de níveis de proliferação celular após tratamento de silenciamento e super-expressão de *FOXM1* na linhagem TE1

As taxas de proliferação celular foram observadas através da incorporação de cristal violeta pelas células após o tratamento de silenciamento e super-expressão de *FOXM1* na linhagem de CEE TE1. Não foi observada diferença nas taxas de proliferação em nenhum tratamento (Figura 35).

Figura 35 - Ensaio de incorporação de cristal violeta na linhagem de CEE TE1 após tratamentos para silenciamento e super-expressão de *FOXM1*. Tanto o tratamento com siRNA-*FOXM1* quanto o com o vetor de expressão pcDNA3-*FOXM1* não influenciaram nas taxas de proliferação celular

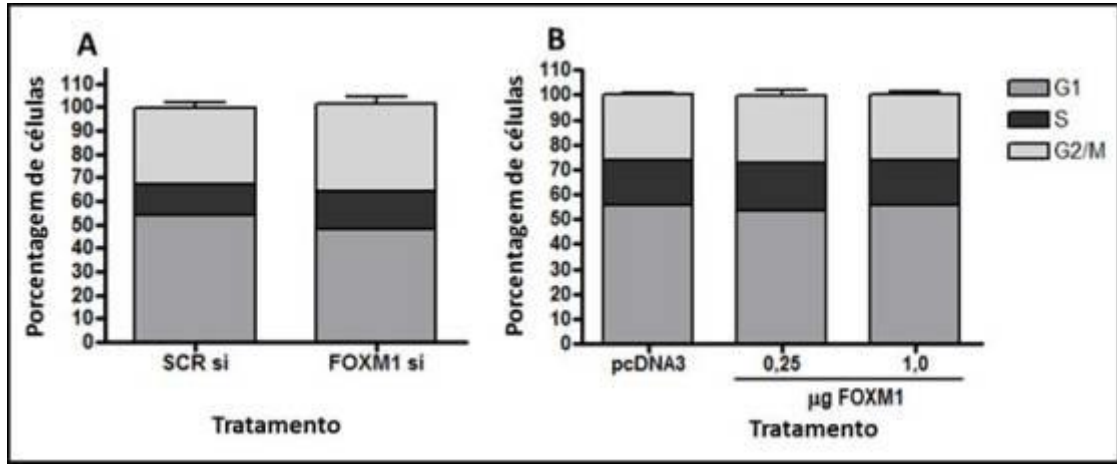


Legenda: A – Tratamento na linhagem de CEE TE1 com siRNA; SCR: *scramble*; B – Tratamento na linhagem de CEE TE1 com plasmídeo de expressão de *FOXM1*; pcDNA3: vetor sem o gene *FOXM1*; DO – densidade ótica.

3.4.4. Análise de fase do ciclo celular

A avaliação da fase do ciclo celular por incorporação de iodeto de propídeo não apresentou diferenças após o tratamento de silenciamento e super-expressão de *FOXM1* na linhagem de CEE TE1, indicando que nesta linhagem modulação na expressão de *FOXM1* não altera o controle do ciclo celular (Figura 36).

Figura 36 - Avaliação da fase do ciclo celular de células da linhagem de CEE TE1 após tratamento de silenciamento e super-expressão de *FOXM1*. Tanto o tratamento com siRNA-*FOXM1* quanto o com o vetor de expressão pcDNA3-*FOXM1* não influenciaram, com significância estatística, na porcentagem de células em cada fase do ciclo celular.



Legenda: A – Tratamento na linhagem de CEE TE1 com siRNA; SCR: *scramble*; B – Tratamento na linhagem de CEE TE1 com plasmídeo de expressão de *FOXM1*; pcDNA3: vetor sem o gene *FOXM1*.

3.5. Análise da expressão gênica de fosfoinositídeo 3 quinase – subunidade regulatória gama (*PI3KR3*) e da proteína quinase AKT3 (*AKT3*) e do gene da proteína transdutora de sinal e ativadora da transcrição 3 (*STAT3*) em CEE

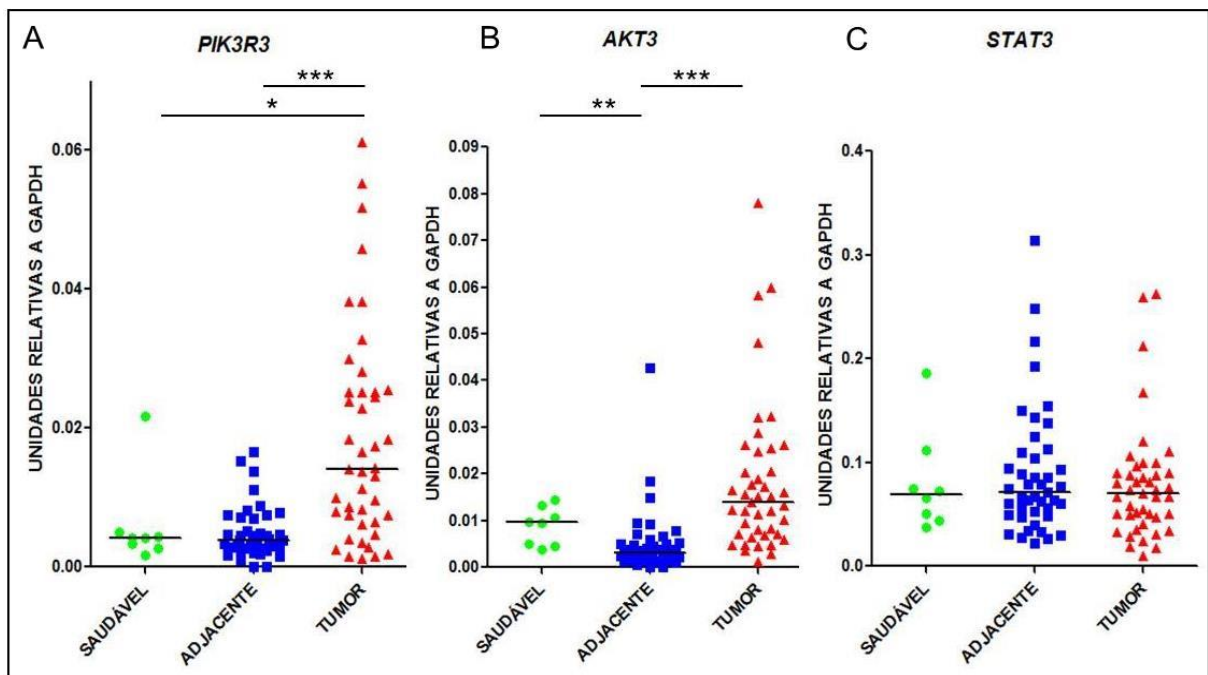
Os níveis de expressão de *PI3KR3* apresentaram-se distintos entre o tecido tumoral e a mucosa adjacente ao tumor na análise de microarranjo de DNA, onde a mediana de expressão deste gene no tumor foi 2,83 vezes maior que no tecido adjacente. Esse resultado foi corroborado pela análise por PCRq, onde foi observado uma mediana de aumento de expressão na mucosa tumoral de 3,39 vezes. Apesar de não termos observado diferença de expressão de *PI3KR3* entre CEE e a mucosa esofágica saudável na análise de microarranjo, observamos pela técnica de PCRq que *PI3KR3* apresenta mediana de expressão 3,36 maior em CEE em relação a mucosa saudável (Figura 37-A).

Com relação à expressão de *AKT3*, foi observado um aumento de expressão de 3,66 vezes no tumor em relação à mucosa adjacente no microarranjo de DNA enquanto que a mediana de aumento de expressão utilizando a técnica de PCR em tempo real foi de 3,25

vezes. Em relação ao tecido saudável, a expressão de *AKT3* mostrou-se aumentada no tumor somente pela técnica de PCR em tempo real (Figura 37-B). Já o terceiro membro dessa via analisado, *STAT3*, não apresentou diferença de expressão em nenhuma das técnicas entre os diferentes grupos de amostras (Figura 37-C).

Além disso, foi realizada uma análise de associação entre a expressão gênica de *PI3KR3*, *AKT3* e *STAT3* e a sobrevida dos pacientes de CEE, com valores ajustados por idade e estadiamento do tumor e não foi observada significância estatística (Quadro 14).

Figura 37 - Análise da expressão gênica de *PI3KR3* (A) *AKT3* (B) e *STAT3* (C) entre amostras de CEE, tecido não tumoral adjacente ao tumor e tecido epitelial esofágico saudável. Observa-se diferença de expressão de *PI3KR3* entre CEE e mucosa adjacente e CEE e mucosa saudável (A). A expressão de *AKT3* apresenta-se aumentada nos tumores em relação a mucosa adjacente e super-expressa na mucosa saudável também em relação a mucosa adjacente ao tumor (B). Não foi observado diferença de expressão de *STAT3* entre os tecidos (C).



Legenda: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$

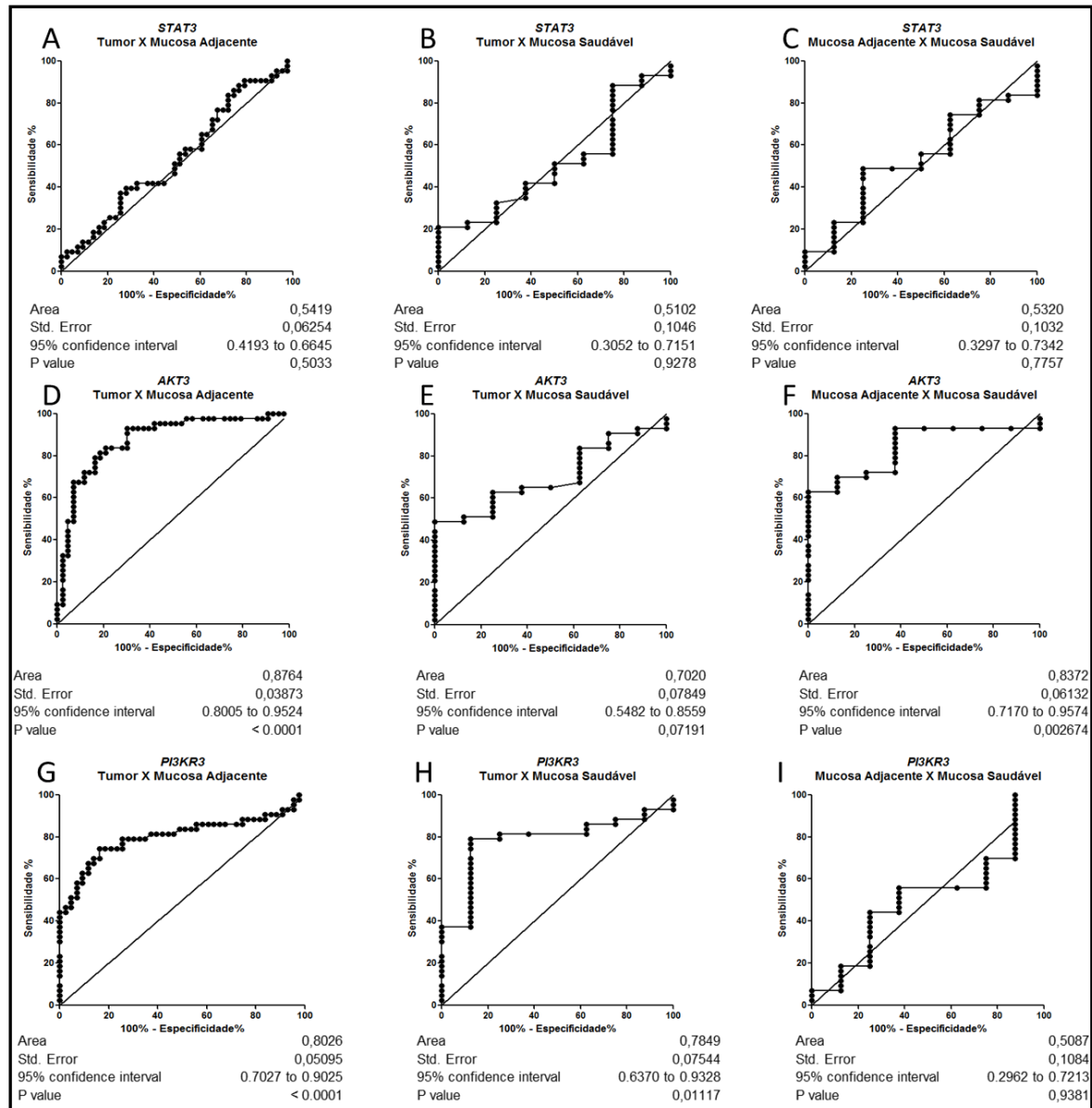
Quadro 14 - Análise de sobrevida univariada ajustada por idade e estadiamento da influência da expressão gênica de *PI3KR3*, *AKT3* e *STAT3* no tumor e na mucosa adjacente na sobrevida dos pacientes de CEE.

Gene	Expressão no Tumor	Tempo de sobrevida			valor de p	
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>PI3KR3</i>	Baixa	12,54	1,489	9,627	15,462	0,335
	Alta	10,65	1,338	8,022	13,268	
<i>AKT3</i>	Baixa	12,471	1,477	9,577	15,365	0,440
	Alta	10,583	1,336	7,963	13,202	
<i>STAT3</i>	Baixa	12,329	1,407	9,572	15,086	0,648
	Alta	10,624	1,409	7,863	13,385	
Gene	Expressão Tecido Adjacente ao Tumor	Tempo de sobrevida			Log Rank*	
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>PI3KR3</i>	Baixa	13,03	1,386	10,314	15,746	0,389
	Alta	9,891	1,354	7,237	12,545	
<i>AKT3</i>	Baixa	12,408	1,297	9,866	14,951	0,65
	Alta	10,462	1,515	7,492	13,432	
<i>STAT3</i>	Baixa	13,237	1,276	10,735	15,739	0,198
	Alta	9,62	1,463	6,751	12,488	

Legenda: Alta expressão – expressão maior que a mediana; Baixa Expressão – expressão menor que a mediana.

Além disso, foi analisado o valor preditivo de alterações histológicas no epitélio esofágico utilizando o valor de expressão de *PI3KR3*, *AKT3* e *STAT3*, através de curva ROC (“Receiver Operating Characteristic”). Nesta análise observamos que a expressão de *PI3KR3* pode ser usada para distinguir a mucosa tumoral da mucosa adjacente (sensibilidade de 80%) e da mucosa saudável (sensibilidade de 78%). A expressão de *AKT3* também é capaz de distinguir tumor e mucosa adjacente (sensibilidade de 87%) e foi capaz de identificar a mucosa adjacente ao tumor em comparação com o epitélio saudável com sensibilidade de 93%. Já a expressão de *STAT3* não apresentou valor preditivo de diagnóstico de alterações histológicas na mucosa esofágica (Figura 38).

Figura 38 - Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre epitélio tumoral, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável utilizando como base valores de expressão dos genes *STAT3*, *PI3KR3* e *AKT3*



Legenda: A – curva ROC utilizando expressão de *STAT3* para discriminar CEE de mucosa adjacente; B – curva ROC utilizando expressão de *STAT3* para discriminar CEE de mucosa saudável; C – curva ROC utilizando expressão de *STAT3* para discriminar mucosa adjacente de mucosa saudável; D – curva ROC utilizando expressão de *AKT3* para discriminar CEE de mucosa adjacente; E – curva ROC utilizando expressão de *AKT3* para discriminar CEE de mucosa saudável; F – curva ROC utilizando expressão de *AKT3* para discriminar mucosa adjacente de mucosa saudável; G – curva ROC utilizando expressão de *PI3KR3* para discriminar CEE de mucosa adjacente; H – curva ROC utilizando expressão de *PI3KR3* para discriminar CEE de mucosa saudável; I – curva ROC utilizando expressão de *PI3KR3* para discriminar mucosa adjacente de mucosa saudável;

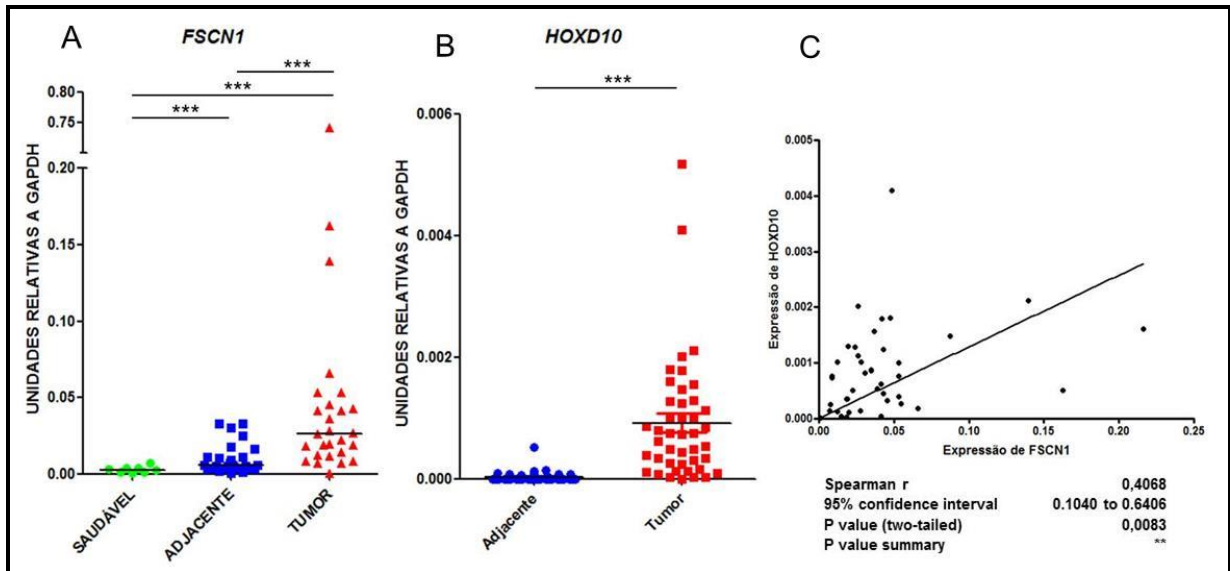
3.6. Análise da expressão gênica de *FSCN1* (“*Fascin1*”) e de *HOXD10* (“*Homeobox D10*”) em CEE

A expressão de *FSCN1* apresentou perfil diferencial na comparação entre tumor e mucosa adjacente e entre mucosa adjacente e mucosa esofágica saudável, sugerindo que alterações na expressão deste gene sejam eventos iniciais na carcinogênese esofágica. Através de PCR em tempo real, validamos este resultado, observando que o *FSCN1* apresenta mediana de aumento de expressão no tumor em relação à mucosa adjacente de 4 vezes e deste último em relação a mucosa saudável de 2,8 vezes (Figura 39-A).

Através de análises *in silico*, foi observado que o promotor do gene *FSCN1* apresenta sítio de ligação para um GDE presente em nossa análise, o fator de transcrição *HOXD10* (Figura 39-B). O resultado do teste de correlação entre a expressão destes dois genes apresentou associação com $r = 0,40$ e $p < 0,0001$, indicando que a expressão dos dois genes pode estar relacionada entre si na carcinogênese esofágica (Figura 39-C).

A análise de sobrevivência univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando a expressão dos genes *FSCN1* e *HOXD10* mostrou que a expressão elevada de *FSCN1* no tecido adjacente ao CEE é fator independente de prognóstico ($p < 0,001$) (Quadro 15) (Figura 40).

Figura 39 - Análise da expressão gênica de *FSCN1* e de *HOXD10* entre amostras de CEE, tecido pareado adjacente ao tumor e tecido epitelial esofágico saudável e associação entre a expressão gênica destes dois genes. Observa-se diferença de expressão de *FSCN1* entre CEE e mucosa adjacente, entre CEE e mucosa saudável e entre mucosa adjacente ao tumor e mucosa saudável (A). A expressão de *HOXD10* apresenta-se aumentada nos tumores em relação à mucosa adjacente (B). A expressão de *FSCN1* foi associada com a expressão de *HOXD10* em amostras de CEE (C).



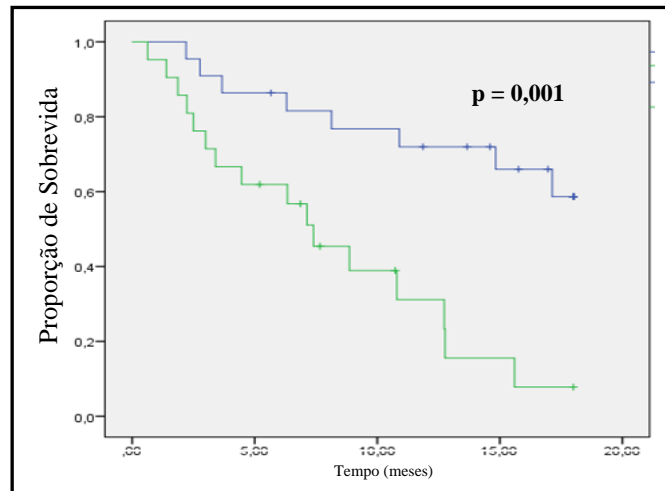
Legenda: A – Análise da expressão gênica de *FSCN1* em CEE, tecido adjacente ao tumor e amostras saudáveis; B – Análise da expressão gênica de *HOXD10* em CEE e tecido adjacente ao tumor; C – Associação entre a expressão gênica de *FSCN1* e *HOXD10* em CEE. ***: $p < 0,0001$

Quadro 15 - Análise de sobrevivência univariada ajustada por idade e estadiamento utilizando valores da expressão gênica de *FSCN1* e *HOXD10* no tumor e na mucosa adjacente a CEE

Gene	Expressão no Tumor	Tempo de sobrevivência				valor de p
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>FSCN1</i>	Baixa	12,68	1,30	10,12	15,23	0,12
	Alta	10,13	1,48	7,24	13,02	
<i>HOXD10</i>	Baixa	11,51	1,41	8,76	14,27	0,692
	Alta	11,41	1,44	8,59	14,23	
Gene	Expressão Tecido Adjacente ao Tumor	Tempo de sobrevivência				valor de p
		Media (meses)	DP	IC 95%		
<i>FSCN1</i>	Baixa	14,31	1,22	11,92	16,70	0,001
	Alta	8,10	1,23	5,68	10,51	
<i>HOXD10</i>	Baixa	11,44	1,34	8,82	14,07	0,858
	Alta	11,58	1,51	8,62	14,54	

Legenda: Alta expressão – expressão maior que a mediana; Baixa Expressão – expressão menor que a mediana.

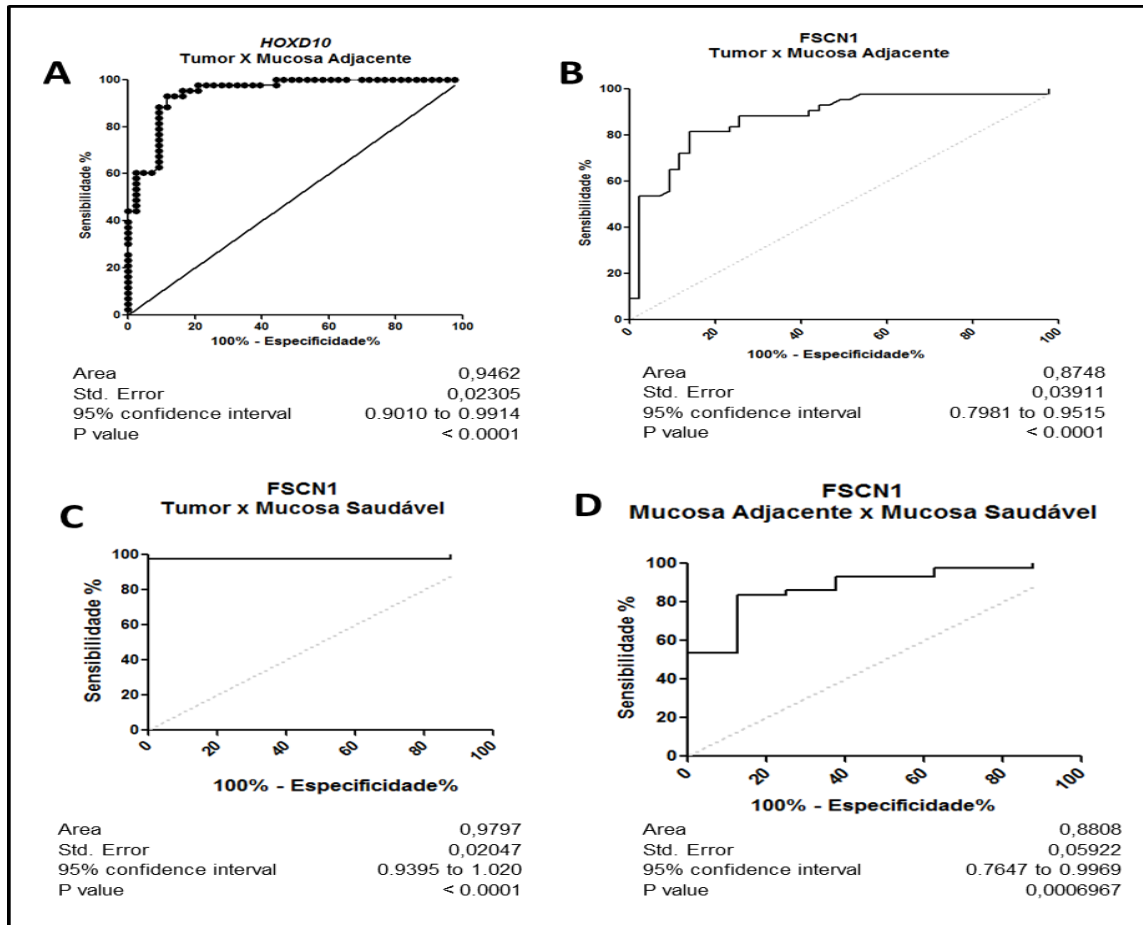
Figura 40 - Curva de Kaplan-Meier apresentando a sobrevida dos pacientes com CEE separados pelos níveis de expressão gênica de *FSCN1* na mucosa adjacente ao tumor. Pacientes com expressão de *FSCN1* maior que a mediana de expressão na mucosa adjacente ao tumor apresentaram sobrevida menor que os pacientes com expressão menor que a mediana.



Legenda: Reta Azul – sobrevida de pacientes com tecido adjacente expressando baixos níveis de *FSCN1*; Reta verde – sobrevida de pacientes com tecido adjacente expressando altos níveis de *FSCN1*. p = valor de p

Através da curva ROC analisamos o poder de identificação de alterações no epitélio esofágico utilizando como elemento discriminativo a expressão dos genes *FSCN1* e *HOXD10*. A expressão gênica de *HOXD10* apresentou elevado poder de identificação da mucosa tumoral contra a mucosa normal adjacente, com sensibilidade de 94%. Já a expressão de *FSCN1* foi capaz de diferenciar o tecido tumoral da mucosa adjacente (sensibilidade de 87%) e da mucosa saudável (97% de sensibilidade) e também distinguir mucosa saudável da adjacente à CEE com sensibilidade de 88% (Figura 41).

Figura 41 - Curva ROC exibindo o poder discriminativo entre epitélio tumoral, mucosa adjacente ao tumor e mucosa esofágica saudável utilizando como base valores de expressão dos genes *FSCN1* e *HOXD10*.



Legenda: A – Curva ROC curva ROC utilizando expressão de *HOXD10* para discriminar CEE de mucosa adjacente; B – curva ROC utilizando expressão de *FSCN1* para discriminar CEE de mucosa adjacente; C – curva ROC utilizando expressão de *FSCN1* para discriminar CEE de mucosa saudável; D – curva ROC utilizando expressão de *FSCN1* para discriminar mucosa adjacente de mucosa saudável;

4. DISCUSSÃO

Metástase e invasão de órgãos vizinhos são as principais variáveis para o mau prognóstico da CEE. Até o momento, o sistema de estadiamento do tumor (TNM) ainda é o principal método para determinar a extensão do câncer e o prognóstico dos pacientes. No entanto, devido à existência de micrometástases indetectáveis e baixa sensibilidade nos exames de imagem, este sistema nem sempre prevê o prognóstico com precisão. Mesmo quando o estadiamento é feito de forma precisa, pacientes com o mesmo estadiamento apresentam resposta ao tratamento e sobrevida bastante diferentes entre si. Portanto, encontrar e identificar novos marcadores moleculares relacionados ao prognóstico dos pacientes é um método promissor para alcançar as previsões de resultados clínicos mais precisos e opções de tratamento para CEE (Guo e Jiang, 2009).

Análises randômicas de larga escala figuram no campo da ciência como importantes ferramentas para aumentar o conhecimento e melhorar o tratamento aos pacientes oncológicos (Garraway et al, 2005; Amaratunga *et al.*, 2007). Tumores como o de mama obtiveram grandes avanços no prognóstico dos pacientes com a inovação no campo tecnológico de análises moleculares (Perou et al, 2000; Sorlie et al, 2003;). Consórcios internacionais realizam pesquisas em grandes centros a fim de encontrar marcadores moleculares de carcinogênese e novos alvos para terapias, uma vez que a heterogeneidade tumoral apresenta-se como fator determinante às metodologias de tratamento empregadas atualmente (Pilarsky *et al.*, 2014).

A metodologia de avaliação de expressão gênica global mais empregada atualmente em pesquisa em câncer é o microarranjo de DNA. Com a possibilidade de avaliar mais de 22 mil genes, splicing alternativos, RNAs não codificantes e microRNAs a partir de uma quantidade pequena de RNA, esta técnica apresenta grande potencial para descrever quais vias de sinalização celular estão ativas em determinado tumor e o perfil de expressão gênica seja entre o tumor e a mucosa adjacente ou contra uma mucosa saudável livre de doença. Inclusive, podendo ser empregada em tecidos com alterações pré-neoplásicas, identificando assim eventos precoces na carcinogênese (Hamaratunga *et al.*, 2014).

Em nosso trabalho analisamos a expressão gênica global pela técnica de microarranjo de DNA em 15 pares de amostras (CEE e mucosa não-tumoral adjacente ao tumor) e 5 amostras de mucosa esofágica livre de doença de doadores sem histórico de câncer ou doenças hepáticas relacionadas ao etilismo. A plataforma *Affymetrix* foi selecionada para este

estudo e utilizamos o chip *Human Exon 1.0 ST*, composto por mais de 1,4 milhões de sondas, com mais de um milhão relacionadas a cobertura de análise de expressão gênica e as demais relacionadas a normalização e correção de background das análises (www.affymetrix.com).

Na análise de comparação do perfil de expressão gênica entre CEE e mucosa pareada adjacente ao tumor, observamos que 1064 genes se apresentavam diferencialmente expressos, sendo 794 super-expressos no tumor e 270 sub-expressos. As principais vias enriquecidas na plataforma Gene Ontology dentre os genes super-expressos foram as relacionadas ao controle do ciclo celular, controle da replicação do DNA, alteração do metabolismo e manutenção da integridade do DNA. Já na análise de comparação do perfil de expressão gênica entre CEE e mucosa esofágica saudável encontramos 535 GDE, sendo 437 super-expressos e 98 sub-regulados no tumor em relação à mucosa saudável. O enriquecimento de vias resultou em processos biológicos relacionados principalmente ao metabolismo de carboidratos, indução a apoptose e organização de citoesqueleto.

Apesar do tecido adjacente ao tumor ser classificado histologicamente como normal, ele apresentou diferenças de expressão global em relação à mucosa saudável de pacientes sem histórico de câncer. Este dado ressalta o conceito de campo de cancerização presente em tumores do trato aero-digestivo superior. Apesar de somente 27 sondas com anotação no ENTREZ ID (NCBI) apresentarem-se como GDE, é possível observar pela análise de componente principal uma separação em dois grupos de amostras quando utilizados todos os valores de expressão (Figura 21). Infelizmente, devido ao número pequeno de genes não é possível realizar um enriquecimento em vias de sinalização celular utilizando os mesmos critérios estatísticos das análises mencionadas anteriormente.

Até a presente data, somente 35 trabalhos haviam sido publicados empregando a técnica de microarranjo de DNA na pesquisa em CEE, comparando tecido tumoral com mucosa adjacente ou livre de doença. Dentre esses trabalhos, somente três realizaram análises com amostras ocidentais (Alemanha, Estados Unidos e Austrália). Este fato somente evidencia o quão distante ainda estamos de entender a carcinogênese esofágica provocada pelo consumo elevado de bebidas alcoólicas e tabagismo, uma vez que em países orientais os principais fatores etiológicos relacionados ao CEE são consumo de bebidas quentes, uso de "betel quid" e consumo de ópio. Dentre os 35 trabalhos nenhum utilizou um chip com densidade analítica semelhante ao *Human Exon 1.0 ST*.

Utilizando um chip de microarranjo de DNA com cobertura inferior a quatro mil genes, Makino e colaboradores (2005) descreveram o gene *TCEAL1* como diferencialmente expresso em CEE em pacientes japoneses. Em nossa análise em larga escala este gene não se

apresenta diferencialmente expresso entre CEE e mucosa adjacente. Esses resultados podem ser explicados devido a etiologias distintas do CEE nas duas populações. Chattopadhyay e colaboradores em 2009 realizaram um trabalho visando identificar GDE relacionados ao câncer esofágico familiar na população indiana. Para tanto, utilizaram o *chip 10k cDNA array* (UHN, Canada), com aproximadamente 10 mil sondas, e observaram 350 GDE. Após validação da técnica através da análise de expressão de 5 genes por PCRq e 4 por TMA (*tissue microarray*) os autores discutem que os genes e proteínas selecionados não foram suficientes para traçar um perfil de alterações moleculares em câncer de esôfago familiar, havendo a necessidade de uma análise mais complexa para tanto.

Em 2011, Su e colaboradores propuseram a determinação do perfil de expressão gênica global de CEE e associação com fenótipos clínicos em pacientes chineses. Para isso, utilizaram a plataforma *Affymetrix*, utilizando dois tipos de chips, um com leitura em duas cores U133A/B e o outro o 8K cDNA, com densidade analítica até 39 mil transcritos em 45 mil sondas. Este protocolo, entretanto, utiliza 8 µg de cada RNA por reação enquanto que o empregado nesta tese usa apenas 100 ng de RNA. Neste trabalho foram encontrados 159 GDE entre 51 pares de amostras de CEE e mucosa não-tumoral adjacente ao tumor, compreendendo genes envolvidos na replicação do DNA, na regulação do ciclo celular no crescimento celular.

Em 2012, Yan e colaboradores propuseram a identificação de marcadores moleculares para CEE e de alvos terapêuticos no tratamento de CEE. Utilizaram a microdissecação para obter somente células tumorais ou normais de pacientes chineses nas análises de microarranjo de DNA. Após a extração de RNA existiu a necessidade de amplificar o material obtido, criando uma nova etapa na análise randômica. O chip utilizado foi o *U133A 2.0 Genechip* (*Affymetrix*), capaz de analisar 14.500 genes humanos. Processos biológicos relacionados ao reparo de DNA, a sinalização de *TP53*, a regulação do ciclo e outros foram enriquecidos na plataforma *Gene Ontology*, havendo grande similaridade com nosso estudo, porém sem estabelecer ou identificar possíveis marcadores moleculares da carcinogênese esofágica ou possíveis alvos terapêuticos.

Recentemente, Dadkhah e colaboradores realizaram em 2013 uma análise de expressão gênica em pacientes iranianos com CEE. Utilizaram um chip com cobertura de 440 genes relacionados com carcinogênese e 5 pares de amostras de tumor e mucosa adjacente. Identificaram 179 GDE, sendo estes genes relacionados a resposta imune, metástase e reparo de DNA.

Outro trabalho recente (Sudo *et al.*, 2013) analisou por microarranjo 77 biópsias de CEE e 10 amostras saudáveis de pacientes japoneses utilizando a plataforma *Agilent Human Oligo Genome Microarray kit*, com densidade de aproximadamente 37 mil sondas relacionadas a genes humanos. Neste trabalho os autores selecionam a vimentina e fibronectina 1 como importantes marcadores da transição epitélio-mesenquima em CEE. Estes dois genes também encontram-se super-expressos em nossa análise, apresentando-se assim como prováveis marcadores de alterações epiteliais em tumores esofágicos independente dos fatores etiológicos. Outro gene identificado como marcador da transição epitélio-mesenquima em pacientes de CEE da Alemanha foi o gene *WDR66* (Wang *et al.*, 2013) . Os autores utilizaram amostras não pareadas de CEE e mucosa saudável e realizaram a análise rândomica de expressão genica utilizando o chip *HumanGene ST*, (*Affymetrix*) que foi lançado no mercado anteriormente ao utilizado nesta tese. A alta expressão de *WDR66* foi associada a um pior prognóstico dos pacientes, aumentando o risco de morte. Este gene também se apresenta super-expresso em nossa análise, evidenciando sua importância na carcinogênese esofágica.

Essa revisão de trabalhos visou apresentar que a maioria dos dados obtidos em trabalhos que utilizaram chips de microarranjo de DNA com densidade analítica inferior ao empregado neste projeto tiveram seus resultados corroborados em nosso estudo, mas a extensa lista de informações presentes em nossa análise poderá auxiliar na compreensão das bases moleculares envolvidas no processo de carcinogênese esofágica e propor alvos para biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

4.1 Avaliação da via de FOXM1 em CEE

Após a clusterização hierárquica bayesiana realizada com os valores de GDE, obtidos através da análise de microarranjo de DNA, entre amostras de CEE e mucosa adjacente ao tumor, observamos que grande parte dos processos biológicos enriquecidos na plataforma *Gene Ontology* foram relacionados ao controle do ciclo celular, controle da divisão celular e integridade do DNA.

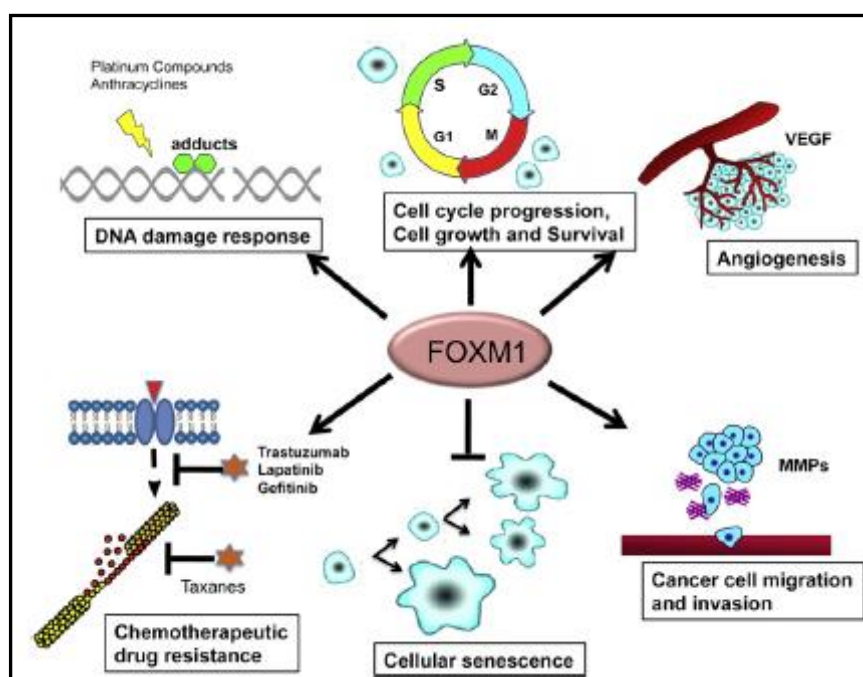
O fator de transcrição FOXM1 – previamente conhecido como HFH-11, MPP2, Win, Trident e FKHL16 - pertence à família Fox e é encontrado expresso em células proliferativas de mamíferos e linhagens celulares tumorais, mas não em tecidos normais totalmente diferenciados (Korver *et al.*, 1997). A expressão de FOXM1 é induzida na fase G1 do ciclo

celular, permanece durante a fase S e atinge seus níveis máximos na fase G2/M (Leung *et al.*, 2001), quando é degradada pela APC (complexo promotor da anáfase) via ubiquitinação (Park *et al.*, 2008). A FOXM1 se encontra predominantemente no citoplasma durante as fases G1 e S, porém é fosforilada e translocada para o núcleo antes da entrada em G2 e M, evento que depende de ativação por complexos ciclina/CDK (Major *et al.*, 2004) e pela via de sinalização RAF/MEK/MAPK (Ma *et al.*, 2005). A superexpressão de FOXM1 já foi observada em diversas neoplasias, como carcinoma hepatocelular (Lee *et al.*, 2004), câncer pancreático (Wang *et al.*, 2007), colorretal (Douard *et al.*, 2006), glioblastoma (Liu *et al.*, 2006), leucemia mielóide aguda (Nakamura *et al.*, 2010), câncer de laringe (Jiang *et al.*, 2011) sugerindo que terapias visando a sua inibição possam apresentar algum impacto no tratamento do câncer (Radhakrishnan *et al.*, 2006). De maneira consistente, resultados obtidos a partir de uma análise de microarranjo mostraram que FOXM1 é um dos genes mais comumente super-expressos na maioria dos tumores sólidos (Pilarsky *et al.*, 2004).

A principal função de FOXM1 é a regulação transcricional da expressão gênica de proteínas reguladoras do ciclo celular, essenciais para a progressão para as fases G1/S e G2/M e manutenção da integridade genômica (Wang *et al.*, 2005). Dentre os genes-alvo para FOXM1 mais conhecidos, se encontram moléculas promotoras da fase S como *CDC25*, inibidores de CDKs, como *P21CIP1* e *P27KIP1* (regulação negativa) e reguladores mitóticos como *AURORA B QUINASE*, *CENPA* (proteína associada ao centrômero A), *CENPB*, *PLK1* (*Polo-like kinase 1*), *SURVIVINA* (Wang *et al.*, 2005) e *CICLINA B1* (Leung *et al.*, 2001) (Figura 42).

Visto que FOXM1 é requerida para a viabilidade e progressão no ciclo celular, células depletadas para esse fator de transcrição apresentam uma formação do fuso mitótico aberrante, com conseqüente catástrofe mitótica e poliploidia (Wonsey e Follettie, 2005). Trabalhos mais recentes mostram que FOXM1 está envolvida não apenas na proliferação celular, mas também em outros aspectos da oncogênese, como o aparecimento de metástase (Raychaudhuri e Park, 2011). Foi demonstrado que FOXM1 estimula invasão e angiogênese em células tumorais através da indução de metaloproteinases de matrix e VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e a inibição de sua expressão é capaz de inibir esses processos (Ahmad *et al.*, 2010). Halasi e Gater (2013) correlacionaram a atividade de FOXM1 com os pontos cruciais para a carcinogênese propostos por Hanahan e Weinberg (2000) conforme ilustrado na figura 43. Pode-se observar que em todas as etapas existe uma provável atuação direta ou indireta de FOXM1.

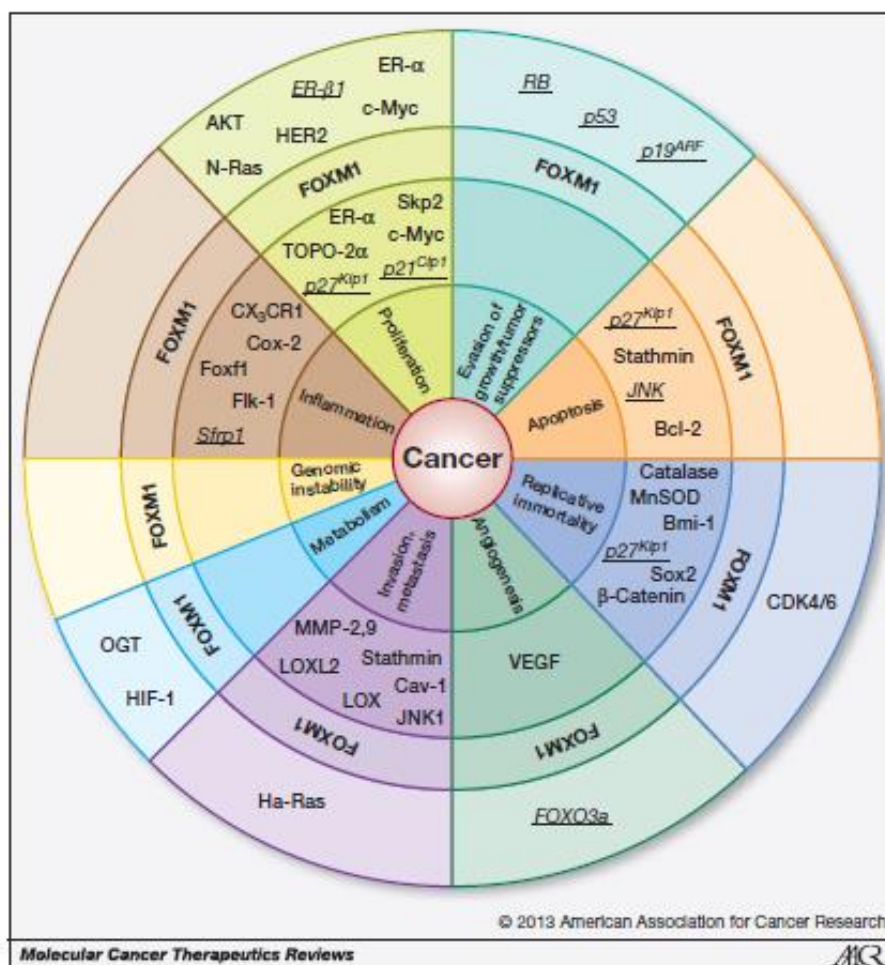
Figura 42 - Representação esquemática da atuação de FOXM1 na carcinogênese. FOXM1 regula uma variedade de processos biológicos em células de mamíferos através da transcrição de genes importantes para a progressão do ciclo celular, proliferação celular, sobrevivência, diferenciação celular, reparação de danos do DNA, angiogênese, migração celular e a resposta à drogas quimioterapêuticas.



Fonte: Koo *et al.*, 2012

A atuação de FOXM1 no desenvolvimento e na progressão da câncer de pulmão foi descrita por Yang e colaboradores (2008). Este estudo mostrou que FOXM1 foi capaz de identificar um subconjunto de tumores de pulmão associados com características patológicas avançadas e um curso clínico agressivo. Os autores ainda sugeriram que as estratégias para reduzir a expressão FOXM1 possa representar uma abordagem terapêutica valiosa para o tratamento de tumores de pulmão.

Figura 43 - Atuação de FOXM1 nas etapas cruciais da carcinogênese



Legenda: Negativo (em itálico e sublinhado) e positivo (em negrito) alvos a jusante ou a montante de reguladores FOXM1 são mostrados.

Fonte: Halasi e Gartel, 2013.

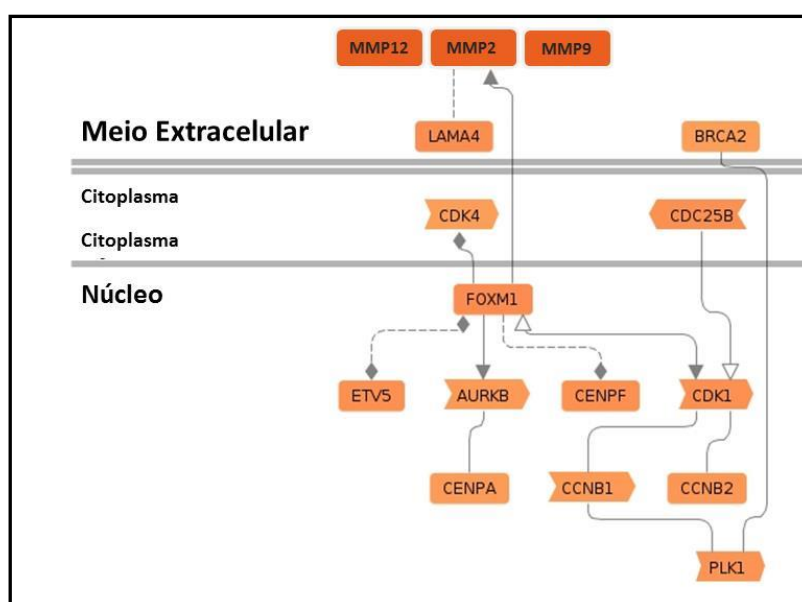
Dibb e colaboradores (2012) descreveram a regulação positiva de FOXM1 e PLK1 em adenocarcinoma de esôfago (ADE), havendo uma co-expressão dos genes, provavelmente devido ao fato de FOXM1 regular a expressão de *PLK1*. Por fim, descrevem que FOXM1 pode ser utilizado como marcador molecular de ADE e se mostra um forte candidato a marcador de prognóstico.

Com relação a atividade de FOXM1 em CEE, Hui e colaboradores (2012) avaliaram por imunohistoquímica a expressão proteica deste fator de transcrição em amostras de CEE e mucosa adjacente. Foi observado que baixos níveis de FOXM1 citoplasmático foi correlacionado com a fase inicial da carcinogênese esofágica e que a expressão nuclear de

FOXM1 foi mais frequente em pacientes com idade inferior a 45 anos. Os autores concluíram que FOXM1 é um potencial biomarcador de diagnóstico de CEE.

Em nossa análise, *FOXM1* mostrou-se diferencialmente expresso, sendo super-expresso em CEE em relação a mucosa adjacente e a mucosa saudável. Além de *FOXM1*, membros da via de sinalização deste fator de transcrição acompanharam o mesmo perfil de expressão (Figura 44).

Figura 44 - Genes diferencialmente expressos em CEE enriquecidos na via de *FOXM1* identificados pela técnica de microarranjo de DNA



Fonte: Plataforma Genomatix

Além de alteração no perfil de expressão gênica, a expressão de *FOXM1* apresentou alta sensibilidade e especificidade (88% e 89% respectivamente) na identificação de CEE contra mucosa adjacente, através de curva ROC. Também foi observado elevada sensibilidade de detecção de CEE em relação a mucosas saudáveis (sensibilidade de 79% e especificidade de 75%).

Os cinco alvos de FOXM1 analisados neste projeto (*CDK1*, *CCNB1*, *PLK1*, *MMP9* e *MMP12*) apresentaram-se super-expressos em CEE. Também observamos associação entre a expressão de *FOXM1* e dos genes alvo (Quadro 12) Este fato evidencia que *FOXM1* além de super-expresso em CEE tem sua via de sinalização ativa.

Já foi relatado que o fator de transcrição *ETV5* é capaz de regular a transcrição de *FOXM1* em células de câncer de ovário (Llaurado et al 2012). O gene *ETV5* também apresentou-se diferencialmente expresso em nossas análises de microarranjo de DNA e, por isso, foi feita uma análise de correlação entre a expressão desse gene e *FOXM1* em CEE (Figura 29). A análise de correlação entre esses genes foi significativa, indicando que *ETV5* pode ser o ativador da transcrição de *FOXM1* em CEE, porém existe a necessidade de novos experimentos para comprovar ou refutar esta hipótese.

A elevada expressão de *MMP12* na mucosa adjacente ao tumor foi caracterizada como fator independente de mau prognóstico para os pacientes de CEE. A média de sobrevivência dos pacientes com baixa expressão de *MMP12* na mucosa adjacente ao tumor foi de 14,8 meses, enquanto que nos pacientes com alta expressão foi de 7,6 ($p < 0,0001$). Somente um trabalho até a presente data havia correlacionado a expressão de *MMP12* com CEE, entretanto, apesar dos autores terem observado que *MMP12* apresentava-se como marcador de tumores avançados, a expressão deste gene não foi um fator impactante independente na sobrevivência dos pacientes (Ding et al., 2002).

Após a caracterização da atividade da via de *FOXM1* em CEE resolvemos avaliar através de ensaios funcionais na linhagem celular derivada de CEE, TE1, o quanto a modulação da expressão de *FOXM1* influenciaria na viabilidade celular, taxas de proliferação e determinação da fase do ciclo celular. Após silenciarmos e super-expressarmos o gene *FOXM1* observamos a resposta molecular de genes alvo. O silenciamento de *FOXM1* resultou numa diminuição da expressão de *CCNB1* e *MMP12*, mas não influenciou nos níveis de expressão de *AURKA* (Figura 32). Entretanto, apesar da transfecção do gene *FOXM1* ter funcionado, não foi observado aumento de expressão em nenhum de seus genes alvo (Figura 33). Esta falta de modulação dos genes alvo de *FOXM1* após o tratamento de super-expressão pode ser explicado pelo fato da linhagem TE1 já apresentar uma expressão relativamente alta de *FOXM1* e o aumento deste gene saturou a maquinaria celular e não conseguiu desempenhar papel importante na função de fator de transcrição. Não observamos diferenças estatisticamente significativas na avaliação de viabilidade celular, taxas de proliferação e fase do ciclo celular na linhagem TE1 após os tratamentos de modulação de expressão do gene *FOXM1*. É provável que haja a necessidade de uma estimulação química da célula, como o tratamento com um quimioterápico, para que diferenças nas avaliações sejam observadas ou a linhagem celular TE1 pode não ser responsiva à *FOXM1*.

Portanto, nesse trabalho foi possível notar que a técnica de microarranjo de DNA utilizada alta sensibilidade em identificar GDE em tumores de esôfago quando comparados

com a mucosa não-tumoral adjacente ao tumor e mucosa de indivíduos sem câncer, assim como foi possível identificar GDE nas mucosas adjacentes ao tumor quando comparadas com as mucosas esofágicas saudáveis. Dentre as principais vias contendo esses genes diferencialmente expressos, destacaram-se a via de sinalização PI3K–AKT, sugerindo uma ativação dessa via em CEE; a super expressão de *FSCN1*, mostrando que alterações nesse gene parecem ser um evento precoce na carcinogênese esofágica além de ter um impacto direto na sobrevivência dos pacientes com CEE e a ativação da via de *FOXM1*, em que não só *FOXM1*, mas como uma gama de genes-alvo desse fator de transcrição apresentaram-se super-expressos em CEE. Dado a importância de *FOXM1*, conforme discutido anteriormente, avaliamos se a modulação desse gene em cultura de células tumorais esofágicas (TE-1) poderia influenciar na viabilidade, proliferação celular e fases do ciclo celular. Entretanto não observamos diferenças significativas quando inibimos ou super-expressamos *FOXM1* em relação aos controles. Esses dados indicam a necessidade de outros experimentos (como o tratamento dessas células com drogas) assim como o uso de outros tipos celulares a fim de investigarmos a importância dessa via para a carcinogênese esofágica.

4.2 Importância da ativação da via de sinalização PI3K – AKT em CEE

A via de sinalização de PI3K – AKT é uma das vias mais estudadas em câncer, sendo relacionada a controle de algumas etapas cruciais da carcinogênese como controle do ciclo celular, sobrevivência, metabolismo, motilidade e instabilidade genômica (Hanahan e Weinberg, 2011). A via também contribui para a modulação do ambiente tumoral, influenciando a angiogênese e o recrutamento de células inflamatórias (Hirsch *et al.*, 2013). Trabalhos em câncer que avaliam essa via sugerem que a via de PI3K é a via de sinalização mais alterada em tumores humanos sendo a mais mutada em tumores de cabeça e pescoço, que são tumores com fatores etiológicos semelhantes ao CEE. Mutações em genes dessa via são considerados preditores de tratamento em tumores de cabeça e pescoço, (Samuels e Ericson, 2006; Song *et al.*, 2012; Lui *et al.*, 2013).

Heldebrandt e colaboradores em 2009 descreve alterações genéticas na via de PI3K – AKT em câncer de esôfago (ADE e CEE) e associaram essas alterações com a presença de recidiva do tumor e que essas alterações podem alterar a resposta do paciente ao tratamento quimioterápico. Em 2011, Li e colaboradores caracterizaram os componentes da via de

sinalização de PI3K – AKT como alvos promissores de terapia gênica em CEE. Esse trabalho mostrou a importância da ativação de AKT na resistência a tratamentos quimioterápicos, indicando que a inibição deste gene pode restaurar a sensibilidade ao tratamento.

Em nossa análise verificamos que os genes *PIK3R3* está super-expresso em CEE em relação a mucosa adjacente e a mucosa esofágica saudável. Já foi descrito que o gene *PIK3R3* é super-expresso em glioblastoma e câncer de ovário (Soroceanu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007) e seu silenciamento inibe o crescimento celular dependente de *IGF2* em glioblastoma (Soroceanu *et al.*, 2007). Também já foi descrito que *PI3KR3* encontra-se super-expresso em câncer gástrico, atuando como um agente indutor de proliferação (Zhou *et al.*, 2012).

Também observamos que o gene *AKT3* apresentou-se super-expresso em CEE em relação a mucosa adjacente ao tumor. Interessantemente, observamos também que *AKT3* está sub-expresso na mucosa adjacente ao tumor em relação a mucosa esofágica saudável. Este fato nos permite propor que *AKT3* tem sua expressão suprimida na mucosa adjacente ao tumor como forma de proteção aos fatores etiológicos relacionados a carcinogênese esofágica, mas essa repressão é perdida com o aumento do estresse oncogênico.

Um dos mais importantes biomarcadores de diagnóstico de câncer de próstata é a avaliação da concentração da proteína PSA no sangue. A sensibilidade do PSA em distinguir um câncer de próstata em comparação com o tecido saudável é de 83,4% e a especificidade é de 38,9% (Thompson *et al.*, 2005), valores inferiores aos apresentados na avaliação da expressão de *PI3KR3* (sensibilidade de 78% e especificidade de 92,5%) *AKT3* (sensibilidade de 83% e especificidade de 67,5%) na identificação de alterações no epitélio esofágico.

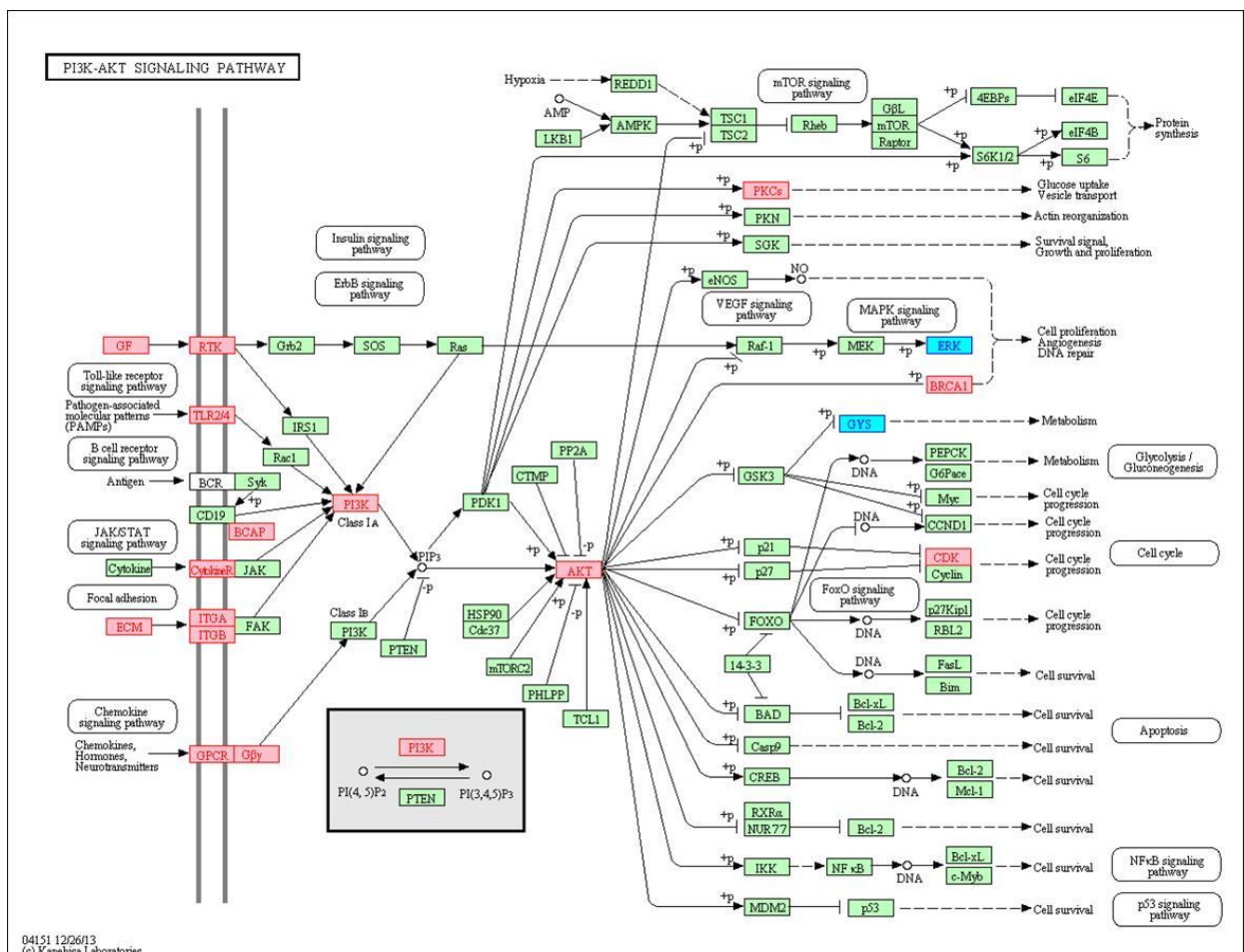
O terceiro membro da via analisado foi *STAT3*, que regula vias importantes para o processo de carcinogênese, como proliferação celular, angiogênese e apoptose (Jarnicki, Putoczki *et al.*, 2010). *STAT3* bloqueia a apoptose por ativar a expressão de genes anti-apoptóticos, como *Bcl-2* e *Bcl-XL*, e por induzir outras proteínas que suprimem indiretamente a apoptose, como a chaperona Hsp70 (Bromberg, Wrzeszczynska *et al.*, 1999; Stephanou, Brar *et al.*, 2000; Sikora e Grzesiuk, 2007). O gene *STAT3* apresenta alteração no perfil de expressão em diversos tumores e é considerado um alvo potencial para a terapia oncológica (Timme *et al.*, 2013).

Apesar da relevância de *STAT3* em outras neoplasias, não foi observado diferença de expressão de *STAT3* em nenhuma análise deste trabalho, indicando que o perfil de expressão dele provavelmente não varia com o estresse oncogênico no epitélio esofágico. Por outro lado, grande parte do aumento de atuação de *STAT3* é relacionado à sua fosforilação (Jarnicki e

Putoczki *et al.*, 2010), havendo assim a necessidade de se estudar seus níveis de fosforilação em CEE afim de traçarmos o papel desta proteína na carcinogênese esofágica.

Os genes diferencialmente expressos presentes na via de sinalização de PI3K – AKT estão representados na figura 45. É possível observar que além de *PIK3R3* e *AKT3* diversos genes que ativam a via estão regulados positivamente em CEE, como receptores *toll-like*, integrinas, receptores acoplados a proteína G e outros. Entretanto, os alvos a jusante de PI3K – AKT melhor caracterizados não se apresentaram alterados como os ativadores da via. Este fato evidencia a necessidade de investigar quais são os alvos de PI3K-AKT em CEE afim de compreendermos o papel desta via na carcinogênese esofágica.

Figura 45 - Via de sinalização de PI3K – AKT

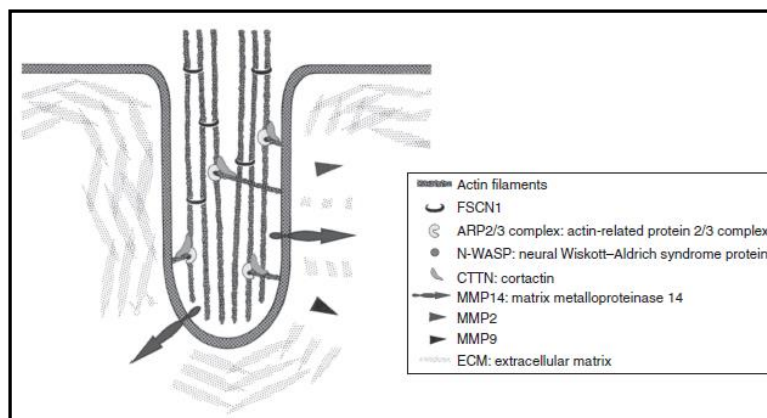


Legenda: Caixa vermelha – gene super-expresso em CEE na nossa análise de microarranjo de DNA; Caixa azul – gene sub-expresso em CEE na nossa análise de microarranjo de DNA; Caixa verde – gene sem diferença de expressão em CEE na nossa análise de microarranjo de DNA.

4.3 Valor prognóstico da expressão de *FSCN1*, sua atuação como biomarcador de alterações epiteliais no esôfago e associação de expressão com fator de transcrição *HOXD10*

FSCN1, também conhecido como Fascina1, é um proteína globular de 55 kDa responsável pela agregação dos filamentos de actina na célula. Sua atividade contribui para a organização de saliências que medeiam as interações celulares e migração, organização de feixes de microfilamentos citoplasmáticos (Figura 46) que contribuem para a arquitetura celular e movimento intracelular e, por fim, está relacionada a motilidade celular e metastase. A fascina 1 é largamente expressa em tecidos normais mesenquimais e no sistema nervoso, mas não em célula epitelial normal (Hashimoto *et al.*, 2005; Fried *et al.*, 2003). A expressão do fascina em neoplasias epiteliais, incluindo tumores de mama, cólon, pâncreas, pulmão, ovário, nasofaringe e estômago, foi descrito recentemente (Li *et al.*, 2008; Hashimoto *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Tasi *et al.*, 2007) e a maioria dos trabalhos tem mostrado que a expressão da fascina está correlacionada com a agressividade dos tumores e com diminuição na sobrevivência dos pacientes.

Figura 46 - Representação da atividade de *FSCN1* na organização dos filamentos de actina na célula



Fonte: Akanuma *et al.*, 2014

Hashimoto e colaboradores (2005) descrevem que *FSCN1* é geralmente super-expressa em CEE quando comparadas ao epitélio esofágico adjacente ao tumor e que esse aumento de expressão foi associado a um pior prognóstico desses pacientes. Além disso, o silenciamento de *FSCN1* reduziu a motilidade celular e invasão na linhagem celular de CEE, sugerindo que a super-expressão de *FSCN1* pode desempenhar um papel importante na

progressão de CEE e que este gene pode ser utilizado como alvo molecular em uma nova estratégia terapêutica para pacientes com CEE.

Em nossa análise a expressão de *FSCN1* estava aumentada em CEE em relação a mucosa adjacente e a mucosa saudável. Também observamos aumento da expressão de *FSCN1* na mucosa adjacente a CEE em relação a mucosa saudável. Além disso, observamos que a expressão genica de *FSCN1* foi capaz de diferenciar a mucosa tumoral da mucosa adjacente ao tumor (sensibilidade de 87% e especificidade de 75%), diferenciar a mucosa adjacente ao tumor da mucosa saudável (sensibilidade de 88% e especificidade de 62,5%) e diferenciar CEE da mucosa saudável com sensibilidade de 97% e especificidade de 100% (Figura 41 B-D). Estes dados sugerem que alterações no perfil de expressão deste gene apresentam-se como um evento precoce no processo de carcinogênese esofágica e sua utilização como biomarcador de detecção de lesões precoces poderá ser útil na rotina clínica

Como em outros trabalhos em CEE (Hashimoto *et al.*, 2005; Akamura *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2010) a expressão de *FSCN1* influenciou a sobrevida dos pacientes de forma independente. Entretanto, essa correlação entre aumento da expressão do gene e diminuição da sobrevida foi observada somente com os valores de expressão na mucosa adjacente ao tumor (Figura 40). Onde somente 10% dos pacientes com mucosa adjacente apresentando alta expressão de *FSCN1* encontravam-se vivos em 18 meses, enquanto que 60% dos pacientes com baixa expressão apresentavam vivos nesse período ($p < 0,0001$).

A regulação da expressão de *FSCN1* em CEE pelos microRNAs miR-133a e miR-133b foi descrita recentemente (Kano *et al.*, 2010) e ainda, foi sugerido que miR-133a desempenhe função de supressor de tumor no esôfago (Akanuma *et al.*, 2014). Apesar disso, não observamos sub-expressão de miR-133a e miR-133b em nossa análise de microarranjo de DNA, indicando que a expressão destes dois microRNAs não se apresentou como responsável pela modulação da expressão de *FSCN1* em nossas amostras. Alterações no perfil de metilação da região promotora de *FSCN1*, alteração epigenética relacionada com a modulação de expressão de diversos genes, parece não ter papel sobre a modulação da expressão de *FSCN1* em CEE (Hou *et al.*, 2009).

Já foi descrito que o fator de transcrição SP1 atua como um regulador positivo da expressão de *FSCN1* em CEE como resultado da ativação da via de EGFR (Lu *et al.*, 2009). O gene *SP1* não se apresentou diferencialmente expresso em nenhuma das análises, sugerindo que outro fator de transcrição possa estar relacionado com a expressão de *FSCN1*. Após busca *in silico* de fatores de transcrição com sítio de ligação na região promotora de *FSCN1*, identificamos o gene *HOXD10* como possível candidato desta modulação.

Membros da família de genes homeobox (HOX) são fatores de transcrição que controlam a diferenciação e a morfogênese celular durante o desenvolvimento embrionário (Botas, 1993; Samuel e Naora, 2005). Além dos seus papéis no desenvolvimento, numerosos genes HOX (HOXB13, HoxA5 e HoxC6) foram encontrados expressos de forma aberrante numa variedade de tumores sólidos, incluindo tumores de mama, próstata e cólon (Shah e Sukumar, 2010; Raman *et al.*, 2000). A desregulação dos genes Hox pode afetar várias vias que desempenham papéis críticos na tumorigênese e metástase tumoral (Shah e Sukumar, 2010).

Já foi demonstrado que a expressão de *HOXD10* aparece reduzida em câncer de mama e de endométrio (Osborne *et al.*, 1998) e que a super-expressão desse gene reduz de forma significativa a motilidade e poder de invasão de linhagens celulares derivadas de tumores de mama, sendo caracterizado como um supressor de tumor (Carrio *et al.*, 2005).

Em nossa análise, o gene *HOXD10* apresentou-se super-expresso em CEE em relação a mucosa adjacente e o aumento de sua expressão foi associado significativamente com o aumento da expressão de *FSCN1* (Figura 39 – C), indicando que pode haver uma interação biológica entre *HOXD10* e *FSCN1*. Também testamos a capacidade da expressão de *HOXD10* em distinguir tecido tumoral e mucosa adjacente, resultando em uma sensibilidade de 94% e especificidade de 84% (Figura 39 - A). A expressão de *HOXD10* mostra-se como outro bom candidato para testes como biomarcador de diagnóstico de CEE.

CONCLUSÕES

- Não observamos correlação entre os dados clínicos e patológicos analisados e a sobrevida dos pacientes com CEE;
- Determinamos o perfil de expressão gênica global através da técnica de microarranjo de DNA, identificando 1064 GDE na comparação entre CEE com mucosa não-tumoraladjacente ao tumor, 535 na análise entre CEE e mucosa saudável e 27 GDE na análise entre mucosa adjacente e mucosa esofágica saudável;
- Após enriquecimento dos clusters gênicos, observamos que os GDE são genes predominantemente relacionados as vias de controle do ciclo celular, de reparo de DNA, do metabolismo celular e de estrutura celular;
- A expressão genica dos GDE selecionados e analisados pela técnica de microarranjo foi validada pela técnica de PCRq, mostrando uma correlação maior que 77%;
- A capacidade da expressão gênica dos genes analisados (*PIK3R3*, *AKT3*, *FSCN1*, *HOXD10* e *FOXMI*) em distinguir alterações no epitélio esofágico apresentou resultados estatisticamente significativos;
- A elevada expressão dos genes *FSCN1* e *MMP12* na mucosa adjacente ao tumor influenciou na sobrevida dos pacientes;
- Não foi possível observar diferenças no padrão de viabilidade celular, taxas de proliferação e fase do ciclo celular quando modulamos a expressão de *FOXMI* na linhagem celular TE1.

REFERÊNCIAS

AHMAD A, WANG Z, KONG D, et al. FoxM1 down-regulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extracellular matrix degrading factors. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jul;122(2):337-46.

Akanuma N, I Hoshino*,1, Y Akutsu1, K Murakami1, Y Isozaki1, T Maruyama1, G Yusup1, W Qin1, T Toyozumi1, M Takahashi1, H Suito1, X Hu1, N Sekino1 and H Matsubara1. MicroRNA-133a regulates the mRNAs of two invadopodia-related proteins, FSCN1 and MMP14, in esophageal cancer. *British Journal of Cancer* (2014) 110, 189–198.

Akhtar S. Areca nut chewing and esophageal squamous-cell carcinoma risk in Asians: a meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control.* 2013 Feb;24(2):257-65.

Allen JW, et al. Squamous cell carcinoma of the esophagus: a review and update. *Surg Oncol.* 1997 Dec;6(4):193-200.

Almiñana C1, Heath PR, Wilkinson S, Sanchez-Osorio J, Cuello C, Parrilla I, Gil MA, Vazquez JL, Vazquez JM, Roca J, Martinez EA, Fazeli A. Early developing pig embryos mediate their own environment in the maternal tract. *PLoS One.* 2012;7(3):e33625. doi: 10.137.

Amaratunga D, Cabrera J, Kovtun V. Microarray learning with ABC. *Biostatistics.* 2008 Jan;9(1):128-36. Epub 2007 Jun 14.

Amaratunga D, Cabrera J, Kovtun V. Microarray learning with ABC. *Biostatistics.* 2008 Jan;9(1):128-36. Epub 2007 Jun 14.

Amaratunga D., Cabrera J. and Shkedy Z. (2014), *Exploration and Analysis of DNA Microarray and Other High Dimensional Data*, New York: John Wiley (available on Amazon). This is a second edition of our 2003 book.

Barnas C, Martel-Planche G, Furukawa Y, Hollstein M, Montesano R, Hainaut P. Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers. *Int J Cancer.* 1997 Mar 28;71(1):79-87.

Barrett T1, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41.

Beltrami AP1, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow. *Blood.* 2007 Nov 1;110(9):3438-46. Epub 2007 May 24.

Bird-Lieberman EL1, Fitzgerald RC. Early diagnosis of oesophageal cancer. *Br J Cancer.* 2009 Jul 7;101(1):1-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6605126. Epub 2009 Jun 9.

Botas J. Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. *Curr Opin Cell Biol.* 1993 Dec;5(6):1015-22.

Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Deyan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999 Aug 6;98(3):295-303.

Carrio M1, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7177-85.

CASTELLSAGUÉ X, MUÑOZ N, DE STEFANI E, VICTORA CG, CASTELLETTO R, ROLÓN PA, QUINTANA MJ. (1999) Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. *Int J Cancer.* 82(5):657-64.

CASTELLSAGUÉ X, MUÑOZ N, DE STEFANI E, VICTORA CG, CASTELLETTO R, ROLÓN PA. (2000) Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America. *Int J Cancer.* 88(4):658-64.

Chattopadhyay I, Phukan R, Singh A, Vasudevan M, Purkayastha J, Hewitt S, Katakai A, Mahanta J, Kapur S, Saxena S. Molecular profiling to identify molecular mechanism in esophageal cancer with familial clustering. *Oncol Rep.* 2009 May;21(5):1135-46.

Chen H, Wang Z, Yang Z, Shang B, Liu X, Chen G. Prospective study of adjuvant radiotherapy on preventing lymph node metastasis after Ivor-lewis esophagectomy in esophageal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2013 Aug;20(8):2721-6. doi: 10.1245/s10434-013-2928-3. Epub 2013 Mar 6.

Chen LQ, Hu CY, Ghadirian P, Duranceau A. Early detection of esophageal squamous cell carcinoma and its effects on therapy: an overview. *Dis Esophagus*. 1999;12(3):161-7. Review.

Cheng W1, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med*. 2005 May;11(5):531-7. Epub 2005 Apr 10.

Cobbs C1, Khan S, Matlaf L, McAllister S, Zider A, Yount G, Rahlin K, Harkins L, Bezrookove V, Singer E, Soroceanu L. HCMV glycoprotein B is expressed in primary glioblastomas and enhances growth and invasiveness via PDGFR-alpha activation. *Oncotarget*. 2014 Feb 28;5(4):1091-100.

Cohen DJ, Ajani J. An expert opinion on esophageal cancer therapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2011 Feb;12(2):225-39. doi: 10.1517/14656566.2010.517748. Review.

CORLEY DA, BUFFLER PA. (2001) Oesophageal and gastric cardia adenocarcinomas: analysis of regional variation using the Cancer Incidence in Five Continents database. *Int J Epidemiol*. 30: 1415-1425.

D'Souza G *et al*. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356:1944-56.

da Costa NM, Soares Lima SC, de Almeida Simão T, Ribeiro Pinto LF. The potential of molecular markers to improve interventions through the natural history of oesophageal squamous cell carcinoma. *Biosci Rep*. 2013 Aug 14;33(4). pii: e00057. doi: 10.1042/BSR20130063. Review.

Dadkhah E1, Naseh H, Farshchian M, Memar B, Sankian M, Bagheri R, Forghanifard MM, Montazer M, Kazemi Noughabi M, Hashemi M, Abbaszadegan MR. A cancer-array approach elucidates the immune escape mechanism and defects in the DNA repair system in esophageal squamous cell carcinoma. *Arch Iran Med*. 2013 Aug;16(8):463-70.

Dawsey SM, Fleischer DE, Wang GQ, Zhou B, Kidwell JA, Lu N, Lewin KJ, Roth MJ, Tio TL, Taylor PR. Mucosal iodine staining improves endoscopic visualization of squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus in Linxian, China. *Cancer*. 1998 Jul 15;83(2):220-31. Review.

Dawsey SM, Shen Q, Nieberg RK, Liu SF, English SA, Cao J, Zhou B, Wang GQ, Lewin KJ, Liu FS, Roth MJ, Taylor PR. Studies of esophageal balloon cytology in Linxian, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997 Feb;6(2):121-30.

Development core team, 2004 - Davis S1, Meltzer PS. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. *Bioinformatics*. 2007 Jul 15;23(14):1846-7. Epub 2007 May 12.

Dibb M1, Han N, Choudhury J, Hayes S, Valentine H, West C, Ang YS, Sharrocks AD. The FOXM1-PLK1 axis is commonly upregulated in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Nov 6;107(10):1766-75.

Ding Y, Shimada Y, Gorrin-Rivas MJ, Itami A, Li Z, Hong T, Maeda M, Komoto I, Kawabe A, Kaganoi J, Imamura M. Clinicopathological significance of human macrophage metalloelastase expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2002;63(4):378-84.

DOUARD R, MOUTEREAU S, PERNET P, et al. Sonic Hedgehog-dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. *Surgery*. 2006 May;139(5):665-70.

Eslick GD. Epidemiology of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 2009 Mar;38(1):17-25, vii. doi: 10.1016/j.gtc.2009.01.008.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11.

Fukuhara T et al. Characteristics of esophageal squamous cell carcinomas and lugol-voiding lesions in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Feb;44(2):e27-33.

Fukuhara T et al. Characteristics of esophageal squamous cell carcinomas and lugol-voiding lesions in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Feb;44(2):e27-33.

Garraway LA, Weir BA, Zhao X, Widlund H, Beroukhir R, Berger A, Rimm D, Rubin MA, Fisher DE, Meyerson ML, Sellers WR. "Lineage addiction" in human cancer: lessons from integrated genomics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:25-34.

Garraway LA¹, Weir BA, Zhao X, Widlund H, Beroukhir R, Berger A, Rimm D, Rubin MA, Fisher DE, Meyerson ML, Sellers WR. "Lineage addiction" in human cancer: lessons from integrated genomics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005;70:25-34.

Gonzaga IM¹, Soares-Lima SC, de Santos PT, Blanco TC, de Reis BS, Quintella DC, de Oliveira IM, de Faria PA, Krueel CD, Andreollo NA, de Simão TA, Pinto LF. Alterations in epidermal growth factor receptors 1 and 2 in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer*. 2012 Dec 4;12:569. doi: 10.1186/1471-2407-12-569.

Guarnaccia M¹, Gentile G², Alessi E³, Schneider C⁴, Petralia S⁵, Cavallaro S⁶. Is this the real time for genomics? *Genomics*. 2014 Feb-Mar;103(2-3):177-82. doi: 10.1016.

Guo W, Jiang YG. Current gene expression studies in esophageal carcinoma. *Curr Genomics*. 2009 Dec;10(8):534-9

HALASI M & GARTEL AL. Targeting FOXM1 in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2013 Mar 1;85(5):644-52.

Hammond ME¹, Taube SE. Issues and barriers to development of clinically useful tumor markers: a development pathway proposal. *Semin Oncol*. 2002 Jun;29(3):213-21.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.

Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, Okumura T, Tanaka E, Tsunoda S, Higashiyama M, Watanabe G, Imamura M, Shimada Y. Prognostic significance of fascin overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2597-605.

Hashimoto Y, Kim DJ, Adams JC. The roles of fascin in health and disease. *J Pathol*. 2011 Jul;224(3):289-300.

Hashimoto Y1, Shimada Y, Kawamura J, Yamasaki S, Imamura M. The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma. *Oncology*. 2004;67(3-4):262-70.

Held GA, Grinstein G, Tu Y. Relationship between gene expression and observed intensities in DNA microarrays--a modeling study. *Nucleic Acids Res*. 2006 May 24;34(9):e70.

Herbster S, Ferraro CT, Koff NK, Rossini A, Krueel CD, Andreollo NA, Rapozo DC, Blanco TC, Faria PA, Santos PT, Albano RM, Simão Tde A, Pinto LF. HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. *Cancer Lett*. 2012 Dec 29;326(1):52-8. doi: 10.1016/j.canlet.2012.07.018. Epub 2012 Jul 20.

Hirsch E, Ciruolo E, Franco I, Ghigo A, Martini M. PI3K in cancer-stroma interactions: bad in seed and ugly in soil. *Oncogene*. 2013 Jul 29.

Hongo M, Nagasaki Y, Shoji T. Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009 May;24(5):729-35. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05824.x. Review.

Hou J1, Guo ZY, Xie JJ, Li EM, Xu LY. Fascin overexpression is regulated by the transactivation of the promoter but not by its hypomethylation in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2009 Sep-Oct;2(5):843-9.

Hui MK, Chan KW, Luk JM, Lee NP, Chung Y, Cheung LC, Srivastava G, Tsao SW, Tang JC, Law S. Cytoplasmic Forkhead box M1 (FoxM1) in esophageal squamous cell carcinoma significantly correlates with pathological disease stage. *World J Surg*. 2012 Jan;36(1):90-7.

IARC, VOL. 51. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal.

IARC.1986b. Tobacco smoking. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans (Vol. 38). Lyon, France: IARC. p 37–375.

INCA 2014. MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2013.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Epub 2011 Feb 4. Erratum in: *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):134.

Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32.

Kano M1, Seki N, Kikkawa N, Fujimura L, Hoshino I, Akutsu Y, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Matsubara H. miR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2804-14.

Kim CH1, Lee YC, Hung RJ, McNallan SR, Cote ML, Lim WY, Chang SC, Kim JH, Ugolini D, Chen Y, Liloglou T, Andrew AS, Onega T, Duell EJ, Field JK, Lazarus P, Marchand LL, Neri M, Vineis P, Kiyohara C, Hong YC, Morgenstern H, Matsuo K, Tajima K, Christiani DC, McLaughlin JR, Bencko V, Holcatova I, Boffetta P, Brennan P, Fabianova E, Foretova L, Janout V, Lissowska J, Mates D, Rudnai P, Szeszenia-Dabrowska N, Mukeria A, Zaridze D, Seow A, Schwartz AG, Yang P, Zhang ZF. Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: A pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Int J Cancer*. 2014 Mar 11. doi: 10.1002/ijc.28835.

Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jan;1819(1):28-37.

KORVER W, ROOSE J, CLEVERS H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res*. 1997 May 1;25(9):1715-9.

LEE JS, CHU IS, HEO J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*. 2004 Sep;40(3):667-76.

LEUNG TW, LIN SS, TSANG AC, et al. Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression. *FEBS Lett*. 2001 Oct 19;507(1):59-66.

Li A, Morton JP, Ma Y, Karim SA, Zhou Y, Faller WJ, Woodham EF, Morris HT, Stevenson RP, Juin A, Jamieson NB, Mackay CJ, Carter CR, Leung HY, Yamashiro S, Blyth K, Sansom

OJ, Machesky LM. Fascin is regulated by slug, promotes progression of pancreatic cancer in mice, and is associated with patient outcomes. *Gastroenterology*. 2014 May;146(5):1386-1396.e17.

Li H, Gao Q, Guo L, Lu SH. The PTEN/PI3K/Akt pathway regulates stem-like cells in primary esophageal carcinoma cells. *Cancer Biol Ther*. 2011 Jun 1;11(11):950-8. Epub 2011 Jun 1.

Li J, Li X, Li Y, Yang H, Wang L, Qin Y, Liu H, Fu L, Guan XY. Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization. *PLoS One*. 2013;8(1):e53582.

LIJINSKY W. (1992) *Chemistry and biology of N-nitroso compounds*. Cambridge University Press.

Lima SC1, Hernández-Vargas H, Simão T, Durand G, Krueel CD, Le Calvez-Kelm F, Ribeiro Pinto LF, Herceg Z. Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. *Epigenetics*. 2011 Oct 1;6(10):1217-27. doi: 10.4161/epi.6.10.17199. Epub 2011 Oct 1.

LIU SS, TSANG BK, CHEUNG AN, et al. Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma. *Eur. J Cancer* 2001; 37: 1104-10.

Livak KJ1, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lu XF, Li EM, Du ZP, Xie JJ, Guo ZY, Gao SY, Liao LD, Shen ZY, Xie D, Xu LY. Specificity protein 1 regulates fascin expression in esophageal squamous cell carcinoma as the result of the epidermal growth factor/extracellular signal-regulated kinase signaling pathway activation. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Oct;67(19):3313-29.

Ludwig JA1, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005 Nov;5(11):845-56.

Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, Lu Y, Zhang Q, Du Y, Gilbert BR, Freilino M, Sauerwein S, Peyser ND, Xiao D, Diergaard B, Wang L, Chiose S,

Seethala R, Johnson JT, Kim S, Duvvuri U, Ferris RL, Romkes M, Nukui T, Kwok-Shing Ng P, Garraway LA, Hammerman PS, Mills GB, Grandis JR. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov.* 2013 Jul;3(7):761-9.

MA RY, TONG TH, CHEUNG AM, et al. Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. *J Cell Sci.* 2005 Feb 15;118(Pt 4):795-806.

MAJOR ML, LEPE R, COSTA RH. Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators. *Mol Cell Biol.* 2004 Apr;24(7):2649-61.

Makino H1, Tajiri T, Miyashita M, Sasajima K, Anbazhagan R, Johnston J, Gabrielson E. Differential expression of TCEAL1 in esophageal cancers by custom cDNA microarray analysis. *Dis Esophagus.* 2005;18(1):37-40.

Mandard AM1, Hainaut P, Hollstein M. Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Mutat Res.* 2000 Apr;462(2-3):335-42.

McLarty AJ et al. Esophageal resection for cancer of the esophagus: long-term function and quality of life. *Ann Thorac Surg.* 1997; 63(6):1568-72.

Mello-Coelho Vd1, Hess KL. A conceptual and practical overview of cDNA microarray technology: implications for basic and clinical sciences. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Oct;38(10):1543-52. Epub 2005 Sep 6.

Mischel PS1, Cloughesy TF, Nelson SF. DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Oct;5(10):782-92.

Mori M, et al. Lugol staining pattern and histology of esophageal lesions. *Am J Gastroenterol.* 1993;88:701-705.

NAKAMURA S, HIRANO I, OKINAKA K, et al. The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Carcinogenesis.* 2010 Nov;31(11):2012-21.

Negm RS, Verma M, Srivastava S. The promise of biomarkers in cancer screening and detection. *Trends Mol Med*. 2002 Jun;8(6):288-93. Review.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*. 2002 Jun;19(6):607-14.

Osborne JI, Hu C, Hawley C, Underwood LJ, O'Brien TJ, Baker VV. Expression of HOXD10 gene in normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *J Soc Gynecol Investig*. 1998 Sep-Oct;5(5):277-80.

Paratore S1, Pezzino S, Cavallaro S. Identification of pharmacological targets in amyotrophic lateral sclerosis through genomic analysis of deregulated genes and pathways. *Curr Genomics*. 2012 Jun;13(4):321-33.

PARK HJ, COSTA RH, LAU LF, et al. Anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated proteolysis of the forkhead box M1 transcription factor is critical for regulated entry into S phase. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5162-71.

Parkin DM, et al. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 1999, 80:827-841.

Parkin DM, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55: 74-108.

Pepe MS1, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jul 18;93(14):1054-61.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

PICKENS A, ORRINGER MB. (2003) Geographical distribution and racial disparity in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg*. 76: 1367-1369.

PILARSKY C, WENZIG M, SPECHT T, et al. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia*. 2004 Nov-Dec;6(6):744-50.

Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grützmann R. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia*. 2004 Nov-Dec;6(6):744-50.

Putoczki TL, Thiem S, Loving A, Busuttill RA, Wilson NJ, Ziegler PK, Nguyen PM, Preaudet A, Farid R, Edwards KM, Boglev Y, Luwor RB, Jarnicki A, Horst D, Boussioutas A, Heath JK, Sieber OM, Pleines I, Kile BT, Nash A, Greten FR, McKenzie BS, Ernst M. Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically. *Cancer Cell*. 2013 Aug 12;24(2):257-71.

RADHAKRISHNAN SK, BHAT UG, HUGHES DE, et al. Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9731-5.

Raman V1, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, Marks J, Sukumar S. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*. 2000 Jun 22;405(6789):974-8.

RAYCHAUDHURI P, PARK HJ. FoxM1: a master regulator of tumor metastasis. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4329-33.

Rosell R1, Felip E, Taron M, Majo J, Mendez P, Sanchez-Ronco M, Queralt C, Sanchez JJ, Maestre J. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-III A-III B non-small cell lung cancer after induction gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin Cancer Res*. 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4215s-4219s.

Rossini A, de Almeida Simão T, Marques CB, Soares-Lima SC, Herbster S, Rapozo DC, Andreollo NA, Ferreira MA, El-Jaick KB, Teixeira R, Guimarães DP, Albano RM, Ribeiro Pinto LF. TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil. *Mutat Res*. 2010 Feb 1;696(1):10-5. Epub 2009 Nov 26.

Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase *Clin Cancer Res*. 2000 Apr;6(4):1322-7.

Samuels Y1, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2006 Jan;18(1):77-82.

Sassolas A, Leca-Bouvier BD, Blum LJ (2008) DNA biosensors and microarrays. *Chem Rev* 108:109–139.

SEPEHR A, TANIÈRE P, MARTEL-PLANCHE G, ZIA'EE AA, RASTGAR-JAZII F, YAZDANBOD M, ETEMAD-MOGHADAM G, KAMANGAR F, SAIDI F, HAINAUT P. (2001) Distinct pattern of TP53 mutations in squamous cell carcinoma of the esophagus in Iran. *Oncogene.* 20(50):7368-74.

Shah N, Sukumar S. The Hox genes and their roles in oncogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2010 May;10(5):361-71.

Shimizu Y, et al. Endoscopic screening for early esophageal cancer by iodine staining inpatients with other current or prior primary cancers. *GastrointestEndosc.* 2001;53:1–5.

Sikora A1, Grzesiuk E. Heat shock response in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 2007 Aug;58 Suppl 3:43-62.

Simão T, Souza-Santos PT, de Oliveira DS, Bernardo V, Lima SC, Rapozo DC, Kruel CD, Faria PA, Ribeiro Pinto LF, Albano RM. 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.

Smeds J et al. Genetic status of cell cycle regulators in squamous cell carcinoma of the oesophagus: the CDKN2A (p16INK4a and p14ARF) and p53 genes are major targets for inactivation. *Carcinogenesis*, 2002, 23: 645-655.

Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Apr 4;13(5):283-96.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8418-23. Epub 2003 Jun 26.

Stephanou A, Brar BK, Knight RA, Latchman DS. Opposing actions of STAT-1 and STAT-3 on the Bcl-2 and Bcl-x promoters. *Cell Death Differ*. 2000 Mar;7(3):329-30.

Su H, Hu N, Yang HH, Wang C, Takikita M, Wang QH, Giffen C, Clifford R, Hewitt SM, Shou JZ, Goldstein AM, Lee MP, Taylor PR. Global gene expression profiling and validation in esophageal squamous cell carcinoma and its association with clinical phenotypes. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2955-66.

Sudo T, Iwaya T, Nishida N, Sawada G, Takahashi Y, Ishibashi M, Shibata K, Fujita H, Shirouzu K, Mori M, Mimori K. Expression of mesenchymal markers vimentin and fibronectin: the clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2013 Dec;20 Suppl 3:S324-35.

Syrjänen KJ. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Oct;55(10):721-8.

The Gene Ontology Consortium, 2000 - Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25-9.

Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, Parnes HL, Coltman CA Jr. Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA*. 2005 Jul 6;294(1):66-70.

Timlin JA. Scanning microarrays: current methods and future directions. *Methods Enzymol*. 2006;411:79-98. Review.

Timme S1, Ihde S, Fichter CD, Waehle V, Bogatyreva L, Atanasov K, Kohler I, Schöpflin A, Geddert H, Faller G, Klimstra D, Tang L, Reinheckel T, Hauschke D, Busch H, Boerries M, Werner M, Lassmann S. STAT3 expression, activity and functional consequences of STAT3 inhibition in esophageal squamous cell carcinomas and Barrett's adenocarcinomas. *Oncogene*. 2013 Aug 5. doi: 10.1038/onc.2013.298.

Toh Y, Oki E, Ohgaki K, Sakamoto Y, Ito S, Egashira A, Saeki H, Kakeji Y, Morita M, Sakaguchi Y, Okamura T, Maehara Y. Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis. *Int J Clin Oncol*. 2010 Apr;15(2):135-44. doi: 10.1007/s10147-010-0057-6. Epub 2010 Mar 12. Review.

TUYNS AJ. (1979) Epidemiology of alcohol and cancer. *Cancer Res.* 39(7 Pt 2):2840-3.

WANG IC, CHEN YJ, HUGHES D. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.* 2005 Dec;25(24):10875-94.

Wang Q, Ma C, Kemmner W. Wdr66 is a novel marker for risk stratification and involved in epithelial-mesenchymal transition of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Mar 21;13:137.

WANG Z, BANERJEE S, KONG D, et al. Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67(17):8293-300.

Wettenhall JM1, Smyth GK. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics.* 2004 Dec 12;20(18):3705-6. Epub 2004 Aug 5.

Willyard C. Basket studies' will hold intricate data for cancer drug approvals. *Nat Med.* 2013 Jun;19(6):655. doi: 10.1038/nm0613-655.

WONSEY DR & FOLLETTIE MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. *Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5181-9.

Wu BL, Luo LW, Li CQ, Xie JJ, Du ZP, Wu JY, Zhang PX, Xu LY, Li EM. Comprehensive bioinformatics analysis of the mRNA profile of fascin knockdown in esophageal squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(12):7221-7.

Yan W, Shih JH, Rodriguez-Canales J, Tangrea MA, Ylaya K, Hipp J, Player A, Hu N, Goldstein AM, Taylor PR, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Identification of unique expression signatures and therapeutic targets in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Res Notes.* 2012 Jan 26;5:73.

Yang DK, Son CH, Lee SK, Choi PJ, Lee KE, Roh MS. Forkhead box M1 expression in pulmonary squamous cell carcinoma: correlation with clinicopathologic features and its prognostic significance. *Hum Pathol.* 2009 Apr;40(4):464-70.

Yang M1, Liu R, Sheng J, Liao J, Wang Y, Pan E, Guo W, Pu Y, Yin L. Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2013 Jan;29(1):169-76. doi: 10.3892/or.2012.2105. Epub 2012 Oct 23.

Zhang PN, Sun H. Expression of phosphatidylinositol-3 kinase in epithelial ovarian carcinoma. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2007 Mar;42(3):196-200.

Zhang Y1, Feng YB, Shen XM, Chen BS, Du XL, Luo ML, Cai Y, Han YL, Xu X, Zhan QM, Wang MR. 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 BS, Liu SG, Wang TY, Ji YH, Qi B, Tao YP, Li HC, Wu XN. Screening of microRNA in patients with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with different prognoses. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(1):139-43.

Zhao Q, Shen JH, Shen ZY, Wu ZY, Xu XE, Xie JJ, Wu JY, Huang Q, Lu XF, Li EM, Xu LY. Phosphorylation of fascin decreases the risk of poor survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2010 Nov;58(11):979-88.

Zhou J, Chen GB, Tang YC, Sinha RA, Wu Y, Yap CS, Wang G, Hu J, Xia X, Tan P, Goh LK, Yen PM. Genetic and bioinformatic analyses of the expression and function of PI3K regulatory subunit PIK3R3 in an Asian patient gastric cancer library. *BMC Med Genomics.* 2012 Aug 9;5:34.

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto no CEP / INCA



Memo 440/11-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 5 de dezembro de 2011.

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

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

Prezado(a) Pesquisador(a),

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

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

Atenciosamente,

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

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

ANEXO B – Carta de aprovação do projeto no CEP / HUPE



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Rio de Janeiro, 20 de junho de 2002

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof.: Wille Oigman
Para: Prof. Paulo Roberto Alves de Pinho

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (416-CEP/HUPE) " CÂNCER DE ESÔFAGO: UM ESTUDO MULTIDISCIPLINAR " aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 251 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 07 de agosto de 1997, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Wille Oigman', is positioned above the printed name.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa