



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de Botucatu



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E
DESENVOLVIMENTO – BIOTECNOLOGIA MÉDICA
MESTRADO PROFISSIONAL

Luanda Severino de Menezes

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *FOXE1*
EM CÂNCER GÁSTRICO**

BOTUCATU

2013

Luanda Severino de Menezes

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *FOXE1*
EM CÂNCER GÁSTRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica (Mestrado Profissional) do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Camargo Ferrasi

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Inês de Moura Campos Pardini

Botucatu

2013

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

Menezes, Luanda Severino de.

Avaliação da expressão gênica de *FOXE1* em câncer gástrico / Luanda Severino de Menezes. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Adriana Camargo Ferrasi

Coorientador: Maria Inês de Moura Campos Pardini

Capes: 20804008

1. Estômago – Câncer. 2. Genética – Expressão. 3. Câncer – Aspectos genéticos. 4. Reação em cadeia de polimerase.

Palavras-chave: Câncer gástrico; Expressão gênica; *FOXE1*; Metilação.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade. Porque se tornará assim uma máquina utilizável, e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto. A não ser assim, ele se assemelhará, com seus conhecimentos profissionais, mais a um cão ensinado do que a uma criatura harmoniosamente desenvolvida. Deve aprender a compreender as motivações dos homens, suas quimeras e suas angústias para determinar com exatidão seu lugar exato em relação a seus próximos e à comunidade... O ensino deveria ser assim: quem o receba o recolha como um dom inestimável, mas nunca como obrigação penosa".

Albert Einstein em "Como vejo o mundo"

*Dedico este trabalho
à minha família e a todos
os pacientes que viveram o
câncer.*

Agradecimientos



A Deus, luz da minha vida, que tornou tudo possível e me deu forças para continuar nos momentos mais difíceis.

À minha mãe, que sempre aceitou minhas decisões, guiou meus passos e me ensinou a ser forte. Gostaria de poder compartilhar mais momentos com você...

Ao meu pai, por seu apoio incondicional e por estar presente em todos os momentos.

À minha família, meu porto-seguro, obrigada por me ensinarem os verdadeiros valores. Vocês são fonte de inspiração para todos os meus passos e o motivo real de todas as minhas decisões.

À Dra. Adriana Camargo Ferrasi, pela orientação, pela companhia e pelas inúmeras conversas em nosso trajeto Bauru – Botucatu. Obrigada por seu exemplo de vida de profissionalismo.

À Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, co-orientadora deste trabalho, pela oportunidade de aprendizado e crescimento.

À Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto. Agradeço pela confiança depositada e pelos inúmeros ensinamentos.

À Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pela parceria, pelas considerações e sugestões durante o exame geral de qualificação que contribuíram imensamente para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Hemocentro de Botucatu – HC da Faculdade de Medicina – UNESP, pelo suporte acadêmico e científico.

Aos docentes do Departamento de Cirurgia e Ortopedia pela colaboração. Em especial ao Dr. Celso Vieira de Souza Leite, Dr. Irio Gonçalves Júnior e Dr. Luiz Eduardo Naresse.

Ao Programa de Pós-Graduação “Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Aos docentes e amigos pelos ensinamentos e experiências compartilhadas.

À secretária do programa, Janisse, pela amizade e pelo auxílio sempre que necessário.

Ao Programa de Aprimoramento Profissional em Inovação Tecnológica em Diagnóstico e Pesquisa Laboratorial pela oportunidade de experimentar a vida profissional de maneira tão valiosa.

Aos funcionários do Laboratório de Rotinas Diagnósticas em Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu (Máercio, Regina, Sarita, Silvia, Rosângela, Rita e Aprimorandos) pelos ensinamentos e pelo apoio durante o Aprimoramento Profissional.

Aos amigos do Laboratório de Pesquisas em Biologia Molecular do Hemocentro, por me acompanharem nessa etapa da minha vida, vocês foram essenciais e especiais em cada momento.

Ao Júnior, por me apoiar em minhas decisões, por estar presente nos bons momentos e nas horas mais difíceis.

À grande amiga Miriane de Oliveira, obrigada pelos conselhos, pela companhia e pela cumplicidade.

Ao Hospital Estadual Bauru “Dr Arnaldo Prado Curvêllo”. Obrigada aos amigos e funcionários pelo apoio durante a pesquisa.

A todos os meus professores. Vocês sempre foram exemplos para minha vida.

Aos pacientes com câncer, em especial aos que concordaram em participar deste estudo em um momento tão difícil.

A todos que de maneira direta ou indireta, participaram da realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Divisões anatômicas do estômago.....	15
Figura 2: Histopatologia dos adenocarcinomas Intestinal e Difuso.....	16
Figura 3: Classificação de <i>Borrmann</i>	16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: TNM Patológico.....	18
Tabela 2: pTNM.....	19
Tabela 3: Sequências de oligonucleotídeos iniciadores para o gene <i>FOXE1</i>	28
Tabela 4: Dados Clínicos, Demográficos e Anatomopatológicos dos pacientes.	32
Tabela 5: Associação entre o <i>status</i> de metilação em <i>FOXE1</i> , idade, sexo e aspectos clinico patológicos.....	34
Tabela 6: Dados Clínicos, Demográficos e Anatomopatológicos dos pacientes selecionados para análise de Expressão Gênica de <i>FOXE1</i>	35
Tabela 7: Análise da expressão gênica de <i>FOXE1</i> em relação a idade, sexo e classificação histológica	36
Tabela 8: Relação entre Metilação X Expressão Gênica de <i>FOXE1</i>	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitro
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
cDNA	DNA complementar
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotideos Fosfatados
EBV	Vírus <i>Epstein Barr</i>
CG	Câncer Gástrico
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i>
<i>FOXE1</i>	<i>Forkhead box E1</i>
H. Pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JCGC	<i>Japanese Classification of Gastric Carcinoma</i>
mM	Milimolar
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PET-CT	<i>Scan Positron Emission Tomography</i>
RNA	Acido ribonucleico ou <i>ribonucleic acid</i>
TAC	Tomografia Axial Computorizada
TR	Transcriptase Reversa
V	Volts

Sumário

Resumo	11
<i>Introdução</i>	13
Histopatologia	14
Diagnóstico	17
Estadiamento	17
Tratamento e Sobrevida	19
Etiologia	20
<i>Objetivos</i>	23
Objetivo Geral	24
Objetivos específicos	24
<i>Casuística</i>	25
Seleção de Pacientes	26
<i>Metodologia</i>	27
Amostras	28
Extração DNA	28
Análise da Metilação	28
Expressão Gênica de <i>FOXE1</i>	29
Extração de RNA	29
Tratamento com DNase	30
Reação RT- PCR	30
qPCR	30
<i>Resultados</i>	31
Dados Clínicos, Demográficos e Anatomopatológicos	32
Análise Estatística	33
Metilação em <i>FOXE1</i>	33
Expressão Gênica de <i>FOXE1</i>	35
Relação Metilação x Expressão Gênica de <i>FOXE1</i>	36
<i>Discussão e Considerações Finais</i>	38
<i>Referências Bibliográficas</i>	43
<i>Anexos</i>	49
Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu.	50

Resumo

O câncer gástrico é mundialmente a segunda causa de morte por câncer. No Brasil está entre os cinco neoplasias mais incidentes, mostrando-se como um grave problema de saúde pública. O conhecimento do padrão de expressão gênica de genes supressores tumorais e protooncogenes é fundamental para o esclarecimento dos mecanismos desta carcinogênese. O gene *FOXE1* (*forkhead box E1*) pertence a uma grande família de fatores de transcrição envolvidos em processos de crescimento e diferenciação celular. Pesquisas recentes têm demonstrado o papel determinante de *FOXE1* na gênese de certos tipos de neoplasias. Assim, a análise da expressão gênica de *FOXE1* em amostras de tumores gástricos faz-se necessária para esclarecer seu possível envolvimento neste carcinogênese. O DNA foi extraído de 89 amostras de tumores gástricos, com seus respectivos tecidos normais adjacentes. Após o tratamento com bissulfito de sódio, o padrão de metilação foi determinado por PCR específica para metilação (MSP-PCR) com a visualização dos resultados em poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata. 86,5% das amostras apresentaram metilação em *FOXE1*, sendo o mesmo padrão encontrado em tecidos normais adjacentes 74,2%. Não houve significância estatística quando os resultados foram agrupados de acordo com o sexo, tipo histológico e estadiamento. A expressão gênica foi avaliada através de qPCR para 13 dos 89 pacientes incluídos no estudo. Obteve-se para cada paciente a razão (T/N) comparando a expressão gênica da amostra de tecido tumoral (T) em relação à expressão do tecido normal adjacente ao tumor (N). 8 amostras (61,5%) apresentaram um aumento da expressão do *FOXE1*, com uma média de 1,6. Dentre as 5 (38,5%) amostras com QR abaixo de 1, isto é, com expressão do *FOXE1* abaixo do tecido normal, a média foi de 0,7. Quanto à concordância entre o estado de metilação em *FOXE1* e a sua expressão gênica, em 10 amostras (76,9%) não houve concordância nos resultados. Apesar de apresentarem metilação em *FOXE1* foi constatada expressão gênica. Para 3 (23,1%) casos os resultados foram concordantes. Em 2 (15,4%) casos não metilados verificou-se expressão gênica e 1 (7,7%) caso estava metilado com ausência de expressão gênica para *FOXE1*. Os resultados indicam que a metilação em *FOXE1* é um evento frequente em tumores gástricos. Avaliar seu papel neste processo é imprescindível, pois o conhecimento do padrão de expressão gênica de fatores de transcrição que atuam na regulação do

ciclo celular é um passo fundamental na identificação de possíveis vias carcinogênicas e marcadores tumorais.

Palavras-Chave: Câncer Gástrico. Expressão gênica. *FOXE1*. Metilação.

A neoplasia gástrica maligna é a quarta mais incidente no mundo. Sua incidência tem declinado nos últimos anos, fato que pode estar relacionado à mudança na conservação dos alimentos, melhora nos hábitos alimentares e condições de higiene, porém, ainda representa mundialmente a segunda causa de óbitos por câncer. No Brasil, dados epidemiológicos para o ano de 2012 revelam um risco estimado de 13 novos casos de câncer de estômago a cada 100 mil homens e 7 para cada 100 mil mulheres, colocando a neoplasia gástrica entre as cinco mais incidentes no país. É um câncer duas vezes mais comum em homens, colocando-se como o segundo mais frequente nas regiões Norte e Nordeste e o quarto nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Para as mulheres ocupa a quarta posição na região Norte, a quinta na região Centro-Oeste e a sexta nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste (INCA 2012).

Trata-se de uma patologia rara antes dos 40 anos de idade, com seu pico máximo de incidência registrado na sétima década de vida. A taxa de mortalidade apresentam-se até três vezes maior em grupos de baixo nível sócio econômico. Apura-se em dados recentes que 70% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (INCA 2012).

Histopatologia

O câncer gástrico apresenta-se em três tipos histológicos: linfoma, que representa 3% dos casos, leiomiossarcoma, caracterizado por iniciar-se em tecidos que dão origem aos músculos e ossos e adenocarcinoma gástrico, sendo o mais freqüente, responsável por até 95% dos tumores diagnosticados (Fuchs e Mayer, 1995; Ji *et al.*, 2002).

O câncer gástrico pode ocorrer em qualquer local das cinco principais áreas do órgão: cárdia, antro e piloro, fundo e corpo, atingindo gradualmente a parede do órgão que é constituída por cinco camadas: serosa, subserosa, muscular, submucosa e mucosa (Cotran *et al*, 2000). O sistema de drenagem linfática registra 33 gânglios linfáticos regionais, classificados em três grupos de acordo com a localização do tumor primário (Kitagawa *et al*, 2002).

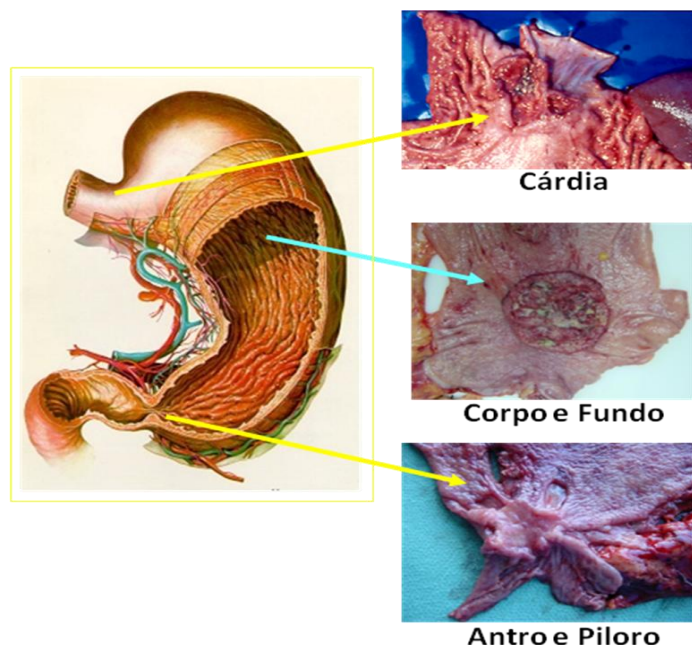


Figura 1: Divisões anatômicas do estômago: cárdia, corpo, fundo e antro/píloro

Fonte: <http://cc0208.med.up.pt/cirurgia/teoricas/estomago.ppt>, acesso em 02/01/2013.

A anatomia do estômago permite a classificação da carcinogênese gástrica por estadiamentos. Os sistemas de estadiamento mais utilizados atualmente são o de Borrmann, baseado no aspecto macroscópico do tumor, os sistemas de Laurén e o da Organização Mundial da Saúde, OMS, baseados em achados microscópicos.

O sistema proposto pela OMS considera o padrão histológico encontrado e classifica os tumores de acordo com o predominante. O adenocarcinoma subdivide-se em quatro tipos, de acordo com seu padrão de crescimento (papilar, tubular, mucinose e em anel de sinete) (Watanabe *et al.*, 1997).

Segundo *Laurén*, os adenocarcinomas gástricos podem ser classificados conforme seu aspecto microscópico em dois tipos, o intestinal e difuso (Lauren, 1965). O tipo intestinal tem sua ocorrência ligada a situações pré-cancerosas seqüenciais e progressivas, iniciando com a gastrite crônica, gastrite atrófica, metaplasia intestinal, displasia e culminando em carcinoma. Ocorre em indivíduos com idades mais avançadas, com incidência maior no sexo masculino (Correa, 1992; Stemmermann, 1994). O tipo difuso acomete indivíduos mais jovens, com frequência um pouco mais elevada no sexo feminino. Registra altas taxas de ocorrência familiar, sugerindo sua ocorrência ligada a fatores genéticos (Sipponen, 1985). O aspecto das células neoplásicas é distinto nos dois tipos, o tipo intestinal é caracterizado pela presença de células neoplásicas coesas formando estruturas

tubulares e uma massa discreta, enquanto que no difuso ocorrem células tumorais pequenas e dispersas que se infiltram difusamente na parede do estômago (Howson *et al.*, 1986)

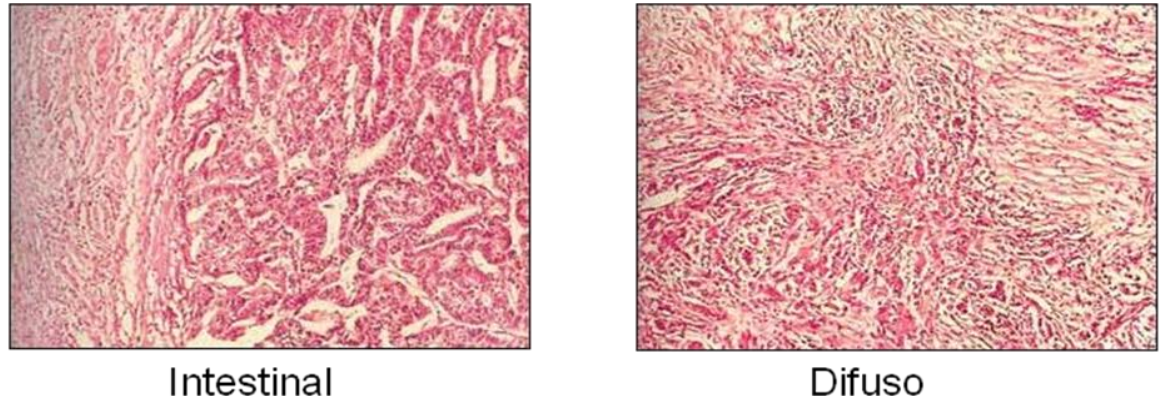


Figura 2: Histopatologia dos adenocarcinomas Intestinal e Difuso, segundo *Laurén*.

Fonte: <http://cc0208.med.up.pt/cirurgia/teoricas/estomago.ppt>, acesso em 02/01/2013.

Macroscopicamente, o sistema de *Borrmann* divide o carcinoma gástrico em cinco tipos, dependendo da aparência da lesão. Borrmann I: polipóide ou fungiforme e vegetante; Borrmann II: lesão ulcerada com bordas elevadas; Borrmann III: lesão ulcerada infiltrando a parede gástrica; Borrmann IV: lesões difusamente infiltrativas, também denominada “linite plástica” e Borrmann V: tumores que não se encaixam nas demais categorias. A classificação de *Borrmann* é ilustrada na figura 3.

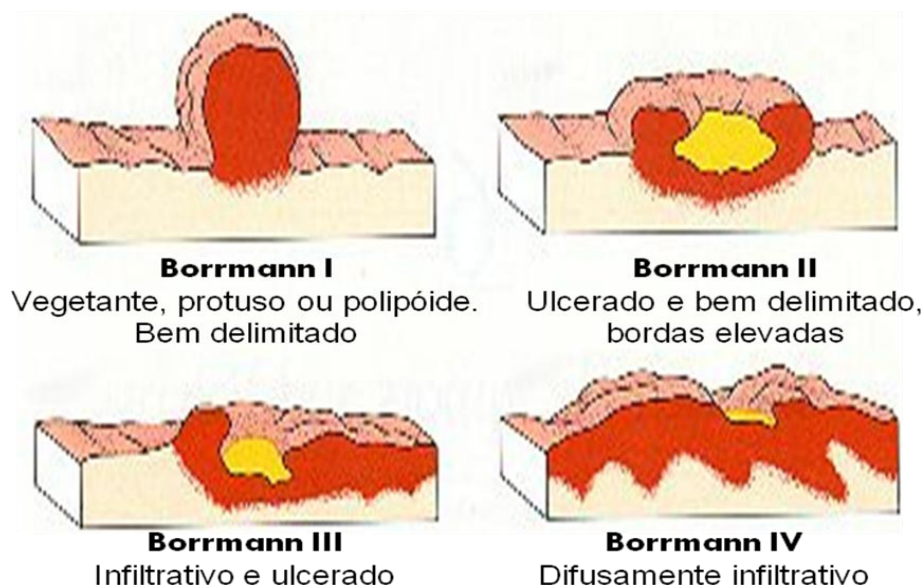


Figura 3: Classificação de *Borrmann* proposta para classificar macroscopicamente, o tumor gástrico em cinco tipos, dependendo da aparência e grau de infiltração da lesão.

Fonte: <http://www.gastro-centro.com/atlasdig5.php>

Diagnóstico

A maior parte dos casos de câncer gástrico é diagnosticada em estádios avançados da doença, comprometendo a eficácia dos procedimentos terapêuticos e contribuindo para o mau prognóstico. Nos países ocidentais não há estratégias de rastreamento. Na maior parte dos casos os pacientes apresentam quadro clínico assintomático ou inespecífico, dificultando o diagnóstico precoce. Os sintomas cursam de acordo com a localização anatômica do tumor, podendo incluir emagrecimento, anemia, vômitos, náuseas, anorexia, plenitude pós prandial e em alguns casos hematêmese (INCA, 2010).

O diagnóstico clínico é realizado principalmente através de endoscopia digestiva alta, que permite visualizar a lesão em uma análise macroscópica auxiliando no planejamento cirúrgico. O exame permite ainda, a realização de biópsia para obtenção de material para estudo histológico e pode ser associado a tomografias computadorizadas, ultrassonografias endoscópicas, exames radiológicos de duplo contraste e avaliações bioquímicas (Mincis e Possik, 2002; INCA, 2010).

Estadiamento

Uma vez diagnosticado, a terapêutica deve ser instituída baseada no estadiamento do tumor.

Clinicamente a ecoendoscopia e a tomografia axial computadorizada (TAC) apresentam-se como os principais meios para estabelecer o estadiamento. Através destes exames pode-se determinar o número de camadas do estômago atingidas e analisar o comprometimento dos órgãos, vasos e gânglios adjacentes. A análise da presença de metástases e de acometimento ganglionar é dificultada por estes meios devido à capacidade limitada de penetração das sondas (Motoo *et al.*, 1994).

A ressonância magnética nuclear apresenta alta sensibilidade na identificação de doença metastática e lesões hepáticas suspeitas, sendo ainda uma alternativa nas situações em que há contra-indicação à TAC por alergia ao contraste ou insuficiência renal. A PETCT Scan (*Scan Positron Emission Tomography*) permite identificar locais de metástases com alta sensibilidade devido à detecção de anormalidades metabólicas através da tomografia por emissão de *pósitrons*. Pode

ainda auxiliar no estadiamento, detectar precocemente a recidiva de tumores e verificar resposta à terapêutica. A laparoscopia e a videolaparoscopia podem auxiliar no estadiamento contribuindo para selecionar de forma mais efetiva pacientes candidatos à ressecção cirúrgica, contra indicando uma possível laparotomia (Mincis e Possik, 2002; Mincis e Mincis, 2008).

O estadiamento patológico é realizado através da análise microscópica proveniente da ressecção cirúrgica. Atualmente existem dois principais sistemas de estadiamento que levam em conta critérios como o tamanho do tumor, invasão ganglionar com linfonodos acometidos e presença de metástases. Nos países orientais, o sistema utilizado foi instituído pela JCGC (*Japanese Classification of Gastric Carcinoma*). No Brasil utiliza-se a classificação pTNM (Tabela 1), estabelecido pela AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) para compor o estadiamento tumoral (Tabela 2).

Tabela 1: TNM Patológico, classificação baseada na observação microscópica do material proveniente de ressecção cirúrgica, visando avaliar a profundidade do tumor (T), presença de linfonodos comprometidos (N) e ocorrência de metástase à distância (M).

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
T2a	Tumor invade a muscular própria
T2b	Tumor invade subserosa
T3	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
Metástase à Distância (pM)	
Mx	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M0	Sem metástase à distância
M1	Com metástase à distância

Fonte: Adaptado do Cancer Staging Handbook, 2002.

Tabela 2: Estadiamento pTNM baseado nos dados obtidos na análise pTNM (tabela 1).

Estadiamento		pTNM	
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N1	M0
II	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3		
IIIA	T1	N0	M0
	T2a/b	N1	M0
IIIB	T3	N2	M0
IV	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Adaptado do Cancer Staging Handbook, 2002.

Tratamento e Sobrevida

Atualmente o sucesso cirúrgico e terapêutico para um paciente diagnosticado com câncer gástrico é relatado como uma sobrevida global de cinco anos. Os números variam mundialmente, chegando a 21% em indivíduos europeus (Berrino *et al.*, 1999; Akoh e Macintyre, 1992) e até 47% no Japão (Hisamichi e Sugawara, 1984), retratando efeitos benéficos que programas rastreamento podem apresentar.

No Brasil, poucos estudos relatam estes dados. Observa-se uma sobrevida global em 5 anos muito inferior aos países desenvolvidos, atingindo uma taxa de apenas 9% (Bustamante-Teixeira *et al.*, 2006).

O tratamento padrão para pacientes com câncer gástrico é a gastrectomia, que pode ser total ou parcial. A opção cirúrgica baseia-se na localização, tamanho e estadiamento do tumor. Naqueles localizados na porção alta e média do corpo gástrico, indica-se a gastrectomia total, e nos situados abaixo dessa região, a ressecção parcial. De acordo com o estadiamento da doença, a abordagem cirúrgica poderá ser estendida a uma linfadenectomia, que pode ser orientada por marcadores através da técnica de linfonodo sentinela. Outros tratamentos incluem a quimioterapia e a radioterapia, que podem ser realizadas em diversos esquemas terapêuticos, de acordo com as características clínico-patológicas do paciente (Hiratsuka *et al.*, 2001).

Para pacientes em estadios avançados da doença existem ainda os tratamentos paliativos, que podem incluir todas as abordagens relatadas anteriormente, porém, sem a intenção curativa. Os critérios para realização de cirurgias de ressecção paliativa ou tratamento paliativo endoscópico levam em conta, dentre outros fatores, o alívio de sintomas e melhora da qualidade de vida do paciente. Comumente são realizadas abordagens cirúrgicas de derivação para prolongar o uso do trato gastrointestinal ou apenas para tratamento de complicações como perfurações e hemorragias (Bandoh *et al.*, 1991).

Etiologia

A etiologia da doença ainda não está totalmente definida. Estudos mostram que a gênese dos tumores gástricos é multifatorial e complexa, envolvendo além de fatores ambientais e hábitos de vida, aspectos intrínsecos, como alterações genéticas e epigenéticas.

Estudos epidemiológicos relatam que a ingestão regular de alimentos conservados inadequadamente, com alto teor de sal ou defumados são associados ao aumento do risco para o desenvolvimento do câncer gástrico (Buiatti *et al.*, 1989; Palli *et al.*, 2001; De Stefani *et al.*, 2004). O consumo de legumes crus e cozidos, frutas frescas e cítricas demonstraram possíveis efeitos protetores para o estômago, atribuídos, principalmente, à presença de micronutrientes como o ácido ascórbico, tocoferol e folatos, que agem como antioxidantes e podem interromper a formação interna de N-nitrosos, considerados potentes agentes carcinógenos gástricos (Hu *et al.*, 1988; Ye *et al.*, 1998). Observou-se, porém, que a suplementação artificial destes nutrientes, a curto prazo, não demonstrou nenhum efeito substancial benéfico sobre a incidência ou mortalidade por câncer gástrico (Blot *et al.*, 1993; Plummer *et al.*, 2007).

A infecção por *Helicobacter pylori* tem sido definida como o principal fator de risco para o desenvolvimento da neoplasia gástrica (Israel e Peek, 2001; Peek Jr. e Blaser, 2002). A patogenidade da infecção por *H. Pylori* está relacionada, principalmente, aos genótipos *cagA* e *vacA* (Yamaoka *et al.*, 1999). A intensidade da resposta inflamatória causa danos às células epiteliais da mucosa gástrica, podendo tornar-se crônica conferindo o risco de desenvolvimento da neoplasia (Israel e Peek, 2001; Fox e Wang, 2002).

O vírus *Epstein Barr* é um patógeno de alta prevalência que estabelece uma infecção persistente na maior parte dos pacientes. Estima-se que mais de 90% da população mundial esteja infectada (Crawford, 2001; Callan, 2004). A infecção por *Epstein Barr* está associada ao desenvolvimento de diversas neoplasias, dentre elas, o câncer gástrico (Burke et al., 1990; Takada K, 2000). O mecanismo de ação do *Epstein Barr* na carcinogênese ainda não está totalmente elucidado, estudos demonstram que proteínas expressas pelo vírus atuam diretamente como oncogenes, além de causar mutações em genes supressores tumorais ao integrar seu DNA viral ao material genético humano (Ribeiro-Silva e Zucoloto, 2003).

Dentre os fatores intrínsecos relacionados à carcinogênese gástrica, as alterações genéticas e epigenéticas demonstram ter um importante papel no controle da expressão de genes que regulam eventos do crescimento celular, como proto oncogenes e genes supressores de tumores (Ushijima e Okochi-Takada, 2005; Kurdistani, 2007). Dentre as alterações epigenéticas, a metilação de DNA tem se mostrado relevante na carcinogênese. Trata-se de uma alteração fundamental para a regulação da expressão gênica, considerada reversível por não alterar a sequência do DNA, e herdável, por ser transmitida às células filhas após sucessivos ciclos de divisão celular (Fackler et al, 2004; Ushijima, 2005; Rando, 2006). A metilação do DNA ocorre com a adição de um radical *metil* no carbono 5' do anel pirimídico da base citosina (C) seguida de uma base guanina (G), as chamadas ilhas CpGs, encontradas principalmente na região promotora dos genes (Hermann; Habuchi *et al.* 2001).

Silenciar um gene intacto *via* metilação é um evento normal do desenvolvimento e da diferenciação celular, entretanto, a metilação aberrante nas regiões promotoras de protooncogenes ou genes supressores de tumor pode provocar perda patológica de função deste gene. Estudos demonstram que em diversos tipos de neoplasias genes supressores tumorais são inativados por metilação aberrante de sua região promotora (Esteller, 2005).

Os genes *Forkhead Box*, expressam uma família de fatores de transcrição que se ligam ao DNA por meio de um domínio *forkhead*. Estes genes são expressos em diversos tecidos e desempenham importantes papéis na regulação da expressão de genes envolvidos com a proliferação e diferenciação celular. Os genes desta família são identificados por 17 subclasses (A-Q), entre os quais encontra-se o gene *FOXE1* (*forkhead box E1* – também conhecido como FKHL15, TITF-2 e TTF2). O

gene *FOXE1* está localizado no cromossomo 9q22, possui um único *exon* com regiões ricas em CG, importante alvo para metilação de DNA (Chadwick *et al.*, 1997; Katoh e Katoh, 2004).

FOXE1 é o regulador central dos fatores de transcrição e cofatores que iniciam a diferenciação da tireóide (Parlato *et al.*, 2004). Exerce atividade fundamental durante as fases embrionárias do desenvolvimento e durante todo o ciclo vital; é essencial para a formação da glândula tireóide, bem como para a manutenção do estado diferenciado da glândula em adultos (De Felice *et al.*, 2004). Também envolvido no fechamento do palato secundário e morfogênese dos folículos pilosos (Dathan *et al.*, 2002). Estudos recentes têm demonstrado o papel decisivo do gene *FOXE1* na gênese de certos tipos de neoplasias, como câncer de pâncreas (Sato *et al.*, 2003; Matsubayashi *et al.*, 2006), câncer de mama (Weisenberger *et al.*, 2008), carcinoma folicular da tireóide (Gudmundsson *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2010) e carcinoma de células escamosas cutâneo (Venza *et al.*, 2010), o que demonstra a importância em analisar o possível envolvimento deste gene na carcinogênese gástrica.

O conhecimento do padrão de expressão de *FOXE1* em tumores gástricos pode demonstrar um possível estado de metilação do gene. Estes achados, relacionados aos dados clínicos, poderão auxiliar na busca de novos marcadores biomoleculares para diagnóstico tumoral precoce, possibilitando um melhor prognóstico e auxiliando o estabelecimento de metas terapêuticas específicas.

Objetivo Geral

- Verificar o padrão de metilação no gene *FOXE1* em amostras de tumores gástricos.

Objetivos específicos

Analisar amostras de tumores gástricos e seus respectivos tecidos normais buscando:

- Analisar a expressão gênica de *FOXE1* para amostras de tumores gástricos;
- Verificar a relação entre o padrão de metilação de *FOXE1* e a expressão gênica verificada nos respectivos tumores;
- Estudar a possível correlação entre o padrão de metilação, a expressão gênica de *FOXE1* e os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes.

Casuística

Seleção de Pacientes

Foram incluídos neste estudo 89 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu e no Núcleo de Medicina Tropical, Departamento de Patologia na Universidade Federal do Ceará, com diagnóstico de câncer gástrico e indicação de gastrectomia total ou parcial.

Os pacientes convidados a participar do estudo foram orientados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (Processo 3907/2011).

Metodología

Amostras

Após a gastrectomia foram coletadas amostras de tecido tumoral e seus respectivos tecidos normais adjacentes. Análises histopatológicas garantiram que os tecidos tumorais consistiam em pelo menos 80% de células tumorais e que os tecidos normais adjacentes encontravam-se livres destas células. A classificação histológica foi realizada de acordo com o sistema de classificação de *Lauren* (1965), e os tumores foram estadiados de acordo com os critérios do TNM (*American Joint Committee on Cancer*, 2002). Os tecidos foram identificados e conservados em nitrogênio líquido até momento do uso.

Extração DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada de acordo com o protocolo de Foster e Twell, 1996, CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). A qualidade do material extraído foi avaliada por amplificação por Reação em Cadeia da polimerase (PCR), do gene constitutivo *GAPDH*.

Análise da Metilação

Para a análise do estado de metilação do *FOXE1* o DNA foi tratado com Bissulfito de Sódio (Sigma-Aldrich), conforme descrito em *Herman e colaboradores* (1996). O tratamento é realizado para a conversão de citosinas não metiladas em uracila por desaminação, ocorrendo conservação das citosinas metiladas. Posteriormente, realizou-se a técnica de PCR específica para a detecção de metilação (PCR-MSP), onde duas reações de PCR são realizadas utilizando-se diferentes pares de *primers* específicos para as situações metilado ou não metilado, obtidos em www.pathology2.jhu.edu/pancreas/primer.pdf.

TABELA 3 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores para análise MSP-PCR. Met: sequência metilada e nMet: sequência não metilada

GENE	Oligonucleotídeo (5'-3') <i>sense</i>	Oligonucleotídeo (5'-3') <i>antisense</i>
<i>FOXE1</i>	Met- TCG TAG GGT TGG AGA TTT AC	GAA ACG AAA ACA ACG AAA TCG
	nMet- TTT GTA GGG TTG GAG ATT TAT G	AAA ACA AAA CAA AAA CAA CAA AAT C

A mistura de PCR para 25 µL foi composta por: 1,5 U de *Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen*, 1X Tampão *Platinum* (Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) KCl 50 mM), 0,2 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada oligonucleotídeo iniciador, 100 ng de DNA e água estéril em quantidade suficiente para 25 µL. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos (desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

O produto amplificado nessas reações foi visualizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 6% (Sambrook *et al.*, 2001) corados por nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994). As amostras não metiladas amplificam uma região de 94 pb e as amostras *FOXE1* metiladas uma região de 88 pb.

Como controle positivo para o *status* metilado foram utilizadas amostras de DNA metiladas *in vitro* com o kit *Methylase-SssI* (New England Biolabs), segundo as especificações do fabricante. Para controle do gene não metilado, foram utilizadas as mesmas amostras, porém, sem o tratamento de metilação. Essas amostras controle passaram por tratamento com bissulfito de sódio e foram submetidas à PCR-MSP para o gene *FOXE1*, sendo suas bandas utilizadas como padrão para as análises dos tecidos tumorais e normais adjacentes

Durante a eletroforese utilizou-se ainda uma amostra de PCR sem DNA como controle negativo para contaminação.

Expressão Gênica de *FOXE1*

Dentre a casuística utilizada para análise de metilação, um grupo composto por 13 casos foi analisado para avaliar a possível relação entre o estado de metilação de *FOXE1* e sua expressão. Os pacientes foram selecionados de acordo com a disponibilidade de amostras tumorais para a extração de RNA em boa quantidade e qualidade.

Extração de RNA

As amostras de tecido mantidas em nitrogênio líquido foram pulverizadas com pistilo em banho de nitrogênio.

A extração do RNA foi realizada utilizando o *QIAmp RNA Mini Kit* (QIAGEN, Valencia, CA, USA), segundo especificações do fabricante.

Tratamento com DNase

Para inativar e remover qualquer contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com *DNase I* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) utilizando-se para cada amostra 10x *DNase I Reaction Buffer* e 1 U de DNase, em um volume final de 35µL, completado com água estéril. A mistura foi incubada com 0,5 µg de RNA (no mínimo) por 30 minutos a 37°C. A inativação da enzima *DNase I* foi realizada com a elevação da temperatura a 70°C por 5 minutos e 4°C por 5 minutos, mantendo a reação em gelo até o preparo da RT-PCR.

Reação RT- PCR

O RNA tratado com *DNase I* foi utilizado para a reação de RT utilizando o *Kit High Capacity cDNA* (Applied Biosystem, CA, USA), segundo as especificações do fabricante.

qPCR

A expressão de *FOXE1* foi avaliada por análise relativa da expressão gênica através de PCR em tempo real, qPCR, utilizando o sistema de detecção *TaqMan* (Life Technologies, EUA). Obteve-se para cada paciente a razão (T/N) comparando a expressão da amostra de tecido tumoral (T) em relação à expressão do tecido normal adjacente ao tumor (N).

A reação foi composta de 2x *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 1,0µL de *Assay by design* (Life Technologies, EUA) e 3,0µL do cDNA produto da reação de RT-PCR. Os ensaios foram realizados, em triplicata, no aparelho ABI 7500 *Applied Biosystems*, segundo as especificações do fabricante.

Resultados

Dados Clínicos, Demográficos e Anatomopatológicos

Foram incluídos neste estudo um total de 89 pacientes, sendo 39 (43,8%) procedentes da região de Fortaleza – CE e 50 (62,2%) da região de Botucatu – SP. Do total de pacientes incluídos, 60 (67,4%) eram do sexo masculino e 29 (32,6%) do sexo feminino. A idade média no momento de inclusão foi de 61 anos, o paciente mais jovem tinha 23 anos e o mais idoso 98.

A procedência, idade média, gênero, estadiamento, grau histológico, diferenciação e sítio de localização podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4: Dados Clínicos, Demográficos e Anatomopatológicos dos pacientes incluídos no estudo.

Característica	n=89
Procedência	
Fortaleza - CE [n 39]	43,8%
Botucatu - SP [n 50]	56,2%
Idade Média, anos	60,9%
Gênero, Masculino [n 29]	67,4%
Gênero, Feminino [n 60]	32,6%
Estadiamento [n 89]	
IA	4,5%
IB	5,6%
II	15,7%
IIIA	23,6%
IIIB	20,2%
IV	28,1%
Y	1,1%
0	1,1%

Tipo Histológico [n (%)]	
Intestinal [n 57]	64,0%
Difuso [n 31]	34,8%
Misto [n 1]	1,1%
Grau de Diferenciação [n (%)]	
Pouco Diferenciado [n=23]	25,8%
Moderado [n 28]	31,5%
Bem Diferenciado [n 4]	4,5%
Dados não coletados [n 34]	38,2%
Sítio de Localização [n (%)]	
Antro [n 41]	46,1%
Cardia [n 13]	14,6%
Corpo [n 9]	10,1%
Corpo/ Antro [n 1]	1,1%
Misto [n 13]	3,4%
Dados não coletados [n 22]	24,7%

y = classificação após tratamento inicial multimodal (INCA)

Análise Estatística

Para a análise estatística utilizou-se o teste do *qui-quadrado* ou *teste exato de Fisher*, quando necessário. Foi considerado como sendo de significância estatística $p\text{-value} \leq 0,05$.

Metilação em *FOXE1*

Em análise global, o gene *FOXE1* apresentou-se metilado em 86,5% das amostras estudadas. Na região de Botucatu-SP o índice de metilação foi de 88%,

levemente superior ao índice de Fortaleza-CE, com 84,62% de pacientes com *FOXE1* metilado. Não houve diferença significativa quando se considerou a procedência dos pacientes. Outros dados das correlações realizadas podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5: Associação entre o *status* de metilação em *FOXE1*, idade, sexo e aspectos clínico patológicos dos pacientes.

	<i>FOXE1</i> Metilado	<i>FOXE1</i> Não Metilado	<i>P-value</i>
Idade Média	60,7	61,8	
Distribuição por Idade			
< 60 anos	11 (91,7%)	1 (8,3%)	1,000
≥60 anos	66 (85,7%)	11 (14,3%)	
Gênero			
Feminino	26 (89,7%)	3 (10,3%)	0,744
Masculino	51 (85%)	9 (15%)	
Laurèn			
Intestinal	24 (77,4%)	7 (22,6%)	0,103
Difuso	52 (91,2%)	5 (8,8%)	
Estadiamento			
0 – I	8 (80%)	2 (20%)	0,623
II – IV	67 (87%)	10 (13%)	
Procedência			
Botucatu – SP	44 (88%)	6 (12%)	0,757
Fortaleza – CE	33 (78,6%)	6 (14,28%)	
Sítio Anatômico			
Antro	35 (85,4%)	6 (14,6%)	0,078
Cardio	11 (84,6%)	2 (15,4%)	
Corpo	9 (100%)	0,000	
Corpo/Antro	0	1 (100%)	
Misto	3 (100%)	0,000	

Expressão Gênica de *FOXE1*

A qPCR para *FOXE1* foi realizada para 13 dos 89 pacientes incluídos no estudo. Os pacientes foram selecionados de acordo com a disponibilidade amostras tumorais para a extração de RNA em boa qualidade e quantidade.

Foram analisados os tecidos normais (N) e tumorais (T) desses os pacientes. Os dados que caracterizam o novo grupo podem ser visualizados na tabela 6.

Tabela 6: Dados Clínicos, Demográficos e Anatomopatológicos dos pacientes selecionados para análise de Expressão Gênica de *FOXE1*.

Características	n=	13
Procedência		
Fortaleza - CE [n=8]		61,5%
Botucatu - SP [n 5]		38,5%
Idade Média, anos		58,9%
Gênero, Masculino [n 9]		69,2%
Gênero, Feminino [n 4]		30,8%
Estadiamento [n (%)]		
0 e I [1]		7,7%
II a IV [12]		92,3%
Tipo Histológico [n (%)]		
Intestinal [9]		69,2%
Difuso [4]		30,8%

Os resultados foram individualmente analisados quanto à eficiência da amplificação do gene normalizador *β-actina*. Considerou-se aumentada a expressão de *FOXE1* quando a razão T/N foi maior que 1, isto é, um aumento da expressão de *FOXE1* no tumor quando comparado ao seu próprio tecido normal adjacente.

$$QR = \frac{\text{Expressão Tecido Tumoral}}{\text{Expressão Tecido Normal}}$$

Das 13 amostras analisadas 8 (61,5%) apresentaram um aumento da expressão do *FOXE1*, com uma QR média de 1,6.

Dentre as 5 (38,5%) amostras com QR abaixo de 1, isto é, com expressão do *FOXE1* abaixo do tecido normal, a média foi de 0,7. As análises podem ser melhor visualizadas na Tabela 7.

Tabela 7: Análise da expressão gênica de *FOXE1* em relação a idade, sexo e classificação histológica

n total = 13	Razão T/N > 1*	Razão T/N < 1*	P-value
	n = 8	n = 5	
Idade Média	57,4	60,8	
Distribuição por Idade			
< 60 anos	3 (60%)	2 (40%)	1,000
≥ 60 anos	4 (50%)	4 (50%)	
Gênero			
Feminino	3 (50%)	3 (50%)	1,000
Masculino	5 (55,6%)	4 (44,4%)	
Laurèn			
Intestinal	3 (100%)	0	0,230
Difuso	5 (50%)	5 (50%)	

*Razão T/N <1 = Expressão reduzida em relação ao tecido normal; T/N >1 Expressão aumentada em relação ao tecido normal.

Relação Metilação x Expressão Gênica de *FOXE1*

As amostras foram analisadas quanto à concordância entre o estado de metilação em *FOXE1* e a sua expressão gênica, com resultados apresentados na Tabela 7.

A metilação no DNA, entre outras funções, interfere na transcrição gênica, e esta pode ser fortemente inibida pela adição do radical metil. A não ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos pode resultar na ausência de transcrição gênica. Portanto, um resultado concordante seria a presença de metilação e a ausência de expressão gênica, ou o contrário, ausência de metilação e presença de expressão gênica.

Dentre os casos analisados, em 10 amostras (76,9%) não houve concordância nos resultados. Apesar de apresentarem metilação em *FOXE1* foi constatada expressão gênica.

Para 3 (23,1%) casos os resultados foram concordantes. Em 2 (15,4%) casos não metilados verificou-se expressão gênica e 1 (7,7%) caso estava metilado com ausência de expressão gênica para *FOXE1*.

Tabela 8: Relação de concordância entre Metilação X Expressão Gênica de *FOXE1*.

Metilação	Expressão Gênica	N = 13	%
M	E	10	76,9%
M	NE	1	7,7%
U	E	2	15,4%
U	NE	0	0

M = Metilado, U = Não Metilado, E = Expresso, NE = Não Expresso

Discussão e Considerações Finais

Apesar do declínio em sua incidência e mortalidade nas últimas décadas, o câncer gástrico permanece como um desafio para a oncologia e para a saúde pública. Mundialmente, verifica-se que existem poucos programas de rastreamento eficazes e que a maior parte dos casos de câncer de estômago são diagnosticados em estádios avançados da doença. O diagnóstico tardio torna o prognóstico pobre e limita as estratégias terapêuticas culminando, muitas vezes, em tratamentos paliativos com baixa expectativa de sobrevida.

Sabe-se que o câncer é uma doença multifatorial e que o conhecimento dos mecanismos da carcinogênese têm se mostrado como uma das poucas estratégias eficazes para a prevenção, diagnóstico e orientação da terapêutica.

Estudos recentes têm demonstrado que as alterações genéticas e epigenéticas podem interferir na expressão de genes chave que regulam eventos do crescimento celular, como proto oncogenes e genes supressores tumorais (Ushijima e Okochi-Takada, 2005; Kurdistani, 2007).

Há evidências de que a relação da metilação com o câncer pode estar baseada na hipometilação dos oncogenes (Szyf, 2003). Alguns autores correlacionam a ausência de metilação e alta expressão gênica de membros da família *FOX* a pior prognóstico para a doença. Em um estudo chinês com amostras de câncer colorretal (CRC), os resultados mostraram que a alta expressão de *FOXM1* foi estreitamente relacionada com a presença de metástase linfonodal, incidência de metástase hepática e estadio TNM avançado (Chu *et al.*, 2012).

Os genes *Forkhead Box*, expressam uma família de fatores de transcrição que se ligam ao DNA por meio de um domínio *forkhead*. Estes genes são expressos em diversos tecidos e participam da regulação da expressão de genes envolvidos com a proliferação e diferenciação celular. A desregulação dos genes *Forkhead Box* pode levar a doenças congênitas, diabetes *mellitus*, ou favorecer a carcinogênese (Chadwick *et al.*, 1997; Katoh e Katoh, 2004).

Tae-Hwan *et al.*, 2007 estudaram 174 tumores de bexiga e 21 mucosas normais para avaliar a expressão do gene *FOXO1* e *FOXG1*, genes que superexpressos podem induzir a parada do ciclo celular ou apoptose. Na análise, constataram que a expressão de mRNA para esses genes em tecidos tumorais eram mais elevados do que em tecidos de indivíduos normais ($p < 0,001$). A alta expressão *FOXO1* foi significativamente associada com o grau, estágio, recidiva, progressão e menor índice de sobrevivência ($p < 0,05$). Os níveis de expressão de *FOXG1* estavam

aumentados em pacientes evoluíram com pior prognóstico para a doença ($p = 0,019$).

Na embriogênese humana, o gene *FOXE1* é expresso no epitélio traqueano e esofagiano (Zannini *et al.*, 1997), um estudo envolvendo ratos avaliou a expressão de *FOXE1* ao longo de todo o ciclo vital e verificou que na embriogênese sua expressão é elevada nos epitélios que revestem o intestino primitivo. Verificou-se ainda que mais tarde, *FOXE1* é transcrito ao longo de toda a endoderme do intestino anterior. No esôfago a expressão é limitada à camada epitelial, com expressão significativa durante a embriogênese sendo detectado durante toda a vida embrionária, constatando-se nos adultos, níveis de expressão um pouco mais baixos (Dathan *et al.*, 2002).

Um estudo europeu realizou uma análise de polimorfismos em genes da família *FOX*, encontrando associações com hipotireoidismo e outras doenças tireoidianas. Dentre as correlações realizadas no grupo controle e os dados clínicos existentes, sugeriu-se uma possível associação entre variantes do gene *FOXE1* com transtornos de órgãos adultos derivados do intestino anterior embrionário. Estes órgãos incluem, dentre outros, componentes do trato gastrointestinal como a faringe, boca, palato, esôfago e estômago (Denny *et al.*, 2011).

As bases de dados genéticos (*GeneCard*, 2012) confirmam a expressão de *FOXE1* em diversos tecidos normais humanos, incluindo órgãos internos como rins, pâncreas, pulmões e cólon e tecidos secretores como glândulas salivares, ovários, mamas e glândulas adrenais. Na literatura científica atual não há, porém, estudos que relatem o padrão de expressão gênica de *FOXE1* no estômago humano. Devido à sua origem comum com órgãos derivados do intestino anterior embrionário, nos quais *FOXE1* é expresso no organismo adulto, é possível que o gene seja expresso no estômago, levando à hipótese de que a metilação em *FOXE1* seja uma situação patológica. Contudo, não deve ser descartada a possibilidade de que o gene possa ter exercido suas funções no estômago apenas na embriogênese, sendo naturalmente metilado ao decorrer da vida adulta.

A análise do padrão de metilação e expressão gênica de *FOXE1* em tumores gástricos é, portanto, uma importante ferramenta para a compreensão de seu envolvimento nesta doença.

Nas análises de metilação realizadas através de PCR-MSP verificou-se que *FOXE1* apresentava-se freqüentemente metilado, em 86,5% nos tumores gástricos.

Os dados obtidos corroboram com os encontrados para outros tipos de câncer. O perfil de metilação em *FOXE1* foi estudado e correlacionado com a ocorrência de câncer de pâncreas, onde o estudo apontou metilação em 59% dos casos (Sato *et al.*, 2003; Matsubayashi *et al.*, 2006). Weisenberger e colaboradores (2008) encontraram *FOXE1* metilado 27,3% dos tumores de mama analisados. Metilação nesse gene também foi associado a carcinoma folicular da tireóide (Gudmundsson *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2010) e carcinoma de células escamosas cutâneas (Venza *et al.*, 2010), além do estudo associando polimorfismos nesse gene e o seu silenciamento transcricional (Venza *et al.*, 2010).

Na casuística estudada foi observada hipermetilação também nos tecidos normais adjacentes ao tumor 66/89 (74,2%). Contudo, é digno de nota tratar-se de mucosa histologicamente normal, porém proveniente de pacientes com câncer gástrico. O estado hipermetilado poderia ser um evento precoce na carcinogênese, demonstrando um potencial marcador de lesões pré-cancerosas. Entretanto, esses dados devem ser analisados com cautela devido a ausência de análises em mucosa gástrica de indivíduos saudáveis.

Com a avaliação da expressão gênica de *FOXE1* através de qPCR pode-se analisar a concordância entre o padrão de metilação em *FOXE1* e a sua expressão gênica.

A não concordância, observada em 76,9% dos casos, onde o tumor apresentou-se metilado e, ainda assim expresso, poderia ser explicada pela possibilidade dos indivíduos apresentarem a hipermetilação em heterozigose. Embora se confirme a hipermetilação e que a técnica seja sensível e eficiente em sua detecção, não há discriminação entre homozigotos e heterozigotos. Vem de encontro a esse pensamento, a observação de que a amplificação nessas amostras foi detectada nos últimos ciclos da qPCR, sugerindo baixa expressão desse gene, condizente com a hipótese de que somente um dos alelos esteja ativo.

Ressalta-se, ainda, que os tecidos analisados sejam compostos por pelo menos 80% de células tumorais, havendo, portanto, a possibilidade de heterogeneidade celular no *pool* de células analisadas, indicando a necessidade de microdissecção para obtenção de dados mais específicos em novas análises.

O gene *FOXE1* apresenta função a ser esclarecida no processo da carcinogênese gástrica, sendo evidente a necessidade de novos estudos e correlações.

Avaliar seu papel neste processo é imprescindível, pois o conhecimento do padrão de expressão gênica de fatores de transcrição que atuam na regulação do ciclo celular é um passo fundamental na identificação de possíveis vias carcinogênicas e marcadores tumorais.

Referências Bibliográficas

1. 14.Motoo Y, Okai T, Ohta H, Satomura Y, Watanabe H, Yamakawa O, Yamaguchi Y, Mouri I, Sawabu N. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis of extraluminal compressions mimicking gastric submucosal tumors. *Endoscopy*. 1994 Feb;26(2):239-42.
2. Akoh JA, Macintyre IM. Improving survival in gastric cancer: review of 5-year survival rates in English language publications from 1970. *Br J Surg* 1992;79:293–9.
3. Bandoh T, Isoyama T, Toyoshima H. Total gastrectomy for gastric cancer in the elderly. *Surgery*. 1991 Feb;109:136-42.
4. Berrino F, Capocaccia R, Estève J, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, et al., editors. *Survival of cancer patients in Europe: The EUROCare-2 study*. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1999. (IARC Scientific Publications, 151).
5. Blot WJ, Li JY, Taylor PR. Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combination, cancer general population. *J Natl Inst* 1993; 85:1483-1492.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil, 2010. [cited 2010 Sept 10] Available from: www.inca.gov.br/estimativa/2010
7. Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Biserni R, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, Marubini E, Puntoni R, Vindigni C, Fraumeni J, Blot W. A case-control study of gastric cancer and diet in Italy. *Int. J. Cancer*. 1989; 44: 611-6.
8. Burke AP, Yen TSB, Shekitka KM, Sobin LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1990 May; 3:377–80.
9. Bustamante-Teixeira MT, Faerstein E, Marioto A, Britto AV, Moreira-Filho DC, Latorre MRDO. Survival in gastric cancer patients in Campinas, São Paulo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*. v.22, p.1611-18, 2006.
10. Callan MF. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect*. 2004; 6(10):937-45.

11. Chadwick BP, Obermayr F, Frischauf AM. FKHL15, a new human member of the forkhead gene family located on chromosome 9q22. *Genomics*. 1997; 41:390-6.
12. Chang MS, Kim HS, Kim CW, Kim YI, Lan Lee B, Kim WH. Epstein-Barr virus, p53 protein, and microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Hum Pathol*. 2002 Apr; 33(4):415-20
13. Chomczzynsky P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162:156-9.
14. Chu XY, Zhu ZM, Chen LB, Wang JH, Su QS, Yang JR, Lin Y, Xue LJ, Liu XB, Mo XB. FOXM1 expression correlates with tumor invasion and a poor prognosis of colorectal cancer. Department of Medical Oncology, Jinling Hospital, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu, China. *Acta Histochemica* [2012, 114(8):755-762].
15. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735–40.
16. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, S. L. (Eds.) *Robbins-Patologia Estrutural e Funcional*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
17. Crawford DH. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 April; 356: 461-473.
18. Dathan N, Parlato R, Rosica A, De Felice M, Di Lauro R. Distribution of the *TITF2/FOXE1* gene product is consistent with an important role in the development of foregut endoderm, palate and hair. *Dev Dyn*. 2002; 224:450-6.
19. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev*. 2004; 25: 722-46.
20. De Stefani E, Correa P, Boffeta P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Mendilaharsu M. Dietary patterns and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Gast Cancer*. 2004; 7:211-20.
21. Denny JC *et al*. Variants near *FOXE1* are associated with hypothyroidism and other thyroid conditions: using electronic medical records for genome- and phenome-wide studies. *Am. J. Hum. Genet*. 89, 529–542 (2011).
22. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Rev. Pharmacol. Toxicol*. 2005; 45:629-56.

23. Foster GD, Twell. Plant Gene Isolation. Principles and Pratics. 1996. England: John Wiley & Sons Ltda; 426.
24. Fox JG, Wang TC. Helicobacter pylori infection: pathogenesis. Curr. Opin. Gastroenterol, 2002; 18:15-25.
25. Hiratsuka M, Miyashiro I, Ishikawa O, et al. Application of sentinel node biopsy to gastric cancer surgery. Surgery. 2001;129:335–340.
26. Hisamichi S, Sugawara N. Mass screening for gastric cancer by X-ray examination. Jpn J Clin Oncol 1984; 14:211-23.
27. HOWSON, C. P.; HIYAMA, T. & WYNDER, E. L., 1986. The decline of gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. Epidemiologic Reviews, 8:1-27.
28. Hu J, Zhang S, Jia E, Wang Q, Liu S, Liu Y, et al. Diet and Cancer of the Stomach: a case-control study in China. Int J Cancer. 1988; 41:331-5.
29. Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 2003 [livro na Internet]. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/>.
30. Israel DA, Peek RM. Pathogenesis of Helicobacter pylori-induced gastric inflammation. Aliment Pharmacol Ther. 2001;15:1271-90.
31. Katoh M, Katoh M. Human FOX gene family. Int J Oncol. 2004; 25:1495–500.
32. Kitagawa Y, Fujii H, Mukai M, Kubota T, Ando N, Ozawa S, et al. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymph node sampling in esophageal and gastric cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2002 Apr;11(2):293-304.
33. Kurdistani SK. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. Br J Cancer. 2007; 97: 1-5.
34. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. Acta Pathol Microbiol Scand. 1965; 64:31-49.
35. Matsubayashi H, Canto M, Sato N, Klein A, Abe T, Yamashita K, et al. DNA Methylation Alterations in the Pancreatic Juice of Patients with Suspected Pancreatic Disease. Cancer Res. 2006 Jan; 66(2):1208-17.
36. Matsubayashi H, Sato N, Brune K, et al. Age- and disease-related methylation of multiple genes in nonneoplastic duodenum and in duodenal juice. Clin Cancer Res 2005;11:573–83 www.pathology2.jhu.edu/pancreas/primer.pdf

37. Mincis M, Mincis R. Como diagnosticar e tratar câncer gástrico. *Rev Bras Med.* 2008 Mar; 78-84.
38. Mincis M, Possik R. Câncer Gástrico. In: Mincis M, editor. *Gastroenterologia & Hepatologia. Diagnóstico e Tratamento.* 3ª ed. São Paulo: Lemos Editorial; 2002. p.371-384.
39. Palli D, Russo A, Ottini L, Masala G, Saieva C, Amorosi A, et al. Red meat, family history, and increased risk of gastric cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001; 61(14):5415-9.
40. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997;47:5–27.
41. Parlato R, Rosica A, Rodriguez-Mallon A, Affuso A, Postiglione MP, et al. An integrated regulatory network controlling survival and migration in thyroid organogenesis. *Dev Biol.* 2004; 276: 464-75.
42. Peek Júnior RM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*, 2002 Jan; 2(1):28-37.
43. Plummer M, Vivas J, Lopez G et al. Chemoprevention of precancerous gastric lesions with antioxidant vitamin supplementation: a randomized trial in a high-risk population. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:137-146.
44. Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. The role of Epstein-Barr virus in human tumorigenesis. *Medicina, Ribeirão Preto.* 2003 jan; 36(1):16-23.
45. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; 2:344.
46. Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994; 17(5):914-21.
47. Sipponen P, Kekki M, Siurala M. Precancerous conditions. In: Filipe MI, Jass JR, editors. *Gastric cancer. Current problems in tumour pathology.* London: Churchill Livingstone; 1985. p. 152-71
48. Stemmermann GN. Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 1994;74:556–64.
49. Stomach. In: American Joint Committee on Cancer: *AJCC Cancer Staging Manual.* 6th ed. New York, NY: Springer 2002:99-106.
50. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Path* 2000; 53:255-261.

51. Takahashi M, Saenko VA, Rogounovitch TI, Kawaguchi T, Drozd VM, Takigawa-Imamura H, et al. The *FOXE1* locus is a major genetic determinant for radiation-related thyroid carcinoma in Chernobyl. *Hum Mol Genet.* 2010 19(12):2516-2523.
52. Ushijima T, Okochi-Takada E. Aberrant Aberrant methylations in cancer cells: Where do they come from? *Cancer Sci.* 2005 Apr; 96(4):206-11.
53. Venza I, Visalli M, Tripodo B, De Grazia G, Loddo S, Teti D, Venza M. *FOXE1* is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2010 May; 162(5):1093-7.
54. Venza I, Visalli M, Tripodo B, De Grazia G, Loddo S, Teti D, Venza M. Investigation into *FOXE1* genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2010 Mar; 162(3):681-3.
55. Venza M, Visalli M, Venza I et al. Altered binding of MYF-5 to *FOXE1* promoter in non-syndromic and CHARGE-associated cleft palate. *J Oral Pathol Med* 2009; 38:18–23.
56. Watanabe H, Jass JR, Sobin LH. Histological typing of esophageal and gastric tumours. 2nd ed. WHO International Histological Classification of Tumours. Berlin: Springer-Verlag, 1990.
57. Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA, cagA, and vacA Status and Clinical Outcome: Studies in Four Different Countries. *J. Clin. Microbiol.*, 1999 Jul; 37: 2274 - 2279.
58. Ye WM, Yi YN, Luo RX, Zhou TS, Lin RT and CHEN GD. Diet and gastric cancer: case-control study in Fujian Province, China. *WJG*, 1998; 4(6):516-8.

Anexos



Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu.

assando

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.018-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143
e-mail secretária: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadora: tsarden@fmb.unesp.br



Ética

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 04 de julho de 2011. Of. 262/11-CEP

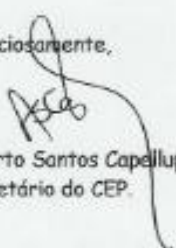
Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Maria Inês de Moura Campos Pardini
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezada Dr^a Maria Inês,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa **(Protocolo CEP 3907-2011)** "Silenciamento transcricional do gene foxe 1 em câncer gástrico", a ser conduzido por Luanda Secerino de Menezes, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pela Dr^a Adriana Camargo Ferrasi, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de **04 de Julho de 2.011**.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,



Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.