

LUCIANA MOURA CAMPOS PARDINI

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE *FOXE1* EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES:
PADRONIZAÇÃO METODOLÓGICA**

BOTUCATU

2010

LUCIANA MOURA CAMPOS PARDINI

**ANÁLISE DE METILAÇÃO DO GENE *FOXE1* EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM CÃES:
PADRONIZAÇÃO METODOLÓGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista, *campus* de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário.

Área de Concentração: Cirurgia de Pequenos Animais

Preceptor: Profa. Adj. Dra. Sheila Canevese Rahal

Coordenador de Estágios: Profa. Ass. Dra. Vânia Maria de Vasconcelos Machado

BOTUCATU

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Pardini, Luciana Moura Campos.

Análise de metilação do gene *FOXE1* em carcinoma de células escamosas em cães : padronização metodológica / Luciana Moura Campos Pardini. - Botucatu, 2010.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

Preceptor: Sheila Canevese Rahal

Capes: 50501070

1. Cão – Doenças. 2. Carcinoma de células escamosas.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas; *FOXE1*; Metilação.

**Dedico este trabalho a quem dedicou toda a vida
aos meus irmãos e a mim: nossos pais.**

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe, por incentivar e investir em todos os meus sonhos e desejos, por ter tornado esse projeto uma realidade e por ser meu maior exemplo de vitória, minha heroína, minha fonte inesgotável de amor.

Ao meu Pai, por, há muitos anos atrás, ter me mostrado que os animais são as criaturas mais maravilhosas e fascinantes que podem existir. Esse ensinamento foi e continua sendo o que direcionou todos os caminhos que escolhi pra mim.

Ao Danilo, por me levar todos os dias pro lado mais doce e bonito da vida, por não ter soltado a minha mão nem um segundo desde que nos conhecemos e por me surpreender a cada dia com sua generosidade e amor sem fim.

Aos meus irmãos Júnior e Renata, pela torcida e incentivo desde os tempos em que morávamos na casa-velha.

À Profa. Sheila, meu grande exemplo de dedicação e conhecimento, sempre repartidos de maneira tão paciente e cheia de entusiasmo.

À Dri e Rejane, que me abriram as portas do Hemocentro e não só tornaram a conclusão desse trabalho possível, como me ensinaram lições que pretendo carregar por toda minha vida profissional.

À Tainara, pela ajuda no Laboratório de Biologia Molecular, imprescindível para a concretização desse trabalho.

À Ive, por uma amizade que resiste ao tempo e às transformações, por ser uma parte essencial do que fui e do que sou.

À Paula “Picareta”, uma das pessoas mais extraordinárias que já conheci, minha alma-gêmea, minha fiel companheira nesses anos de evolução, com quem desfrutei dias e noites do nosso tão calmo conceito de diversão.

À Bianca “Rodinha”, que meu deu a oportunidade de conhecê-la e amá-la, mesmo sendo tão diferente de mim.

À FMVZ – UNESP – Botucatu e todos os profissionais que dela fazem parte. Há cinco anos sonhava em fazer parte dessa instituição e hoje me enche de orgulho e coragem deixá-la para o início de um novo tempo.

A todos os animais, que já passaram ou passarão pela minha vida: meu eterno respeito e gratidão. Minha melhor razão pra viver.

***“Nem tudo se perde na confusão da vida e uma vaga
mas imperceptível ternura é o prêmio dos que muito souberam amar.”***

(Rubem Braga)

PARDINI, L. M. C. *Análise de metilação do gene FOXE1 em carcinoma de células escamosas em cães: padronização metodológica*. Botucatu, 2010. 23p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Acredita-se que mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, são importantes para a iniciação da tumorigênese e a manutenção do estado alterado das células tumorais. A metilação no DNA ocorre pela adição de um grupo metil ao carbono 5 da citosina, reação catalisada pela enzima DNA metiltransferase, que pode alterar a expressão de um gene, entre eles os genes supressores de tumor. No carcinoma cutâneo de células escamosas em humanos, várias características têm evidenciado o papel etiológico de genes no desenvolvimento do tumor. Dentre eles, o gene *FOXE1* (*forkhead box E1 - thyroid transcription factor*) apresenta-se com importante papel na suscetibilidade à doença. De maneira análoga, padrões de metilação em *FOXE1* em cães podem alterar a expressão desse gene e predispor ao aparecimento do tumor. Sendo assim, o presente estudo tem por objetivos investigar em cães a validade da estratégia molecular empregada em humanos para análise do *status* de metilação do gene *FOXE1*. Foi realizada a extração de DNA de amostras tumorais frescas congeladas pelo *Wizard Genomic® DNA Purification Kit*. O *status* de metilação foi determinado pelo MSP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-específica) com 2,0 ng de DNA tratado com bissulfito de sódio. Cem microgramas de DNA modificado por bissulfito foram amplificados, utilizando *primers* específicos para DNA metilado e não-metilado (sequência de *primers* disponível em <http://pathology2.jhu.edu/pancreas/primer.pdf>). A análise dos fragmentos foi realizada utilizando géis de poliacrilamida 7%, corados com nitrato de prata. Nos casos analisados nesta etapa de padronização técnica, 60% apresentaram hipermetilação para o gene *FOXE1*. Em conclusão, observou-se que a técnica para avaliar o padrão de metilação do gene *FOXE1* em seres humanos pode ser utilizada para a mesma avaliação em cães. A correlação destes dados moleculares com parâmetros clínicos e histopatológicos pode ter valor diagnóstico e prognóstico e ainda ser utilizado como marcador tumoral para tomada de decisão terapêutica e abordagem cirúrgica.

Palavras-chave: metilação, carcinoma de células escamosas, *FOXE1*.

PARDINI, L. M. C. *Analysis of FOXE1 gene methylation in squamous cell carcinoma in dogs: a technical approach*. Botucatu, 2010. 23p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, *campus* de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

It is believed that epigenetic mechanisms such as DNA methylation are important for the tumorigenesis and maintenance of the altered state of tumor cells. DNA methylation occurs by the addition of a methyl group to carbon 5 of cytosine, catalyzed by the enzyme DNA methyl-transferase, which can change the expression of a gene, including the tumor suppressor genes. In human squamous cell carcinoma, several features have shown the etiological role of genes in tumor development. Among them, *FOXE1* gene (forkhead box E1 - thyroid transcription factor) is presented with an important role in susceptibility to disease. Similarly the *FOXE1* methylation pattern could alter the expression of this gene in dogs and predisposed to tumor on. Therefore, this study aims to investigate in dogs, the validity of the strategy employed in humans to analyze the *FOXE1* methylation *status*. DNA extraction from fresh frozen tumoral samples was performed by *Wizard Genomic® DNA Purification Kit*. The methylation *status* was determined by MSP-PCR (methylation-specific polymerase chain reaction), using 2.0 ng of DNA treated with sodium bisulphate. One hundred micrograms of bisulphite-modified DNA was amplified using primers specific for either methylated or unmethylated DNA (primers sequences are available at <http://pathology2.jhu.edu/pancreas/primer.pdf>). The analysis of fragments was loaded on to 7% polyacrylamide gels and silver nitrate staining. In this stage of technical approach, 60% were *FOXE1* hypermethylated. In conclusion, it was observed that the standard technique for assessing the methylation pattern of gene *FOXE1* in humans can be used for the same evaluation in dogs. The correlation of these molecular data with clinical and histopathological parameters may have diagnostic and prognostic value and still be used as a tumor marker for therapeutic decision and surgical approach.

Key-words: methylation, squamous cell carcinoma, *FOXE1*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Epigenética.....	11
2.2. <i>FOXE1</i>	13
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4.1. Casuística.....	15
4.2. Metodologia.....	15
4.3. Sequenciamento.....	16
5. RESULTADOS.....	17
6. DISCUSSÃO.....	17
7. CONCLUSÃO.....	18
8. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	19
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Esquema de modificação epigenética do DNA (metilação). (Adaptado de RODENHISER & MANN, 2006)..... 12
- Figura 2.** Esquema das alterações reversíveis na organização da cromatina que influenciam a expressão do gene. (Adaptado de RODENHISER & MANN, 2006)..... 13
- Figura 3.** Cromatograma da sequência amplificada pelos primers específicos para DNA metilado (Resultado obtido pelo sequenciamento de DNA utilizando o equipamento *Applied Biosystems 377*)..... 17
- Tabela 1.** Sequência de *primers* específicos para DNA metilado e não-metilado (disponível em <http://pathology2.jhu.edu/pancreas/primer.pdf>)..... 16

1. INTRODUÇÃO

A incidência de câncer em cães vem aumentando consideravelmente nos últimos anos e é mais alta do que em qualquer outra espécie. Os tumores de pele e tecido subcutâneo são os que mais acometem os cães, representando aproximadamente 1/3 de todas as neoplasias diagnosticadas nessa espécie. Dentre eles, os mais comuns são: mastocitoma, adenoma perianal, lipoma, adenoma de glândula sebácea, fibrossarcoma, melanoma, histiocitoma, carcinoma de células escamosas, hemangiopericitoma e carcinoma basocelular, em ordem decrescente de ocorrência (WITHROW e VAIL, 2007).

O carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular constitui uma neoplasia cutânea de grande relevância em países de clima tropical como o Brasil, uma vez que a exposição crônica à radiação ultravioleta é um dos fatores importantes para o desenvolvimento da doença (FERREIRA et al., 2006; FERREIRA et al., 2009). Trata-se de um tumor maligno, originado na epiderme, que atinge células denominadas queratinócitos. Clinicamente, o tumor manifesta-se por lesões proliferativas ou erosivas, geralmente com baixo potencial metastático. As lesões proliferativas podem variar entre placas firmes e avermelhadas a lesões do tipo “couve-flor”, que frequentemente ulceram. As lesões erosivas são inicialmente superficiais e crostosas, podendo evoluir para úlcera profunda. Essas lesões comumente estão localizadas em áreas pouco pigmentadas e com pêlos esparsos (WITHROW e VAIL, 2007).

Vários fatores contribuem para o desenvolvimento das neoplasias. Já é muito bem documentado que os raios ultravioleta (UV) induzem mutações no DNA, conduzindo especialmente a formação de dímeros de timidina no gene supressor tumoral p53 e a falha no reparo dessas mutações pode se relacionar a origem das neoplasias. A radiação UV pode ainda afetar o sistema imune cutâneo, induzindo um estado de imunossupressão relativa que dificulta a resposta imunológica ao tumor (GROSSMAN e LEFFELL, 1997).

Alguns tipos de neoplasias malignas em cães mostram-se similares à doença no homem no aspecto histopatológico e na resposta à terapia, uma vez que ambos são naturalmente expostos aos mesmos agentes ambientais, incluindo agentes carcinogênicos (OSTRANDER e KRUGLYAK, 2000).

Estudos já demonstraram que a proteína codificada pelo gene supressor tumoral p53 está envolvida na progressão do tumor colorretal canino de maneira análoga a essa neoplasia em humanos (WOLF et al., 1997).

Nesse contexto, a busca de outros genes conservados entre as espécies que podem estar envolvidos com a tumorigênese, permite auxiliar o entendimento das neoplasias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EPIGNÉTICA

Mecanismos epigenéticos são fenômenos que alteram a expressão de genes durante o desenvolvimento e proliferação celular, no entanto, sem provocar mudanças na sequência de nucleotídeos que compõem o gene e sim uma modificação na conformação do DNA, alterando assim o seu funcionamento (SINGAL e GINDER, 1999).

Acredita-se que mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, são importantes para a iniciação da tumorigênese e a manutenção do estado alterado das células tumorais (RAMOS, 2009), sendo este um dos eventos epigenéticos mais comumente encontrados no genoma dos mamíferos (SINGAL e GINDER, 1999).

A metilação no DNA ocorre pela adição de um grupo metil ao carbono 5' da citosina, formando a quinta base do DNA humano, a 5-metilcitosina, reação catalisada pela enzima DNA metil-transferase (DNMT) (SINGAL & GINDER, 1999) (Fig. 1). Esse mecanismo pode alterar a expressão de um gene, entre eles os genes supressores de tumor. Nos mamíferos, o principal alvo da metilação é a citosina próxima à guanina (5'-CpG-3'). As sequências-alvo da metilação não são distribuídas de maneira uniforme no genoma, mas encontradas ao longo de regiões ricas em dinucleotídeos CG, como as ilhas CpG e outras regiões repetitivas no genoma. As ilhas CpG são sequências de aproximadamente 200 pares de bases (pb), localizadas principalmente nas regiões promotoras dos genes *housekeeping* e também em alguns outros genes que se expressam em tecidos específicos (ATTWOOD et al., 2002).

Silenciar um gene intacto por meio da metilação das sequências controladoras adjacentes é um evento normal do desenvolvimento, da diferenciação e da desativação do cromossomo X, mas ocasionalmente, a metilação aberrante das ilhas CpG nos promotores poderá causar uma perda patológica da função de um gene (Fig. 2) (ATTWOOD et al., 2002).

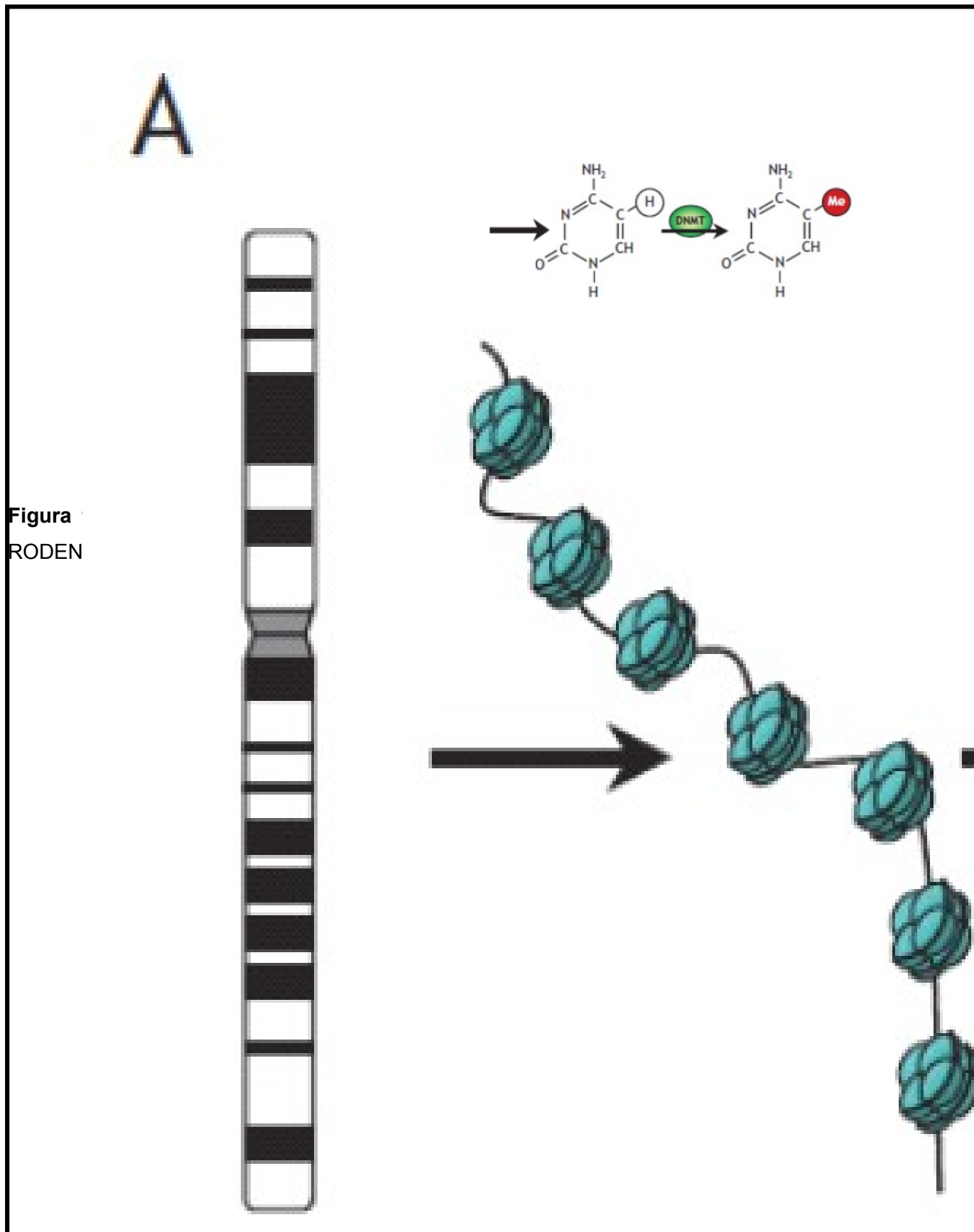


Figura
RODEN

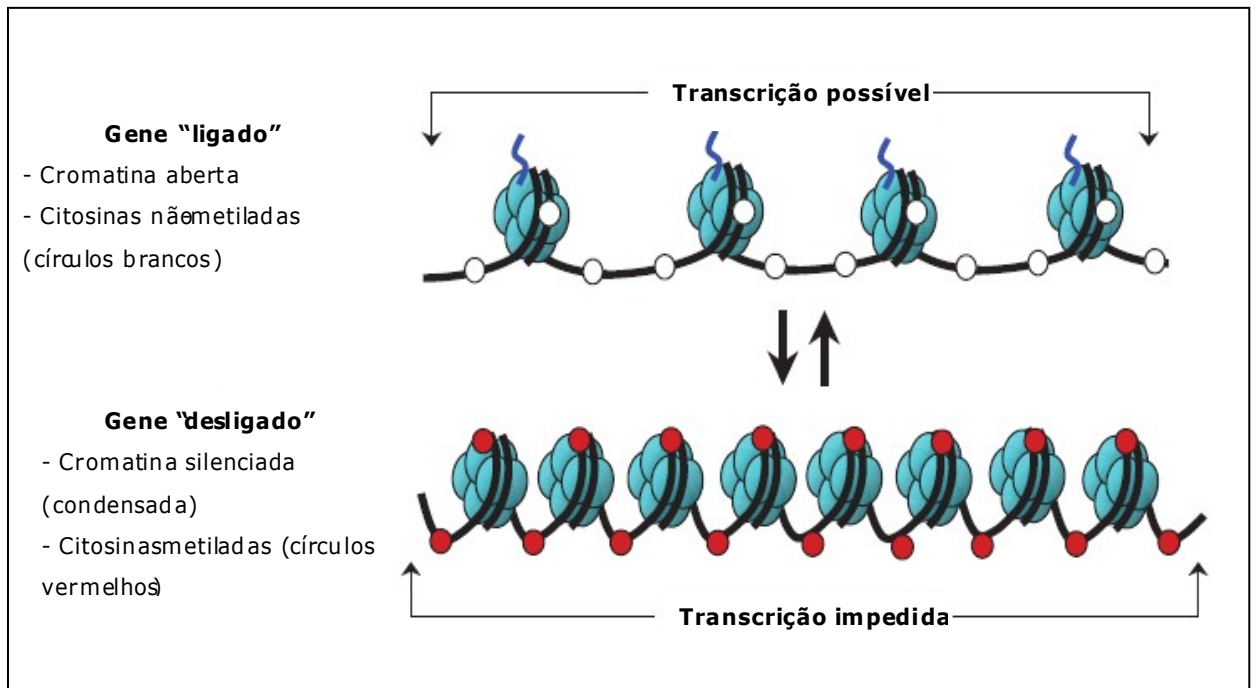


Figura 2 - Esquema das alterações reversíveis na organização da cromatina que influenciam a expressão do gene. (Adaptado de RODENHISER e MANN, 2006).

2.2. *FOXE1*

Quando se considera o carcinoma de células escamosas cutâneo em humanos, várias características têm evidenciado o papel etiológico de genes no desenvolvimento do tumor. Recentemente, são vários os genes estudados quanto ao seu envolvimento na predisposição à doença. Dentre eles, o gene *FOXE1* apresenta-se com importante papel na suscetibilidade à doença (VENZA et al., 2009). Em humanos, o gene *FOXE1* (também chamado de *TTF2*; *FOXE2*; *HFKH4*; *HFKL5*; *TITF2*; *TTF-2*; *FKHL15*) está localizado na região cromossômica 9q22, uma região frequentemente perdida no carcinoma de células escamosas (VENZA et al., 2009).

O gene se relaciona à codificação das proteínas FOX, cuja característica definidora é a *forkhead box*, uma sequência de 80 a 100 aminoácidos que constituem um mecanismo de ligação ao DNA, identificada pela primeira vez na mosca *Drosophila melanogaster* (CUESTA et al., 2007; HANNENHALLI e KAESTNER, 2009). Essas proteínas pertencem a uma família de fatores de transcrição que desempenham papel importante na regulação da expressão de genes envolvidos num amplo espectro de processos biológicos, incluindo o

metabolismo, desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, migração, invasão e longevidade (MYATT e LAM, 2007).

A desregulação dos genes da família *FOX*, composta por pelo menos 43 membros, pode levar a doenças congênitas, *diabetes mellitus* e carcinogênese (KATOH, 2004). Os genes pertencentes a essa família vêm sendo associados ao desenvolvimento de alguns tumores como carcinoma de tireóide, carcinoma de células escamosas de pulmão e esôfago e adenocarcinoma pancreático em humanos, além de doenças como hipotireoidismo congênito, disgenesia de tireóide e fissura de palato (CHADWICK et al., 1997; BRUNE et al., 2008; LANDA et al., 2009).

O *FOXE1* parece tratar-se de um gene conservado ao longo da evolução, uma vez que já foi identificado em genomas de diferentes espécies como *Bos taurus* (bovinos), *Mus musculus* (camundongo), *Rattus norvegicus* (ratazana), *Danio rerio* (peixe-zebra), além do *Homo sapiens* (HomoloGene: 3291, 2010). A expansão evolutiva dos genes da família *FOX* foi impulsionada pelo aumento da complexidade tecidual exigida pelos organismos superiores (MYATT e LAM, 2007). A conservação do domínio de ligação com o DNA (*DNA-binding*) entre genes ortólogos da família *FOX* em diferentes organismos é notável, como por exemplo, a semelhança de 90% dos aminoácidos entre as proteínas sintetizadas por esse gene na mosca *D. melanogaster* e as proteínas sintetizadas no humano (HANNENHALLI e KAESTNER, 2009).

Perfis de expressão, alterações genéticas e alterações epigenéticas de genes da família *FOX*, bem como proteínas e genes-alvo dos fatores de transcrição, devem ser exaustivamente investigados visando desenvolver novas abordagens terapêuticas e preventivas de doenças humanas (KATOH, 2004), podendo ser usados como um marcador de prognóstico (MYATT e LAM, 2007).

No entanto, até hoje, os eventos somáticos epigenéticos que ocorrem na tumorigênese do carcinoma cutâneo de células escamosas não foram bem definidos (VENZA et al., 2010b). Não há estudos sobre a influência da metilação em *FOXE1* no aparecimento de carcinoma cutâneo de células escamosas em cães.

3. OBJETIVOS

- Investigar em cães a validade da estratégia molecular empregada em humanos para análise de expressão do gene *FOXE1*.
- Analisar a expressão do gene *FOXE1* em tecidos tumorais.
- Determinar o padrão de metilação da região promotora do gene *FOXE1* como mecanismo de diminuição/inativação da expressão desse gene.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CASUÍSTICA

Até o momento, para a fase de padronização metodológica, foram coletadas amostras tumorais provenientes de 5 cães atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *campus* de Botucatu, com diagnóstico prévio de carcinoma de células escamosas cutâneo por exame citopatológico. As amostras foram coletadas seguindo o mesmo padrão de protocolo adotado para a cirurgia convencional de rotina para esta lesão. Logo após a coleta em tubo de polipropileno ideal para congelamento, as amostras foram estocadas em nitrogênio líquido e devidamente etiquetadas até o momento de sua utilização para extração de DNA.

4.2. METODOLOGIA

O DNA genômico foi extraído com *Wizard Genomic® DNA Purification Kit*. A princípio, 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* (NLS) foram adicionados a 10 mg do tecido tumoral descongelado para lise celular e após incubação, 3 µL de *RNAse Solution* foram adicionados para digestão das proteínas. Na etapa seguinte, foram adicionados 200 µL de solução de precipitação de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) e após centrifugação, as proteínas precipitadas formaram um *pellet* branco compacto no fundo do tubo. Cuidadosamente o sobrenadante contendo o DNA foi removido e transferido para um tubo de microcentrifuga com 600 µL de isopropanol à temperatura ambiente, formando uma massa visível. Após centrifugação, o isopropanol foi aspirado e a amostra

recebeu 600 µL de etanol a 70%, sendo novamente centrifugada e o etanol aspirado. Por fim, foram adicionados 30 µL de solução de reidratação de DNA (*DNA Rehydration Solution*). As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C e estocadas a 2-8°C. Com a utilização deste protocolo foi possível a obtenção de um DNA genômico de boa qualidade e concentração.

O *status* de metilação foi determinado pelo MSP-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase Metilação-específica) com 2,0 microgramas de DNA tratado com bissulfito de sódio. Cem nanogramas de DNA modificado por bissulfito foram amplificados, utilizando *primers* específicos para DNA metilado e não-metilado (Tabela 1). As condições de PCR foram: 95 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 51 °C durante 20 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 4 minutos. A análise dos fragmentos foi realizada utilizando géis de poliacrilamida 7%, corados com nitrato de prata.

<i>Forkhead box E1 (FOXE1)</i>	Unmethylated	Forward	TTT GTA GGG TTG GAG ATT TAT G
		Reverse	AAA ACA AAA CAA AAA CAA CAA AAT C
	Methylated	Forward	TCG TAG GGT TGG AGA TTT AC
		Reverse	GAA ACG AAA ACA ACG AAA TCG

Tabela 1 - Sequência de *primers* específicos para DNA metilado e não-metilado (disponível em <http://pathology2.jhu.edu/pancreas/primer.pdf>).

4.3. SEQUENCIAMENTO

Os produtos amplificados via MSP-PCR foram sequenciados pela técnica de reação de terminação em cadeia. Utilizou-se o sequenciador automático ABI 377 e o kit ABI PRISM *BigDye Terminator Cycle Sequencing* versão 3.1 (*Applied Biosystems*), seguindo as recomendações do fabricante.

5. RESULTADOS

Os *primers* utilizados por VENZA et al. (2010) para amplificar a região do *FOXE1* em humanos foi adequada para amplificação do mesmo gene em cães. A região alvo foi atingida, como pode ser comprovado pelo sequenciamento do fragmento obtido na reação de PCR (Fig. 3).

Nos casos analisados nesta etapa de padronização técnica, 60% apresentaram hipermetilação para o gene *FOXE1*.

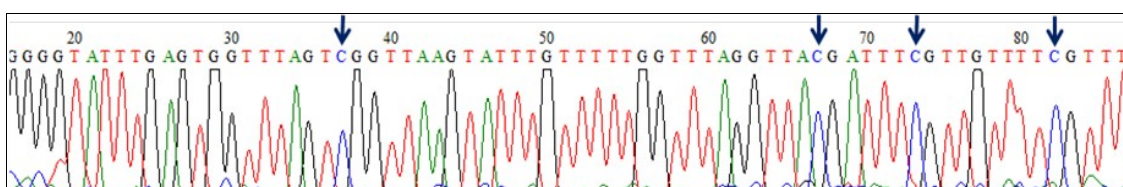


Figura 3 - Cromatograma da sequência amplificada pelos *primers* específicos para DNA metilado. Todas as citosinas são convertidas em timina, exceto as citosinas metiladas, como indicado pelas setas.

6. DISCUSSÃO

A metodologia de MSP-PCR utilizada para amplificação do gene *FOXE1* em humanos foi adequada para utilização em cães. O genoma canino apresenta 2,4Gb (giga bases) sendo, portanto, menor que o humano (2,9Gb). A diferença se deve, sobretudo, a um menor número de sequências repetitivas no genoma (31% do genoma do cão *versus* 46% em humanos e 38% no genoma do rato). No entanto, o alinhamento de sequências de DNA mostra que, aproximadamente 650Mb (mega bases) do DNA canino apresentam alta similaridade ao DNA humano e 60% das doenças no cão apresentam marcadores moleculares similares àqueles encontrados nas doenças humanas (KIRKNESS et al., 2003; SWITONSKI et al., 2004).

De maneira análoga, nos cães alguns genes já foram associados a vários tipos de tumores. Neoplasias caninas já foram estabelecidas como eficientes modelos comparativos para o estudo da doença nos humanos, como nos casos de carcinoma de células transicionais da bexiga, leucemia, osteossarcoma, melanoma (especialmente da cavidade oral) e sarcomas de tecidos moles (CADIEU e OSTRANDER, 2007).

O uso de cães como modelo de doenças genéticas em humanos caracteriza uma oportunidade única para identificar os genes que têm grande efeito sobre a incidência de algumas doenças. Além disso, permite que algumas das doenças genéticas caninas sejam tratadas pela terapia gênica e a experiência obtida na terapia gênica em cães será importante para o desenvolvimento de terapia para doenças similares em seres humanos (OSTRANDER e KRUGLYAK, 2000).

Mesmo tratando-se de um pequeno número de amostras, o alto índice de hipermetilação encontrado no gene *FOXE1* (60%) comprova a hipótese que ilhas CpG em determinados genes encontram-se metiladas em casos de câncer. Portanto, uma vez que uma ilha CpG metilada for identificada, seu gene correspondente deverá ter importante papel na carcinogênese (USHIJIMA et al., 2006). No câncer gástrico em humanos, por exemplo, estudos comprovam que os genes supressores de tumor *CDKN2A* (p16), *CDH1* (E-cadherin) e *MLH1* encontram-se inativados devido à metilação (FERRASI et al., 2010), com frequência superior à inativação por mutações gênicas (USHIJIMA e SASAKO, 2004).

O número reduzido de casos analisados se deve à baixa incidência do carcinoma de células escamosas em cães no Hospital Veterinário da FMVZ – UNESP, Botucatu. No entanto, todos os animais atendidos com a referida doença e com indicação de excisão cirúrgica do tumor, serão incluídos em etapas futuras deste estudo.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, observou-se que a técnica para avaliar o padrão de metilação do gene *FOXE1* em seres humanos pode ser utilizada para a mesma avaliação em cães. A correlação destes dados moleculares com parâmetros clínicos e histopatológicos pode ter valor diagnóstico e prognóstico e ainda ser utilizado como marcador tumoral para tomada de decisão terapêutica e abordagem cirúrgica.

8. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO TRABALHO

Este trabalho estabelece uma parceria entre o Hemocentro da Faculdade de Medicina e a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu e deverá ter continuidade com a realização das seguintes etapas:

- Análise da expressão do gene *FOXE1* por *Real Time* PCR com o intuito de validar o silenciamento transcricional do gene hipermetilado em tecidos normais adjacentes e sangue periférico.
- Correlação dos achados moleculares com dados clínicos, histopatológicos e estadiamento do câncer.
- Definição de biomarcadores que possam ser utilizados na tomada de decisão terapêutica e abordagem cirúrgica.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATTWOOD, J.T.; YUNG, R.L.; RICHARDSON, B.C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.59, n.2, p.241-257, 2002.

BRUNE, K.; HONG, S.M.; LI, A.; YACHIDA, S.; ABE, T.; GRIFFITH, M.; YANG, D.; OMURA, N.; ESHLEMAN, J.; CANTO, M.; SCHULICK, R.; KLEIN, A.P.; HRUBAN, R.H.; IACOBUZIO-DONOHUE, C.; GOGGINS, M.; Genetic and epigenetic alterations of familial pancreatic cancers. **American Association for Cancer Research**, v.17, n.12, p. 3536-42, 2008.

CADIEU, E.; OSTRANDER, E.A. Canine genetics offers new mechanisms for the study of human cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.16, n.11, p.2181-2183, 2007.

CHADWICK, B.P.; OBERMAYR, F.; FRISCHAUF, A.M. *FKHL15*, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. **Genomics**, v.41, n.3, p. 390-396, 1997.

CUESTA, I.; ZARET K.S.; SANTISTEBAN, P. The forkhead factor *FOXE1* binds to the thyroperoxidase promoter during thyroid cell differentiation and modifies compacted chromatin structure. **Molecular and Cellular Biology**, v.27, n.20, p.7302-7314, 2007.

FERRASI, A.C.; PINHEIRO, N.A.; RABENHORST, S.H.; CABALLERO, O.L.; RODRIGUES, M.A.; DE CARVALHO, F.; LEITE, C.V.; FERREIRA, M.V.; BARROS, M.A.; PARDINI, M.I.M.C. *Helicobacter pylori* and EBV in gastric carcinomas: methylation status and microsatellite instability. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, n.3, p.312-9, 2010.

FERREIRA, I.; RAHAL, S.C.; FERREIRA, J.; CORRÊA, T.P. Terapêutica no carcinoma de células escamosas cutâneo em gatos. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.1027-1033, 2006.

FERREIRA, I.; RAHAL, S.C.; ROCHA, N.S.; GOUVEIA, A.H.; CORRÊA, T.P.; CARVALHO, Y. K.; BAGNATO, V.S. Hematoporphyrin-based photodynamic therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in cats. **Veterinary Dermatology**, v.20, n.3, p.174-178, 2009.

GROSSMAN, D.; LEFFEL, D.J. The molecular basis of nonmelanoma skin cancer: new understanding. **Archives of Dermatology**, v.133, n.10, p.1263-70, 1997.

HANNENHALLI, S.; KAESTNER, K.H. The evolution of *Fox* genes and their role in development and disease. **Nature Reviews Genetics**, v.10, n.4, p.233-240, 2009.

HOMOLOGENE:3291. Gene conserved in Euteleostomi. 2010. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/homologene/3291>>. Acesso em 21 de março de 2010.

KATOH, M. Human *FOX* gene family (Review). **International Journal of Oncology**, v.25, n.5, p.1495-1500, 2004.

KIRKNESS, E.F.; BAFNA, V.; HALPERN, A.L.; LEVY, S.; REMINGTON, K.; RUSCH, D.B.; DELCHER, A.L.; POP, M.; WANG, W.; FRASER, C.M.; VENTER, J.C. The dog genome: survey sequencing and comparative analysis. **Science**, v.301, n.5641, p.1898-1903, 2003.

LANDA, I.; RUIZ-LLORENTE, S.; MONTERO-CONDE, C.; INGLADA-PÉREZ, L.; SCHIAVI, F.; LESKELÄ, S.; PITA, G.; MILNE, R.; MARAVALL, J.; RAMOS, I.; ANDÍA, V.; RODRÍGUEZ-POYO, P.; JARA-ALBARRÁN, A.; MEORO, A.; DEL PESO, C.; ARRIBAS, L.; IGLESIAS, P.; CABALLERO, J.; SERRANO, J.; PICÓ, A.; POMARES, F.; GIMÉNEZ, G.; LÓPEZ-MONDÉJAR, P.; CASTELLO, R.; MERANTE-BOSCHIN, I.; PELIZZO, M.R.; MAURICIO, D.; OPOCHER, G.; RODRÍGUEZ-ANTONA, C.; GONZÁLEZ-NEIRA, A.; MATÍAS-GUIU, X.; SANTISTEBAN, P.; ROBLEDO, M. The variant rs1867277 in *FOX E1* gene

confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. **PLoS Genetics**, v.5, n.9, 2009.

MYATT, S. S.; LAM, E. W. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n.11, p.847-849, 2007.

OSTRANDER, E.A.; KRUGLYAK, L. Unleashing the canine genome. **Genome Research**, v.10, n.9, p.1271-1274, 2000.

RAMOS, E.A.S. **Hipermetilação de ilhas de CpG dos genes *CXCL12* e *ESR1*: correlação com os dados clínico-patológicos em câncer de mama.** 2009. 130p. Dissertação (Mestrado em Patologia, área de Concentração em Patologia). Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná, 2009.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, v.174, n.3, p.341-348, 2006.

SINGAL, R.; GINDER, G.D. DNA methylation. **Blood**, v.93, n.12, p.4059-4070, 1999.

SWITONSKI, I.; SZCZERBAL, J.; NOWACKA, M. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. **Journal of Applied Genetics**, v.45, n.2, p.195-214, 2004.

USHIJIMA, T.; NAKAJIMA, T.; MAEKITA, T. DNA methylation as a marker for the past and future. **Journal of Gastroenterology**, v.41, n.5, p.401-407, 2006.

USHIJIMA, T.; SASAKO, M. Focus on gastric cancer. **CancerCell**, v.5, n.2, p.121-125, 2004.

VENZA, I.; VISALLI, M.; TRIPODO, B.; LENTINI, M.; TETI, D.; VENZA, M. Investigation into *FOXE1* genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, v.162, n.3, p.681-683, 2010.

VENZA, I.; VISALLI, M.; TRIPODO, B.; LENTINI, M.; TETI, D.; VENZA, M. *FOXE1* is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. **British Journal of Dermatology**, v.162, n.5, p. 1093-1097, 2010b.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 4.ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. 864p.

WOLF, J.C.; GINN, P.E.; HOMER, B.; FOX, L.E.; KURZMAN, I.D. Immunohistochemical detection of p53 tumor suppressor gene protein in canine epithelial colorectal tumors. **Veterinary Pathology**, v.34, n.5, p.394-404, 1997.