

**Helvia Nascimento**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CÉLULAS TUMORAIS DE PACIENTES COM  
ADENOCARCINOMA ESPORÁDICO DO CÓLON**

Campinas

UNICAMP

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



**Helvia Nascimento**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CÉLULAS TUMORAIS DE PACIENTES COM  
ADENOCARCINOMA ESPORÁDICO DO CÓLON**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas para Obtenção do Título de Doutor em Clínica  
Médica, Área de Concentração Ciências Básicas

**Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**

Campinas

UNICAMP

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

N17c Nascimento, Helvia  
Caracterização da expressão gênica de células tumorais de pacientes com adenocarcinoma esporádico do cólon / Helvia Nascimento. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores : Carmen Silvia Passos Lima, Fernando Ferreira Costa  
Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Adenocarcinoma. 2. Expressão gênica. 3. Perfil de Expressão Gênica. I. Lima, Carmen Silvia Passos. II. Costa, Fernando Ferreira. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: Characterization of gene expression of tumoral cells in patients with sporadic colon adenocarcinoma**

**Keywords:** • Adenocarcinoma  
• Gene Expression  
• Gene Expression Profiling

**Titulação: Doutor em Clínica Médica**

**Área de concentração: Ciências Básicas**

**Banca examinadora:**

**Profa. Dra. Carmen Silvia Passos Lima**  
**Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi**  
**Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira**  
**Prof. Dr. João José Fagundes**  
**Prof. Dr. José Vassallo**

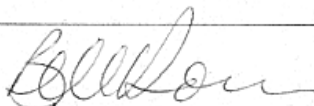
**Data da defesa: 28 - 02 - 2007**

**Banca Examinadora da Tese de Doutorado**

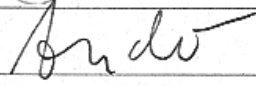
Orientador(a): *Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Silvia Passos Lima*

**Membros:**

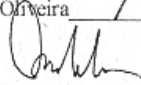
1. Prof(a). Dr(a ). Benedito Mauro Rossi



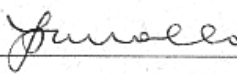
2. Prof(a). Dr(a). André Luiz Vettore de Oliveira



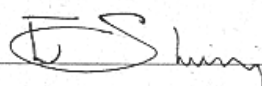
3. Prof(a). Dr(a). João José Fagundes



4. Prof(a). Dr(a). José Vassallo



5. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Passos Lima



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Ciências Básicas Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 28/02/2007



## DEDICATÓRIA

---

Ao **Prof. Dr. Ricardo Góes** (*in memorian*), pela confiança em meu trabalho, pelo incentivo, e pelo apoio incondicional.

Sua dedicação e seu amor, à medicina e à ciência, foram e serão sempre uma inspiração!

“Não há sorte, destino ou fado que possa subjugar, embaraçar  
ou controlar a firme resolução de uma alma determinada.”

Ella Weeler Wilcox





## AGRADECIMENTOS

---

À **Profª Drª Carmen Silvia Passos Lima**, pela orientação, sem a qual eu não teria conseguido terminar minha tese.

Ao **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**, pelo apoio através da cessão de materiais e do laboratório, essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

Ao **Dr. Ricardo Góes** (*in memorian*), ao **Dr. Cláudio Coy**, à **Drª Lurdes**, ao **Sandro** e aos residentes da Disciplina de Proctologia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela enorme ajuda na obtenção das amostras dos pacientes e na compreensão de tudo o que fosse relacionado à doença.

À **Drª Luciana**, ao **Dr. Stédile** e à **Neusa**, da Anatomia Patológica do Gastrocentro da Unicamp, pela ajuda com as lâminas.

À **Drª Irene**, à **Fernanda** e ao **Alan**, do Laboratório de Marcadores Celulares do Hemocentro da Unicamp, pela realização das citometrias.

À **Ângela** e à **Heloísa**, do Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da Unicamp, pela ajuda em várias ocasiões.

À **Lena** e à **Simone**, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, pela ajuda e amizade.

Ao **Tiago** e ao **Gustavo**, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, pelas análises de bioinformática dos dados referentes aos nossos resultados.

À **Manoela**, do Laboratório de Genética do Câncer da FCM da Unicamp, pela presença e amizade inestimáveis e pela ajuda na separação das células, imprescindíveis ao desenvolvimento do meu trabalho.

Ao **Anderson**, do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro da Unicamp, pela participação na realização do trabalho e pela amizade.

À **Dulcinéia**, do Laboratório de Hemoglobina e Genoma do Hemocentro da Unicamp, pela ajuda na realização da validação dos resultados.

Ao **Gustavo**, do Laboratório de Genética do Câncer da FCM da Unicamp, pela presença, amizade e força constantes.



À **Gabriela**, à **Iramaia**, à **Ana Paula** e ao **Eliei**, do Laboratório de Genética do Câncer da FCM da Unicamp, pelo apoio e amizade.

Aos meus **amigos**, pela compreensão, pela amizade e pela torcida.

Aos meus sogros, **Luiz Carlos** e **Evori**, à **Neusa**, e aos meus cunhados, **Juliano** e **Keko**, pelo enorme apoio sempre.

Ao **Julio**, meu esposo, pelo amor, paciência e companheirismo, que me deram força para ir até o final.

Aos meus pais, **Helio** e **Diva**, irmãos, **Helder** e **Helvecia**, e cunhado, **Carlos**, pelo amor, amizade e apoio incondicionais, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

E, principalmente, a **Deus**, por me proteger e estar constantemente ao meu lado.

**Muito obrigada a todos vocês!**

“Não há ventos favoráveis para quem não sabe aonde ir.”

Cora Coralina



“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.  
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se, fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar que, em dias frios, em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”

**Martin Luther King**



**A realização deste estudo contou com o apoio da  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

Bolsa de Doutorado: Processo n° 03/01459-5

Auxílio Pesquisa: Processo n° 03/01460-3





## SUMÁRIO

---

DEDICATÓRIA.....	vii
AGRADECIMENTOS .....	ix
EPÍGRAFE .....	xiii
SUMÁRIO.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxi
LISTA DE FIGURAS .....	xxv
LISTA DE TABELAS .....	xxix
RESUMO.....	xxx
ABSTRACT .....	xxxiii
INTRODUÇÃO .....	35
1. Considerações gerais .....	37
2. Aspectos clínicos .....	38
3. Aspectos genéticos e moleculares .....	39
4. Método da análise seriada da expressão gênica (SAGE).....	45
OBJETIVOS .....	51
CASUÍSTICA E MÉTODOS .....	55
1. Aspectos clínicos .....	57
2. Obtenção de amostras purificadas de células epiteliais.....	58
3. Extração do RNA total de células epiteliais neoplásicas e normais .....	60
4. Método da análise seriada da expressão gênica (SAGE).....	62
4.1. Obtenção das tags, ditags e concatâmeros .....	62
4.2. Clonagem dos concatâmeros .....	75
4.3. Amplificação de insertos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento .....	77
4.4. Análise dos resultados obtidos pelo método SAGE .....	79
5. Análise comparativa das expressões gênicas de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e normais (SAGE CN) .....	80
6. Validação dos resultados obtidos pelo método SAGE .....	80
6.1. Síntese do DNA complementar (cDNA).....	80



6.2	Quantificação da expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) .....	81
6.3.	Expressões dos genes de interesse na amostra do SAGE CC .....	89
7.	Análise da expressão dos genes de interesse em outras amostras .....	89
8.	Perfil funcional dos transcritos .....	90
9.	Aspectos éticos .....	90
	RESULTADOS .....	91
1.	Aspectos clínicos .....	93
2.	Obtenção de amostras purificadas de células epiteliais neoplásicas.....	96
3.	Obtenção de amostras purificadas de células epiteliais normais .....	98
4.	Extração do RNA total de células epiteliais neoplásicas e normais .....	100
5.	Método da análise seriada da expressão gênica (SAGE).....	102
6.	Análise comparativa das expressões gênicas de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e normais (SAGE CN) do cólon .....	106
7.	Validação dos resultados obtidos pelo método SAGE .....	106
7.1.	Síntese do DNA complementar (cDNA).....	110
7.2.	Quantificação da expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) .....	110
7.3.	Expressões dos genes de interesse em amostra do SAGE CC .....	114
8.	Análise da expressão dos genes de interesse em outras amostras .....	117
9.	Perfil funcional dos transcritos .....	120
	DISCUSSÃO .....	129
	CONCLUSÕES .....	149
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	153
	ANEXOS .....	169
	APÊNDICES.....	183



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micra
<b>µM</b>	Micromolar
<b>5-FU</b>	5-fluorouracil
<b>ACE</b>	Adenocarcinoma colorretal esporádico
<b>ACm</b>	Anticorpos monoclonais
<b>ACmh</b>	Anticorpos monoclonais humanos
<b>BAC</b>	Gene constitutivo beta actina
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CC</b>	Câncer colorretal
<b>CCE</b>	Câncer colorretal esporádico
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionário
<b>cm</b>	centímetro
<b>CT</b>	Ciclo de limiar
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>dNTP</b>	Deoxiribonucleotídeo
<b>EST</b>	Seqüência de gene não classificada ou <i>expressed sequence tag</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GAPDH</b>	Gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
<b>H/E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>M</b>	Molar
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>ng</b>	Nanograma



<b>nm</b>	nanômetro
<b>No match</b>	Seqüência gênica não descrita
<b>ORF</b>	Seqüência aberta de leitura ou <i>open reading frame tag</i>
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Solução salina fosfato tamponado
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>pmol</b>	Picomol
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleíco
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
<b>SAGE</b>	Análise seriada da expressão gênica
<b>Tag</b>	Etiqueta
<b>TM</b>	Temperatura de dissociação
<b>U</b>	Unidades





## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1:	RNA mensageiro e a síntese do DNA complementar .....	64
Figura 2:	Digestão do DNA complementar com a enzima <i>Nla</i> III .....	65
Figura 3:	Ligação dos adaptadores ao DNA complementar .....	67
Figura 4:	Digestão do DNA complementar com a enzima <i>Bsm</i> FI .....	68
Figura 5:	Formação e amplificação das <i>ditags</i> .....	70
Figura 6:	Produtos da amplificação das <i>ditags</i> .....	71
Figura 7:	Digestão das <i>ditags</i> com a enzima <i>Nla</i> III .....	73
Figura 8:	Ligação das <i>ditags</i> e formação dos concatâmeros .....	74
Figura 9:	Clonagem de um plasmídeo pZER0®-1 .....	76
Figura 10:	Amplificação dos clones e eletroesferogramas de seqüenciamento .....	78
Figura 11:	Produtos de amplificação pela PCR em tempo real.....	83
Figura 12:	Células epiteliais neoplásicas purificadas de paciente com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado em gráfico de citometria de fluxo.....	97
Figura 13:	Células epiteliais normais purificadas de paciente com megacólon chagásico em gráfico de citometria de fluxo .....	99
Figura 14:	Eficiência de amplificação de iniciadores em PCR em tempo real.....	111
Figura 15:	Curvas de dissociação de iniciadores em PCR em tempo real .....	112
Figura 16:	Representação gráfica de cinco expressões gênicas concordantes.....	114
Figura 17:	Representação gráfica de duas expressões gênicas discordantes e uma expressão gênica concordante.....	115
Figura 18:	Representação gráfica de duas expressões gênicas concordantes.....	116



Figura 19:	Representação gráfica da comparação entre as expressões dos genes em amostras de células neoplásicas de outros pacientes.....	119
Figura 20:	Representação gráfica da distribuição dos transcritos diferencialmente expressos por processos biológicos .....	122
Figura 21:	Representação gráfica da distribuição dos transcritos diferencialmente expressos por funções moleculares.....	126
Figura 22:	Esquema das principais vias de sinalização observadas na biblioteca SAGE CC .....	136



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1:	Seqüências dos iniciadores selecionados para validação dos resultados da expressão gênica obtidos por SAGE .....	85
Tabela 2:	Características clínicas e laboratoriais dos seis pacientes com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado do estudo .....	95
Tabela 3:	Quantificação dos RNAs obtidos de pacientes e controles .....	101
Tabela 4:	Sumário do número de tags observadas nas bibliotecas SAGE .....	103
Tabela 5:	Distribuição relativa das freqüências, em número e porcentagem, das tags únicas identificadas nas bibliotecas SAGE .....	105
Tabela 6:	Distribuição dos genes hiperexpressos em células neoplásicas na biblioteca SAGE CC .....	107
Tabela 7:	Distribuição dos genes hipoexpressos em células neoplásicas na biblioteca SAGE CC .....	108
Tabela 8:	Distribuição dos genes normoexpressos em células neoplásicas na biblioteca SAGE CC .....	109
Tabela 9:	Características dos iniciadores e reações de amplificação dos genes para a validação dos resultados de expressão gênica obtidos por SAGE .....	113
Tabela 10:	Distribuição dos seis pacientes com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado de acordo com os resultados de expressão gênica obtidos pela reação em cadeia da polimerase em tempo real .....	118
Tabela 11:	Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos por processos biológicos .....	123
Tabela 12:	Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos por funções moleculares .....	127



Os mecanismos moleculares envolvidos na origem do adenocarcinoma de cólon esporádico (ACE) ainda não estão completamente elucidados. Recentemente, o método da análise seriada da expressão gênica (SAGE) foi descrito como eficaz para identificar a expressão total de genes de tipos celulares diversos, mas esta análise não foi realizada em células epiteliais purificadas do ACE moderadamente diferenciado. Nós caracterizamos pelo método SAGE a expressão gênica total de células epiteliais neoplásicas do cólon de um paciente com ACE moderadamente diferenciado (SAGE CC) e de células epiteliais normais do cólon de um paciente com megacólon chagásico (SAGE CN). Foram geradas, após o seqüenciamento automático, 44.004 e 43.570 *tags* totais das bibliotecas SAGE CC e SAGE CN, representando 16.484 e 13.479 *tags* únicas, respectivamente. Na comparação entre as bibliotecas, 171 transcritos diferencialmente expressos foram identificados ( $P < 0,001$ ; expressão diferencial  $\geq 5$ ), incluindo 10% de transcritos que podem representar genes não descritos. As expressões de 10 genes diferencialmente expressos foram quantificadas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) na amostra de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC), com o intuito de validar os resultados obtidos pelo SAGE, e, posteriormente, em amostras de células epiteliais de outros cinco pacientes com o mesmo tipo de doença. As expressões foram concordantes em 80% dos genes (*CEACAM6*, *KLK6*, *LYZ*, *PFN1*, *S100A8*, *S100A9*, *VIL2* e *ZFHX1B*) e discordantes nos demais 20% (*PLA1A* e *ZNF277*). As expressões dos genes de interesse, quantificadas pelos dois métodos, foram similares na amostra SAGE CC e nas amostras dos demais pacientes com a doença. Foram observadas expressões anormais de genes envolvidos com a proliferação e diferenciação celular e com a resposta ao *stress* em células epiteliais neoplásicas. Foram também visualizadas expressões anormais de genes não relacionados com a doença e de genes ainda não identificados. Em conjunto, os nossos resultados podem contribuir para a identificação de genes relacionados com a origem ou a progressão do ACE moderadamente diferenciado e, ainda, para a descoberta de agentes terapêuticos específicos que controlem a proliferação anormal das células neoplásicas.





## ABSTRACT

---

The molecular mechanisms involved in sporadic colon adenocarcinoma (SCA) are still not completely elucidated. Recently, the serial analysis of gene expression (SAGE) method has allowed the global analysis of genes expressed in diverse cellular types but there are no studies in purified epithelial cells of SCA moderately differentiated. We have characterized through SAGE the global gene expression of neoplastic epithelial cells from a SCA moderately differentiated patient (SAGE CC) and normal epithelial cells from a megacolon patient (SAGE CN). After automatic sequencing, a total of 44.004 tags from SAGE CC and 43.570 tags from SAGE CN profiles were generated, representing 16.484 and 13.479 unique tags, respectively. Comparing both profiles, 171 differentially expressed transcripts were identified ( $P < 0.001$ ; fold  $\geq 5$ ), including 10.0% that may represent novel transcripts. The expression of 10 selected genes was further investigated by real-time polymerase chain reaction (qPCR) in the SCA moderately differentiated epithelial cells sample (SAGE CC), with the purpose of to validate the results obtained by the SAGE method, and also in five epithelial cells samples from the same type of SCA patients. Similar expressions were seen in 80% (*CEACAM6*, *KLK6*, *LYZ*, *PFN1*, *S100A8*, *S100A9*, *VIL2* e *ZFHX1B*) and discordant expressions were seen in 20% (*PLA1A* e *ZNF277*) of analysed genes. On SAGE CC sample and samples of the SCA patients, all genes presented similar expressions measured by both methods. We observed abnormal expression of genes involved with cell proliferation and differentiation, and with response to stress in neoplastic epithelial cells. Also, were found abnormal expressions of genes not related with the disease and not identified genes. Together, our results may contribute for the identification of genes involved in the origin or progression of SCA moderately differentiated, as well as for the discovery of new therapeutical agents, with specific action on abnormal proliferation of the neoplastic cells.



## **INTRODUÇÃO**

---



## 1. Considerações gerais

O desenvolvimento do câncer colorretal (CC) é resultado de uma complexa interação de variáveis, incluindo elementos externos, como agentes ambientais e dietéticos, e fatores internos, de natureza somática ou hereditária (PINHO & ROSSI, 1999; VETTORE & CABALLERO, 2004).

O CC é um dos principais problemas de saúde do mundo ocidental. Constitui a maior causa de óbito atribuída à neoplasia, após os cânceres de pulmão, mama (nas mulheres) e próstata (nos homens), e o adenocarcinoma colorretal representa cerca de 90% dos tumores que acometem o intestino grosso (VETTORE & CABALLERO, 2004).

Evidências epidemiológicas sugerem que a variação geográfica na incidência da doença reflete variações nas exposições ambientais e no estilo de vida. Estas, por sua vez, podem interferir na expressão de fatores genéticos (PARKIN et al., 1993).

O câncer é a segunda causa de morte nos Estados Unidos da América (EUA), sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2005). O CC é o segundo câncer mais comum em países desenvolvidos; já em países em desenvolvimento, é o sexto mais comum em homens e o quinto em mulheres (COTTON et al., 2000).

A incidência do CC nos EUA foi de cerca de 50 casos/100.000 habitantes/ano, no período de 1991 a 1995 (SCHOTTENFELD, 1995). Mais recentemente, foi publicada estimativa de 145.290 novos casos e 56.290 mortes por CC, que seria responsável ainda por 10,6% do total de casos de câncer nos EUA em 2005 (JEMAL et al., 2005). Já em 2007, estima-se que o câncer colorretal (CC) tenha sido a terceira maior causa de óbito atribuída a neoplasia, tanto em homens como em mulheres, após os cânceres de pulmão, próstata e mama. A incidência estimada da doença para o ano de 2007 foi de, aproximadamente, 148.000 novos casos no país (PICKLE et al., 2007).

O câncer figura como a terceira principal causa de morte no Brasil, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares e por causas externas, como os

acidentes de trânsito e a violência urbana. A taxa de mortalidade por CC no país aumentou significativamente nos últimos anos. Foram registrados 2,44 óbitos por 100.000 homens no ano de 1979 e 4,32 óbitos por 100.000 homens no ano de 2000. Esse registro foi de 2,80 óbitos por 100.000 mulheres no ano de 1979 e de 4,75 óbitos por 100.000 mulheres no ano de 2000 (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2003).

Os coeficientes de mortalidade por câncer de cólon, reto e ânus no estado de São Paulo nos períodos de 1987-1988, 1992-1993, 1997-1998, e 2002-2003, foram de 6,8, 7,9, 9,2 e 10,2 óbitos/100.000 homens e de 6,2, 6,9, 8,1 e 8,8 óbitos/100.00 mulheres, respectivamente, segundo dados publicados pela Fundação Oncocentro de São Paulo (FOSP, 2005).

A incidência do CC na cidade de Campinas, segundo dados fornecidos pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Campinas, foi de 25,2 casos/100.000 habitantes/ano no período de 1991 a 1995. Ainda segundo dados da FOSP, os coeficientes de mortalidade por câncer de cólon, reto e ânus na região de Campinas entre 1987-1988, 1992-1993, 1997-1998, e 2002-2003, foram de 6,6, 7,4, 8,7 e 9,3 óbitos/100.000 homens e de 6,1, 6,8, 7,8 e 7,6 óbitos/100.00 mulheres, respectivamente (FOSP, 2005).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2006, a incidência do CC no estado de São Paulo seria de 23,48 casos/100.000 homens e de 24,27 casos/100.00 mulheres. A estimativa para a região sudeste foi de 15.150 casos e para o país é de 25.360 casos, no mesmo período.

Estas descrições indicam que a doença é comum em nosso meio.

## **2. Aspectos clínicos**

O CC usualmente se apresenta como um conjunto de sinais e sintomas que incluem a anemia, a dor abdominal, a perda de peso, o sangramento retal e modificações do hábito intestinal, como a diarreia e a constipação (WAYE, 1980).

Acomete predominantemente indivíduos após os 40 anos de idade, sendo que 90% dos casos ocorre naqueles com idade maior ou igual a 50 anos

(PETERS et al., 1989; SCHOTTENFELD, 1995). O risco para o desenvolvimento do CC aumenta bruscamente a partir dos 50 anos, duplicando a cada década e atingindo o seu máximo entre os 75 e os 80 anos (WINAWER et al., 1985). A idade média de ocorrência da doença, observada em pacientes de países do hemisfério norte, foi de 60 anos (KATOH et al., 1996; GERTIG et al., 1998).

O câncer de cólon acomete de forma similar indivíduos do sexo masculino e do feminino. Já no câncer de reto, os indivíduos do sexo masculino são mais acometidos do que os do sexo feminino, guardando entre si uma relação de 1,5:1,0 (WINAWER et al., 1985).

O principal sistema de estadiamento do tumor utilizado para a determinação do prognóstico e da terapêutica adequada a ser administrada a cada paciente é o TNM (GREENE et al., 2002).

O sistema TNM considera a extensão do acometimento do tumor na parede do cólon e em tecidos e órgãos adjacentes (T), a identificação da presença ou da ausência de metástases para linfonodos (N) e a identificação da presença ou da ausência de metástases em órgãos à distância (M). Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por este sistema (estágios 0, I, II, III e IV) (GREENE et al., 2002), sendo que as maiores probabilidades de sobrevivência são observadas naqueles com os estágios 0 e I e a menor probabilidade de sobrevivência naqueles com o estágio IV da doença (GREENE et al., 2002).

A despeito dos avanços terapêuticos, apenas cerca de 40% dos pacientes com CC sobrevive por um período de cinco anos (VETTORE & CABALLERO, 2004), o que justifica a busca de maior conhecimento sobre a sua etiologia e fisiopatologia.

### **3. Aspectos genéticos e moleculares**

O CC pode ser determinado por fatores genéticos (CUNHA, 1980; HARNDEN, 1995; SHIKE, 1995; KINZLER & VOGELSTEIN, 1996; HOULSTON & TOMLINSON, 2001, NASCIMENTO, 2002; VETTORE & CABALLERO, 2004). Anormalidades em oncogenes ou genes supressores tumorais (FEARON et al.,



1987; FINLEY et al., 1989; VOGELSTEIN et al., 1989; MELHAM et al., 1992; SIDRANSKY et al., 1992; GUILLEM et al., 1995), a instabilidade de microsátélites (IONOV et al., 1993; GUILLEM et al., 1995) e a desregulação de sinais das vias de transdução (GUILLEM et al., 1995) parecem estar definitivamente associadas à doença.

Embora cerca de 70% dos casos de CC, a maioria adenocarcinomas, seja esporádica (CCE), é há muito conhecido que indivíduos de determinadas famílias apresentam um risco aumentado da doença (HOULSTON & PETO, 1996; VETTORE & CABALLERO, 2004). De fato, mutações de alta penetrância, particularmente as mutações nos genes *APC*, *MLH1* e *MSH2*, foram descritas em pacientes com CC familiar (BURT et al., 1990; BURT & GRODEN, 1993; PELTOMAK et al., 1993; BURT, 1995; PINHO & ROSSI, 1999; HOULSTON & TOMLINSON, 2001; VETTORE & CABALLERO, 2004). Ainda, mutações em oncogenes como o *K-RAS* e no gene supressor tumoral *P53*, e polimorfismos de baixa penetrância em genes como o *APC* (APC-I1307K), o *Harvey-ras-1* (HRAS-VNTR), o gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) e em genes relacionados com o metabolismo de carcinógenos no epitélio do cólon, como o *CYP1A1* e o *NAT1*, podem alterar o risco para a doença em ambos os cânceres, esporádico e familiar (PINHO & ROSSI, 1999; HOULSTON & TOMLINSON, 2001; VETTORE & CABALLERO, 2004; RESZKA et al., 2006), ou as manifestações clínicas da mesma (LIMA et al., 2007).

Chiang et al. (2004) observaram freqüências significativamente menores de mutações no gene *APC* em pacientes jovens (idade  $\leq 32$  anos) ou idosos (idade  $\geq 86$  anos) com CCE, quando comparados a pacientes com idade entre 39 e 85 anos, e em pacientes com tumores mais agressivos. Eles observaram ainda, que a ocorrência de alterações genéticas simultâneas nos genes *APC*, *K-RAS* e *P53* foram raras nos pacientes com CC. Em outro estudo, Fernández-Peralta et al. (2005) descreveram que mutações nos genes *TGFBR2* e *BAX* contribuíram para a progressão do tumor em CCE com alta freqüência de instabilidade de microsátélites.

Além disso, vários estudos com polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato, como o *MTHFR*, o da metionina sintase redutase (*MTRR*), o da metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1 (*MTHFD1*), o carreador da redução de folato (*RFC1*), o da glutamato carboxipeptidase (*GCPII*) (SHI et al., 2003), o gene da metionina sintase (*MTR*), o da cistationina  $\beta$ -sintase (*CBS*) e o da timidilato sintase (*TS*), foram conduzidos para investigar sua relação com o CC, porém não foram encontrados resultados conclusivos (SHARP & LITTLE, 2004).

Suh et al. (2005) descreveram que a forma variante homozigótica do polimorfismo repetição dupla (2R2R) ou tripla (3R3R) de 28pb em *tandem*, na região promotora do gene *TS* (*TS* 2R $\rightarrow$ 3R), esteve associada à sobrevida mais curta em pacientes com câncer de cólon nos estágios II e III, submetidos a quimioterapia adjuvante com 5-fluorouracil (5-FU) ou 5-FU e leucovorin, respectivamente.

A hiperexpressão das proteínas s100a9 (calgranulina B) e s100a8 (calgranulina A), ou do heterocomplexo s100a9/ s100a8 (calprotectina) foi identificada, pelas técnicas de eletroforese bidimensional, análise imunohistológica e espectrometria de massa, em lesões neoplásicas da mucosa do cólon, sendo que o aumento da concentração destas proteínas no local da lesão pareceu determinar a indução da apoptose e conseqüente regressão do tumor (STULÍK et al., 1999).

Jantscheff et al. (2003), utilizando a técnica de imunohistoquímica, descreveram a expressão aumentada do antígeno CEACAM6, uma molécula de adesão intercelular, em pacientes com CC, sendo este aumento associado a um prognóstico desfavorável aos pacientes, com menor sobrevida global e livre de doença. Em outro estudo, Ogawa et al. (2005) observaram a hiperexpressão do gene kaliceína 6 (*KLK6*) em CC através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Foi observada, ainda, uma correlação direta entre os níveis de expressão do gene e a invasão da serosa pelo tumor, a presença de metástases hepáticas, o estágio avançado da doença e um prognóstico desfavorável aos seus portadores.

A técnica de *microarrays* (microarranjos) é largamente utilizada para a análise da expressão gênica. Esta técnica foi utilizada por Soeth et al. (2001) para avaliar o papel do CEA na progressão do CC em uma linhagem celular. Os autores observaram que níveis aumentados do CEA afetaram a expressão de vários grupos de genes relacionados ao câncer, em particular os ligados ao ciclo celular e à apoptose. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o CEA protege as células do CC contra vários estímulos apoptóticos e contra a ação de quimioterápicos como o 5-FU, sugerindo que sua inibição pode ser uma nova estratégia terapêutica a ser considerada para pacientes com a doença.

Posteriormente foi descrito, utilizando a mesma técnica, um aumento, induzido pela  $\beta$ -catenina, na expressão do gene codificador da molécula de adesão celular neuronal Nr-CAM em tecido de CC humano e em linhagens celulares de CC e melanoma, mas não em linhagens de células provenientes dos tecidos normais correspondentes, indicando que a indução da transcrição da Nr-CAM pela  $\beta$ -catenina desempenha papel importante na tumorigênese do melanoma e do CC, provavelmente por promover crescimento e motilidade celular (CONACCI-SORRELL et al., 2002).

Cen et al. (2004), utilizando a técnica de microarranjos, avaliaram a expressão de um grupo de genes em tecidos de CCE e cólon normal e identificaram expressões aumentadas dos genes *HSF1*, *HSF27*, *HSP90* e *iNOS* no tecido tumoral. Entretanto, quando medida pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR), diferença significativa de expressão entre os dois tecidos foi observada apenas para o gene *HSF1*, codificador de uma proteína da via de sinalização “heat shock stress”. Estes resultados sugerem o envolvimento da ativação desta via, responsável pela manutenção da conformação, estabilidade e função de proteínas oncogênicas ligadas ao aumento da proliferação celular, progressão do ciclo celular e redução da apoptose, além de outras características do fenótipo maligno, como a invasão, a neoangiogênese e o potencial metastático (SARTO et al., 2000; WITKIN, 2001; BLAGOSKLONNY, 2002; OCHEL & GADEMANN, 2002), na carcinogênese do CCE.

Com a utilização das técnicas de microarranjos e imunohistoquímica, Kumarakulasingham et al. (2005) descreveram a expressão diferenciada de citocromos P450, uma família multigênica de enzimas com papel central no metabolismo oxidativo, como marcador prognóstico no CC. Eles observaram que a hiperexpressão dos genes *CYP51* e *CYP2S1* constituiu fator de prognóstico desfavorável na doença, já que esteve associada à menor sobrevida dos pacientes, sendo que a hiperexpressão do *CYP51* foi considerada um fator de prognóstico independente.

O gene *CDX2* foi descrito, utilizando a mesma técnica, como um possível marcador da diferenciação do adenocarcinoma colorretal esporádico (ACE) e da determinação do sítio de origem de alguns tipos de tumores intestinais metastáticos. Ele foi detectado por imunohistoquímica em 51 (71,8%) de um total de 71 casos avaliados no estudo, sendo 38 (74,5%) de 51 tumores bem ou moderadamente diferenciados, 5 (50,0%) de 10 tumores pouco diferenciados e 8 (80,0%) de 10 outros tipos de tumores de grau avançado, e, ainda, raramente identificado nos demais tecidos carcinomatosos avaliados, provenientes de órgãos como fígado, pulmão, pâncreas e útero (DE LOTT et al., 2005).

Posteriormente, Watson et al. (2006) identificaram, através das técnicas de microarranjos e imunohistoquímica, a proteína CD59 como um marcador de prognóstico desfavorável para pacientes com CC primário. Quando avaliado tecido tumoral de um grupo de pacientes estratificados de acordo com o grau de diferenciação do tumor e invasão vascular, foi verificada uma maior frequência de expressão da proteína nos pacientes com tumores bem e moderadamente diferenciados comparados aos pouco diferenciados, e nos tumores com evidência de invasão extramural em relação aos demais. Quando realizada análise da sobrevida associada à doença, pacientes com tumores que expressaram a CD59 tiveram sobrevida menor que aqueles cujos tumores não expressavam a proteína, independentemente do estágio da doença, sugerindo que a CD59 pode ser utilizada como um marcador prognóstico independente em pacientes com a doença. Assim, aqueles cujas células tumorais expressam a proteína podem ser

considerados bons candidatos à terapia adjuvante, ainda que apresentem a doença em estágio inicial.

Em outro estudo, foi avaliado, por microarranjos e imunohistoquímica, o valor prognóstico do fator de necrose tumoral recombinante relacionado à indução da apoptose (TRAIL) e de seus receptores DR4 e DR5 em tecido tumoral primário de pacientes com CC do estágio III, tratados com quimioterapia adjuvante (5-FU e levamisole ou 5-FU, levamisole e leucovorin). A adição do leucovorin à terapia não influenciou a sobrevida dos pacientes. Após as análises, apenas a expressão aumentada do receptor DR4 foi associada à diminuição da sobrevida, livre de doença ou global, dos pacientes incluídos no estudo, indicando que pacientes com CC do estágio III com expressão aumentada do DR4 podem requerer um tratamento adjuvante mais agressivo (VAN GEELLEN et al., 2006).

Ainda com a utilização do método de microarranjos, Komatsu et al. (2006) analisaram células epiteliais intestinais normais de ratos, com expressão induzida do grupo proteínas mitogênicas ativadoras quinase quinase 1 (mek1), descrito como indutor da transformação celular, para avaliar os níveis de expressão de genes supostamente envolvidos na ativação da mek1. Foi identificada, após a ativação da mek1, expressão alterada de vários genes envolvidos em importantes vias relacionadas à tumorigênese do cólon, como migração e invasão celular (*MMP10*, *MMP13*, *PAI2A*), adesão e interação celular (*CD44*, *OPN*, *CRTL1*), crescimento e proliferação celular (*TGF $\alpha$* , *EMP1*, *EDN1*), biossíntese, atividade enzimática e metabolismo (*BSP2*, *AMPD3*, *PDP1*), entre outras. A partir dos resultados obtidos, foram escolhidos oito genes, sem envolvimento claro na via avaliada, para análise, por RT-PCR, em cinco amostras de linhagens celulares de CC humano e cinco amostras de tecido tumoral e normal do cólon humano. O gene *cartilage link protein 1* (*CRTL1*) teve expressão diminuída nas cinco amostras de tecido e foi expresso em apenas duas das linhagens celulares humanas analisadas. Os genes *human tryptase- $\epsilon$*  (*PRSS22*), altamente homólogo ao gene *BSP2* de ratos, e *adenosine monophosphate deaminase 3* (*AMPD3*), tiveram expressão aumentada nas cinco amostras de tecido tumoral e na maior

parte das linhagens celulares humanas. Estes resultados parecem indicar que os genes em questão estejam envolvidos no desenvolvimento do CC.

Mais recentemente, foi descrita, com a utilização dos métodos de microarranjos e imunohistoquímica, a expressão aumentada dos antígenos CEACAM5 e CEACAM6 em tumores sólidos de mama, pâncreas, ovário, pulmão e intestino e em metástases hepáticas do CC, sendo que o CEACAM6 foi mais expresso que o CEACAM5. Considerando-se descrições prévias do envolvimento deste antígeno em funções celulares como migração, invasão e adesão, além de formação de metástases distantes (BLUMENTHAL et al., 2005), e que um maior aumento de expressão foi identificado nas metástases hepáticas do CC em relação ao tumor primário, este parece ser um bom alvo para novas terapêuticas (BLUMENTHAL et al., 2007).

Assim, o método de microarranjos possibilita a avaliação de um grande número de diferentes genes ou tecidos em um único estudo. Entretanto, para se utilizar esta técnica é necessário o conhecimento prévio dos genes a serem avaliados, o que impossibilita a avaliação de genes ainda não descritos ou não relacionados.

Mais recentemente, o método denominado análise seriada da expressão gênica (SAGE) foi considerado eficaz para identificar e quantificar a expressão total de genes de um determinado tipo celular normal (LEE et al., 2001; ZHOU et al., 2001) ou neoplásico (VAN DEN BERG et al., 1999; PARLE-McDERMOTT et al., 2000; KROP et al., 2001), sem que haja um conhecimento prévio destes genes.

#### **4. Método da análise seriada da expressão gênica (SAGE)**

O método SAGE, descrito por Velculescu et al. (1995), é baseado nos quatro princípios apresentados a seguir.

A obtenção de pequenas seqüências de DNA complementar (cDNA), denominadas etiquetas (*tags*), com 9 a 21 pares de bases de uma região definida e específica de cada um do total de genes expressos no tipo celular avaliado.

A ligação das *tags* entre si formando uma longa molécula de cDNA, denominada concatêmero, que é clonada e seqüenciada possibilitando, assim, a identificação de cada uma de suas *tags* como pertencentes a genes previamente descritos em bancos de dados ([www.sagenet.org](http://www.sagenet.org) e [www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE)), bem como a sua caracterização como pertencentes a genes ainda não descritos, denominados *no matches*.

A quantificação da expressão dos genes, avaliada por meio do número de vezes que uma determinada *tag* é encontrada em um tipo celular anormal obtido do paciente a ser a ser investigado comparado ao número de vezes em que é encontrado no mesmo tipo celular normal obtido de um controle. Assim, se um número significativamente maior de *tags* for observado em células do paciente em comparação ao número obtido em células do controle, é dito que o gene por ela representado tem expressão aumentada na doença. Se o número de *tags* for significativamente menor no paciente do que o encontrado no controle, é dito que o gene por ela representado tem expressão diminuída na doença. Ainda, tem expressão normal na doença o gene que apresentar número de *tags* similar ao encontrado no controle. A identificação, a quantificação e a análise comparativa da expressão dos diferentes genes nos tipos celulares avaliados, anormais e normais, são realizadas por meio de sistemas computadorizados próprios.

E, finalmente, para que os resultados da expressão gênica obtida no SAGE sejam aceitos como verdadeiros, a confirmação ou validação por outro método. Para tal, a expressão de um grupo de genes escolhidos aleatoriamente é também quantificada em células anormais e normais por qPCR, método considerado como o padrão ouro para a quantificação da expressão gênica.

A utilização da técnica SAGE possibilitou a identificação do aumento da expressão do gene *PPAR $\delta$*  e da sua supressão pelo gene *APC*, em linhagens celulares do CC humano (HE et al., 1999).

Ainda, o método possibilitou a identificação de expressões aumentadas de genes como o *Keratina K5*, o *Cystatina S*, o *S28 ribossomal* de levedura, homólogo ao humano, e a subunidade p32 do fator de splicing *SF2* do pré-mRNA, e a diminuição da expressão de genes como o *Amilóide Sérica (SAA)*, em

linhagens celulares do CC metastático em comparação às respectivas expressões dos genes em linhagens do CC primário, isoladas do mesmo paciente. O papel que o gene *SAA* desempenhou no câncer colorretal metastático não ficou esclarecido no estudo (PARLE-McDERMOTT et al., 2000), entretanto, em um estudo anterior foi identificado o aumento de sua expressão em resposta à apoptose induzida pelo gene *P53* em linhagens celulares do CC (POLYAK et al., 1997), sugerindo sua participação na progressão da doença.

Foi também identificada por SAGE, a expressão diferenciada de genes do endotélio de tumores como o CC primário, o CC metastático, o sarcoma e os tumores de pulmão, pâncreas, mama e cérebro, em comparação com a expressão de genes do endotélio de tecidos normais. Entretanto, não foram observadas diferenças de expressão destes genes entre os diferentes tipos de tumor avaliados, indicando apenas que o endotélio tumoral é, em geral, diferente do endotélio de tecidos normais (ST. CROIX et al., 2000).

Buckhaults et al. (2001), por outro lado, analisaram a expressão gênica global em tecido colorretal normal, adenoma colorretal e carcinoma colorretal, por meio da técnica SAGE. Eles identificaram seis genes (*TGFBI*, *LYS*, *RDP*, *MIC-1*, *REGA*, e *DEHL*) com expressão aumentada, tanto nas bibliotecas dos carcinomas quanto nas dos adenomas. Para validar os resultados obtidos no SAGE, foi utilizada a técnica RT-PCR em sete amostras de tumores colorretais (três adenomas e quatro carcinomas esporádicos) e em amostra de mucosa colônica normal, confirmando os resultados obtidos através do SAGE.

Expressão significativamente aumentada do gene codificador da proteína tirosina fosfatase (*PRL-3*) foi ainda identificada, por meio do método SAGE, e confirmada pela qPCR, em células epiteliais de metástases hepáticas do CC em comparação com a expressão do gene em células epiteliais do CC primário e de tumores benignos do cólon e em células epiteliais normais do cólon (SAHA et al., 2001).

Em outro estudo, com a utilização da mesma técnica, foi identificado o aumento da expressão do gene  *$\alpha$ -Methylacyl-CoA racemase (AMACR)*,



codificador de uma enzima mitocondrial e peroxissomal, em adenocarcinoma colorretal humano (ZHOU et al., 2002).

Buckhaults et al. (2003) descreveram ainda a utilização, com sucesso, da técnica SAGE com validação pela qPCR, na identificação do sítio primário de adenocarcinomas metastáticos de origem desconhecida. Após a construção de bibliotecas para amostras de carcinomas de ovário, mama, pâncreas e cólon, e a seleção de *tags* altamente identificadas com cada tecido, foi realizada a análise pela qPCR e, finalmente, a separação por *cluster* (agrupamento) dos genes que poderiam ser considerados como identificadores de cada tecido: *CP*, *MUC16* e *SLP1* (ovário), *PDEF* (mama) e *FABP1* (cólon). Por limitações técnicas, não foi possível obter um marcador confiável para o pâncreas.

Posteriormente, foi identificada, utilizando as técnicas hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), qPCR e imunohistoquímica, a expressão aumentada da proteína pri-3, anteriormente descrita por Saha et al. (2001) com a utilização da técnica SAGE, em metástases do CC em fígado, cérebro, pulmão e ovário, comparada à pouca ou quase nenhuma expressão da mesma proteína em cólon normal, CC não metastático ou em metástases provenientes de tumores primários de outros locais (BARDELLI et al., 2003).

Ainda, Yousef et al. (2004) utilizaram as databases de ESTs e SAGE, depositadas na plataforma *Cancer Genome Anatomy Project* (CGAP), para fazer a análise *in-silico* da expressão dos genes da família da kaliceína em tecidos e linhagens celulares, normais e tumorais, de pâncreas e cólon. Eles encontraram expressão aumentada dos genes *KLK6* e *KLK10* no câncer de pâncreas e, no CC, expressão aumentada dos genes *KLK6*, *KLK8* e *KLK10*, e diminuída do *KLK1*.

Já Huang et al. (2006), com o objetivo de identificar genes relevantes na patogênese do CC, utilizaram dados, obtidos por SAGE e depositados na plataforma CGAP, para analisar diferenças de expressão entre tecido tumoral e tecido normal de cólon, em um grupo de pacientes. Foram identificados vários genes diferencialmente expressos, dentre os quais foram escolhidos alguns para confirmação do resultado por RT-PCR. Eles ainda avaliaram o nível de proliferação de linhagens celulares de CC, sendo uma delas transfectada com

RNA de interferência (RNAi) para o gene *TGFβ1*, procedimento que bloqueia a ação do gene, e detectaram uma redução considerável na proliferação desta linhagem. Este gene foi descrito anteriormente, por SAGE e RT-PCR, como hiperexpresso no CC, sendo este resultado, portanto, sugestivo de uma participação importante do gene *TGFβ1* na proliferação de células do CC.

Estes resultados confirmam o potencial da técnica em identificar variações na expressão de genes em células do CC, o que pode contribuir para o melhor entendimento da sua etiologia e fisiopatologia. Entretanto, o marcador ou marcadores gênicos específicos para o ACE não foi ou foram ainda identificados.

Em nosso conhecimento, não há relatos sobre a descrição da expressão do total de genes de células epiteliais neoplásicas purificadas do ACE moderadamente diferenciado, sobre a descrição de genes previamente discutidos em outras doenças ou de genes não previamente descritos relacionados à doença com a utilização da técnica SAGE.

Frente ao exposto, foram definidos os objetivos deste estudo.



## **OBJETIVOS**

---



- Verificar a eficácia do método SAGE para a identificação da expressão gênica total de células epiteliais anormais de pacientes com ACE moderadamente diferenciado, tendo como padrão ouro, para a análise quantitativa da expressão gênica, a qPCR;
- Determinar, pelo método SAGE, o perfil de expressão gênica de células epiteliais de um paciente com ACE moderadamente diferenciado, por meio da comparação com o perfil de expressão gênica de células epiteliais do cólon normal.



## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---





## 1. Aspectos clínicos

Foram inseridos no estudo pacientes com ACE, ao diagnóstico, e indivíduos controle com megacólon chagásico, atendidos no Ambulatório de Proctologia e submetidos a intervenção cirúrgica inevitável no Hospital das Clínicas da UNICAMP, no período de 04/08/03 a 05/12/05. Foram excluídos da casuística pacientes e controles que apresentaram polipose familiar, síndrome de Lynch, doenças inflamatórias intestinais, antecedente familiar de CC e aqueles que não aceitaram participar do estudo proposto.

Os dados relativos à identificação, ao diagnóstico e ao estágio da doença foram obtidos dos prontuários de cada paciente, com o propósito de caracterizar a população do estudo.

Foram considerados tabagistas os pacientes que mantiveram o hábito de fumar até o momento do diagnóstico do ACE ou que pararam de fumar menos de cinco anos antes. Foram considerados não tabagistas aqueles que nunca fumaram e ex-tabagistas aqueles que mantiveram o hábito de fumar até, no máximo, cinco anos antes do diagnóstico do ACE, de acordo com o proposto por Freedman et al. (1996).

O diagnóstico da doença foi realizado em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE) e a classificação do grau de diferenciação do tumor foi realizada de acordo com os critérios propostos por Broders (1925) e revista por um patologista.

Foi considerada a localização do tumor descrita no exame anátomo-patológico da peça cirúrgica. Foram considerados como proximais os tumores localizados em cólons ascendente, transverso ou descendente, e como distais os localizados em sigmóide.

O estadiamento do tumor foi estabelecido com base nos resultados obtidos do exame físico, do exame histológico da peça cirúrgica, da ultra-sonografia e da tomografia computadorizada do abdome e pelve, da radiografia de tórax e dos achados intra-operatórios, de acordo com o proposto por Greene et al. (2004) para o sistema TNM (Anexos 1 a 3).

Os pacientes foram distribuídos de acordo com a idade, o sexo, a etnia, o hábito de fumar e o estágio da doença.

## **2. Obtenção de amostras purificadas de células epiteliais**

O método utilizado para a separação das células foi modificado de Saha et al. (2001). Inicialmente, foram obtidas células epiteliais normais e neoplásicas de cólons dos indivíduos normais e dos pacientes com ACE, respectivamente, imediatamente após a remoção cirúrgica. Para a obtenção destas células, as amostras de tecido epitelial normal e neoplásico (3 a 4 cm de diâmetro), mantidas em gelo, foram digeridas com colagenase tipo I (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA) em meio RPMI 1640 (Cultilab Mat. Cult. Cel. Ltda, Campinas, SP, Brasil) por 1-2 horas, a 37°C, e foram manipuladas, separadamente, de forma idêntica. Uma suspensão de células foi obtida após uma série de filtragens seqüenciais em filtros de nylon de 180µm, 60µm, e 30µm (Millipore, BR). Em seguida, as hemácias foram separadas com a utilização de um tampão de lise.

O número e a viabilidade das células obtidas por este método foram avaliados em câmara de Neubauer, utilizando como corante o azul de Trypan. Os resultados foram expressos em número de células viáveis/ml de solução.

A seguir, as células epiteliais, normais ou tumorais, foram selecionadas negativamente por meio da marcação com os anticorpos anti-CD14, que se liga a macrófagos e granulócitos, e anti-CD45, que se liga a células de origem hematopoiética (exceto eritrócitos e plaquetas e suas células precursoras), ligados a micro pérolas metálicas denominadas *microbeads* (anti-CD14 e anti-CD45 *macs microbeads*; Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha) por adição de 1ml de solução salina fosfato tamponado (PBS) com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) (PBS + 0,5% BSA) e 20µl de anti-CD14 e 20µl de anti-CD45 *macs microbeads* para cada  $1 \times 10^7$  células totais contidas na suspensão.

A solução final foi homogeneizada e incubada por 30 minutos, no escuro, a 4-12°C. A seguir, a seleção negativa das células CD14 e CD45 positivas, foi realizada em uma coluna magnética de seleção (Miltenyi Biotec, Bergish

Gladbach, Alemanha), que retêm as células CD14 e CD45 positivas por meio da eluição com 15ml de PBS + 0,5% BSA. As células não marcadas (CD14 e CD45 negativas), dentre as quais estão as células epiteliais tumorais ou normais do cólon, foram removidas da coluna por meio de quatro lavagens com 1ml de PBS + BSA 0,5% e o efluente foi coletado como fração negativa.

Após estes procedimentos, foi realizada uma centrifugação da fração negativa a 1600 rpm por 10 minutos, a 20°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 1ml de PBS + BSA 0,5% foram acrescentados ao botão de células.

O número total das células obtidas com este procedimento foi contabilizado e a viabilidade das células avaliada em câmara de Neubauer com corante de Trypan, em lâminas de citospin coradas com hematoxilina e eosina (H/E) e em citômetro de fluxo (FacsCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), de acordo com as orientações do fabricante do sistema, com a utilização do fluorocromo ficoeritrina (PE) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagens de células CD14/45 positivas e negativas. Um número de células CD14/45 negativas  $\geq 16 \times 10^6$  células/ml foi considerado adequado para o prosseguimento da separação.

Subseqüentemente, as células epiteliais foram marcadas com o anticorpo anti-HEA125, que tem especificidade para células epiteliais, ligado a micro pérolas metálicas (anti-HEA macs microbeads; Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha), por adição de 1ml de PBS + 0,5% BSA e 20 $\mu$ l de anti-HEA *macs microbeads* para cada  $1 \times 10^7$  células CD14/CD45 negativas contidas na suspensão. A solução final foi homogeneizada e incubada por 30 minutos, no escuro, a 4-12°C. A seguir, as células epiteliais foram obtidas por seleção positiva em coluna magnética (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha), por meio da eluição com 15ml de PBS + 0,5% BSA e por pressão de um êmbolo da própria coluna. Os números totais de células HEA negativas e de células epiteliais obtidos com o procedimento foram contabilizados em câmara de Neubauer com corante de Trypan, em lâminas de citospin coradas com H/E e em citômetro de fluxo (FacsCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), de acordo com as orientações do fabricante do sistema, e com a utilização do fluorocromo

isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako, Glostrup, Dinamarca). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagens de células HEA positivas e negativas.

Uma parte das células HEA positivas, tanto de pacientes quanto de controles, foi utilizada para a extração do RNA e outra parte, sempre que possível, para a extração de proteínas. Um número de células epiteliais normais ou neoplásicas  $\geq 5 \times 10^6$  células/ml foi considerado adequado à realização do experimento.

### **3. Extração do RNA total de células epiteliais neoplásicas e normais**

O RNA total das células epiteliais neoplásicas de pacientes e das células epiteliais normais dos controles foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA), de acordo com o método recomendado pelo fabricante. De forma sucinta, a suspensão de células foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos a 20°C e apenas o botão de células foi mantido. A ele, foi acrescentado 1ml do reagente Trizol para números de células epiteliais entre  $5 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  células/ml de PBS + BSA 0,5%, com posterior homogeneização da solução. A seguir, a solução foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. 200µl de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) foram adicionados à solução, com agitação vigorosa. Outra incubação foi realizada por 3 minutos, a temperatura ambiente, seguida por centrifugação por 15 minutos, a 13.500 rpm, a 4°C. A fase aquosa que contém o RNA foi recuperada e transferida para um novo tubo de microcentrífuga, no qual foram adicionados 500µl de  $\text{CHCl}_3$ . Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação por 10 minutos, a 13.500 rpm, a 4°C, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente do tubo por inversão e o botão de RNA foi ressuspensão em 1ml de álcool 75%. A solução foi submetida a centrifugação por 5 minutos, a 11.500 rpm, a 4°C. Após centrifugação, o RNA foi solubilizado em 30µl de  $\text{H}_2\text{O}$  tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA).

A extração do RNA foi realizada com o reagente RNeasy (Qiagen, MD, USA) em caso de escassez de material (quantidade de células  $\leq 5 \times 10^6$  células/ml), conforme preconizado pelo fabricante. Sucintamente, a suspensão de células foi centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos a 20°C e apenas o botão de células foi mantido. A ele, foram acrescentados 350 $\mu$ l do tampão de lise RLT (Qiagen, MD, USA), com posterior homogeneização da solução. A seguir, 350 $\mu$ l de etanol 70% foram adicionados à suspensão homogeneizada e misturados a ela com o auxílio de uma pipeta. A mistura foi, então, transferida para uma coluna de purificação e submetida a centrifugação por 15 segundos, a 10.000 rpm, a temperatura ambiente. O eluído foi descartado e foram adicionados à coluna 700 $\mu$ l do tampão de lavagem RW1 (Qiagen, MD, USA). A coluna foi, então, submetida a nova centrifugação por 15 segundos, a 10.000 rpm, a temperatura ambiente, e o eluído foi novamente descartado. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga, foram adicionados 500 $\mu$ l do tampão de lavagem RPE (Qiagen, MD, USA) e ela foi submetida a centrifugação por 15 segundos, a 10.000 rpm, a temperatura ambiente. Esta operação foi repetida aumentando-se o tempo de centrifugação para dois minutos. Em seguida, a coluna foi submetida a centrifugação a 14.000 rpm por um minuto, para retirada do excesso de algum eluente, e transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 30 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O livre de RNase e a coluna foi submetida a centrifugação por um minuto, a 10.000 rpm, a temperatura ambiente, para eluir o RNA.

A concentração dos RNAs foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, DE, USA), por leitura da densidade óptica nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. A relação entre ambas as leituras, que normalmente varia entre 1,6 e 1,8, foi utilizada como parâmetro para estimar o grau de pureza ou contaminação do RNA obtido. Valores da relação menores e maiores do que os descritos indicaram contaminação do RNA por proteínas ou fenol, respectivamente.

#### 4. Método da análise seriada da expressão gênica (SAGE)

O método foi realizado em amostra de RNA total de células epiteliais de um único paciente com ACE moderadamente diferenciado (SAGE CC) e em um *pool* de amostras de RNA total obtido de células epiteliais normais de dois controles (SAGE CN).

Os procedimentos técnicos inerentes ao método já foram previamente definidos pelo fabricante do conjunto de reagentes I-SAGE™ (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA), para o qual pelo menos 5µg de RNA total de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e de células epiteliais normais (SAGE CN) foram necessários.

##### 4.1. Obtenção das tags, ditags e concatâmeros

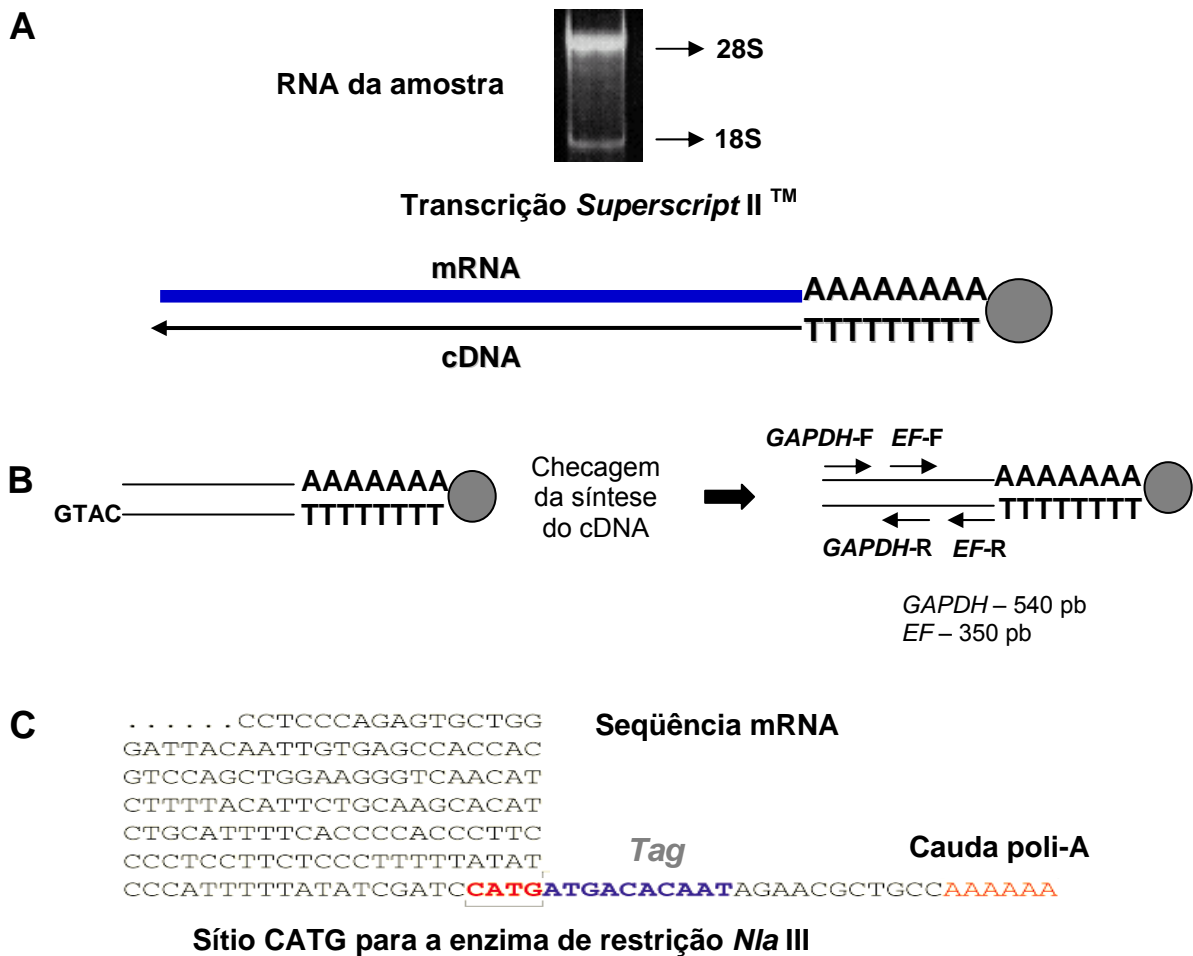
Os RNAs de células epiteliais, neoplásicas e normais, foram tratados com 1µl de DNase I 1U/µl (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA), para afastar a contaminação por DNA. Foram adicionados a cada amostra 1µl de DNase I Reaction Buffer 10X (200mM Tris-HCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl<sub>2</sub>) e H<sub>2</sub>O para um volume final de 10µl. As amostras foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente, e a reação paralisada com 1µl de EDTA 25mM, por 10 minutos, a 65°C.

O RNA mensageiro (mRNA) foi obtido do RNA total por meio da ligação de sua cauda poli-A a oligodT ligado a esferas metálicas. O mRNA ligado a estas esferas foi isolado pela aproximação do tubo que o continha a uma estante magnética, procedimento que o atraiu para a parede do tubo, sendo o restante da solução descartado. A seguir, o mRNA foi transcrito para cDNA com a utilização de 3µl da enzima *Superscript II RT*™ (Invitrogen, Life Technologies, USA) (Figura 1A). Subsequentemente, foi realizada a síntese da segunda fita de cDNA utilizando 20µl de *Escherichia coli* (*E. coli*) DNA polimerase, 5µl de *E. coli* DNA ligase e 5µl de *E. coli* RNaseH. A síntese de cDNA foi verificada pela PCR com a utilização de iniciadores para a amplificação de fragmentos dos genes *GAPDH*

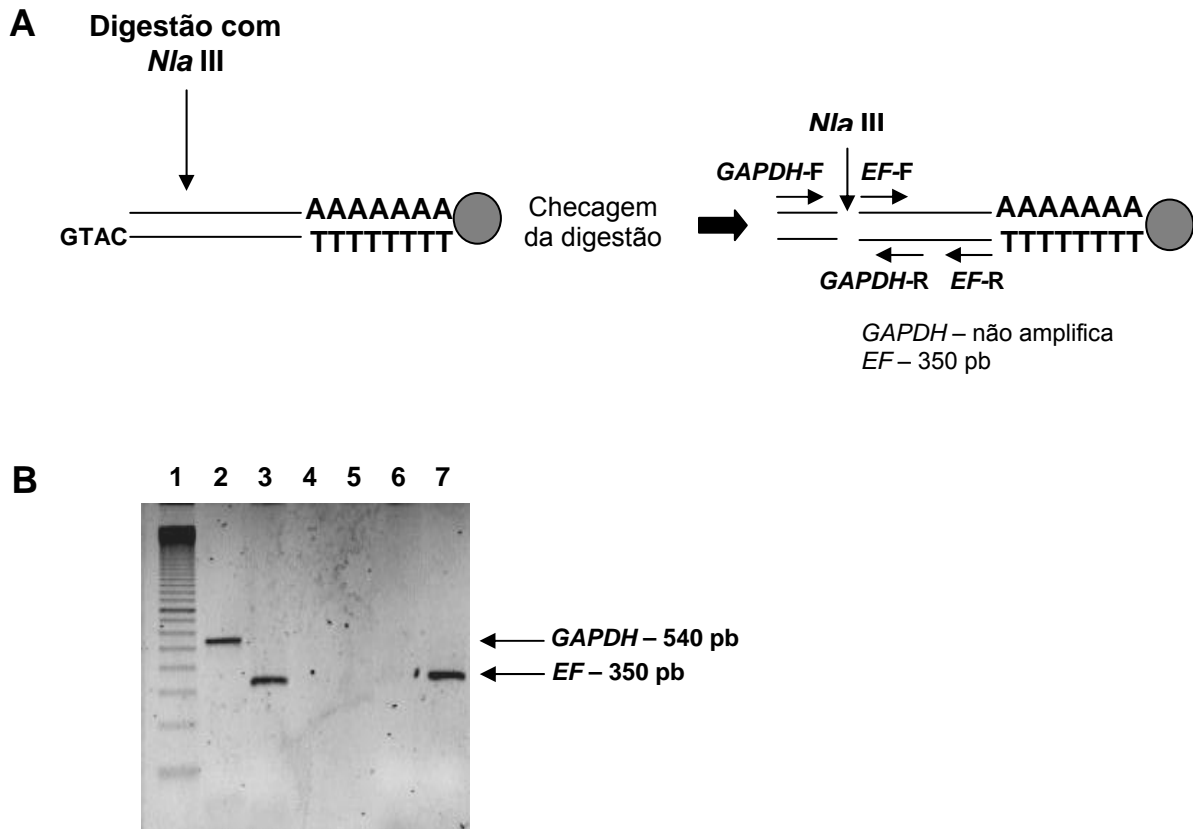
(350 pares de bases – pb) e *EF* (540 pb), localizados próximos à cauda poli-A do cDNA (Figura 1B). O cDNA foi digerido com 60U da enzima *Nla* III, que reconheceu a seqüência repetitiva CATG ao longo das fitas e deu origem a fitas de cDNA com aproximadamente 256 pb, ligadas a esferas metálicas pela cauda poli-A em uma extremidade e com as quatro bases do sítio de reconhecimento da enzima *Nla* III na outra extremidade (Figura 1C).

A digestão pela enzima *Nla* III foi verificada através da perda do sítio de ligação do iniciador para a amplificação do gene *GAPDH*, mas não do sítio do iniciador para a amplificação do gene *EF* (Figuras 2A e 2B).





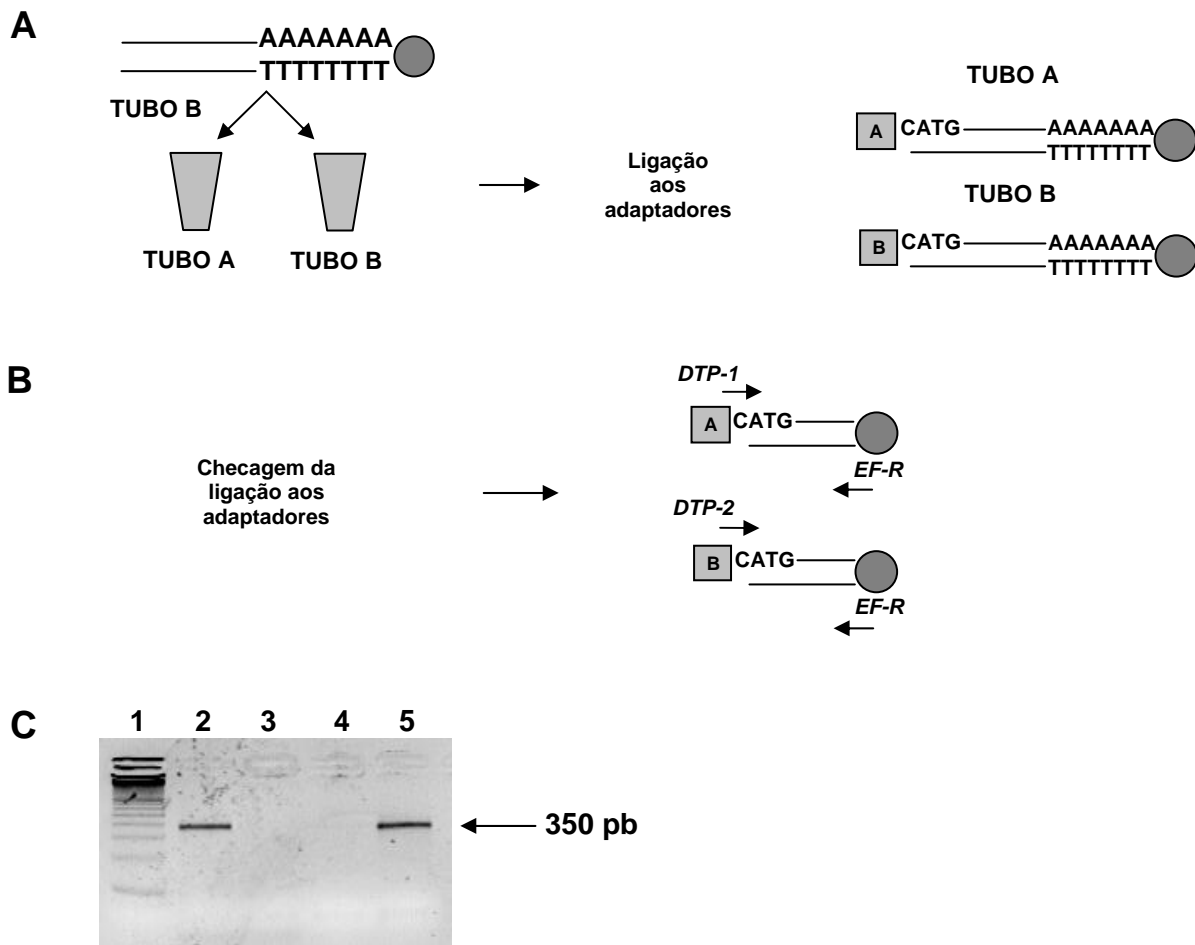
**Figura 1:** (A) Representação esquemática do RNA mensageiro (mRNA) com sua cauda poli-A ligada à esfera metálica pelo oligodT para a síntese do DNA complementar (cDNA) pela enzima de restrição *Superscript II*™. (B) Representação esquemática da checagem da síntese do DNA complementar (cDNA) com iniciadores para a amplificação dos genes *GAPDH* e *EF*. (C) Representação esquemática, após a digestão enzimática, de transcritos de 256 pares de bases, ligados a esferas metálicas pela cauda poli-A em uma extremidade e pelas quatro bases do sítio de reconhecimento da enzima *Nla III* na outra extremidade, representativos do cDNA de todos os genes expressos em um determinado tipo celular



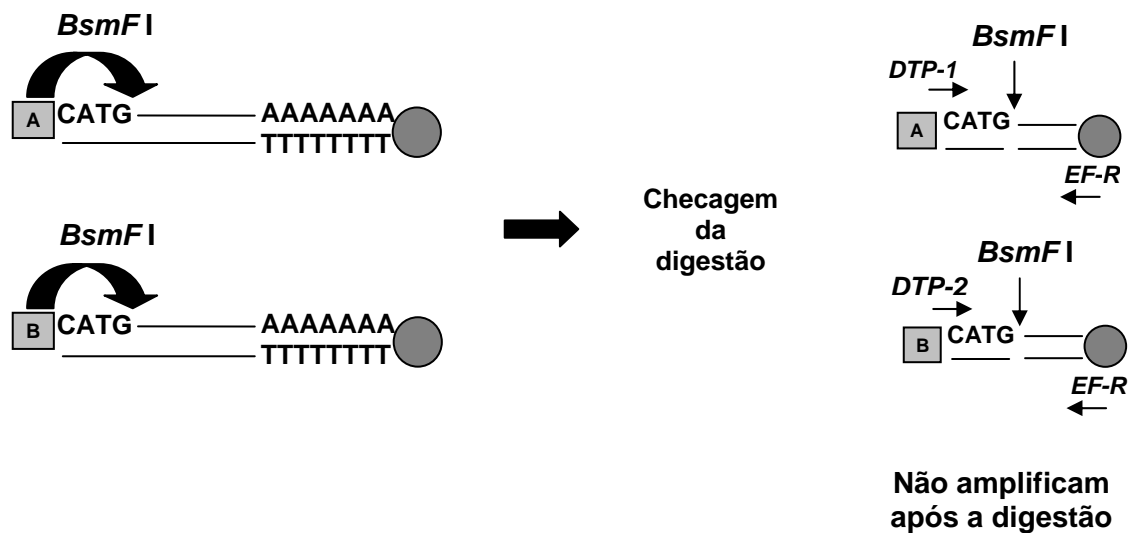
**Figura 2:** (A) Representação esquemática das fitas de cDNA, após a digestão com a enzima *Nla* III, com, aproximadamente, 256 pares de bases (pb) e ligadas a esferas metálicas pela cauda poli-A em uma extremidade e com as quatro bases do sítio de reconhecimento da enzima *Nla* III na outra extremidade. (B) 1: Marcador de peso molecular ladder 100 pb; 2, 3: Produtos de 540 e 350 pb obtidos pela amplificação dos genes *GAPDH* e *EF*, respectivamente; 4, 5: Amostras controle sem cDNA; 6: produto da amplificação do gene *GAPDH* após o corte da enzima *Nla* III entre os iniciadores GAPDH-F e GAPDH-R; 7: Produto da amplificação do gene *EF* após o corte da enzima *Nla* III entre os iniciadores GAPDH-F e GAPDH-R

Porções equivalentes de fitas de cDNA com, aproximadamente, 256 pb foram, a seguir, ligadas aos adaptadores A ou B, com a utilização de 10U da enzima T4 DNA ligase (Figura 3A). Estes adaptadores são seqüências de 40 pb que, assim como as fitas de cDNA, apresentam extremidades digeridas com a enzima *Nla* III que são, por isso, coesivas com as extremidades do cDNA. Para verificar a ligação das fitas de cDNA ao adaptador A foram utilizados o iniciador direto DTP-1 e o iniciador reverso EF. Já para a checagem da ligação das fitas de cDNA ao adaptador B foram utilizados o iniciador direto DTP-2 e o iniciador reverso EF (Figuras 3B e 3C).

Com as duas porções de cDNA ligadas seletivamente aos adaptadores A ou B, foi feita a digestão com a enzima *BsmF* I (Figura 4). Esta enzima se liga ao sítio de reconhecimento no adaptador e digere a 10-14 pb de distância dele. Assim, fragmentos de 10-14 pb ligados ao adaptador A ou ao adaptador B, com 40 pb cada, foram obtidos após o procedimento e constituíram as seqüências denominadas *tags*, que são seqüências únicas correspondentes a cada transcrito gênico das células epiteliais neoplásicas e normais. O restante das fitas de cDNA ligadas às esferas metálicas e o locus do gene *EF* foram desprezados.



**Figura 3:** (A) Representação esquemática da ligação dos adaptadores A ou B ao DNA complementar (cDNA). (B) Representação esquemática da amplificação do cDNA ligado aos adaptadores pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) com os iniciadores diretos DTP-1 para o adaptador A e DTP-2 para o B e o iniciador reverso EF para ambos. (C) Produtos da amplificação gênica, sendo: (1) Marcador de peso molecular ladder 100 pares de bases (pb); (2 e 5) Produtos da amplificação com os iniciadores DTP-1 e EF para a amostra A e DTP-2 e EF para a amostra B, respectivamente; (3 e 4) Ausência de fragmentos devida à utilização dos iniciadores de forma invertida

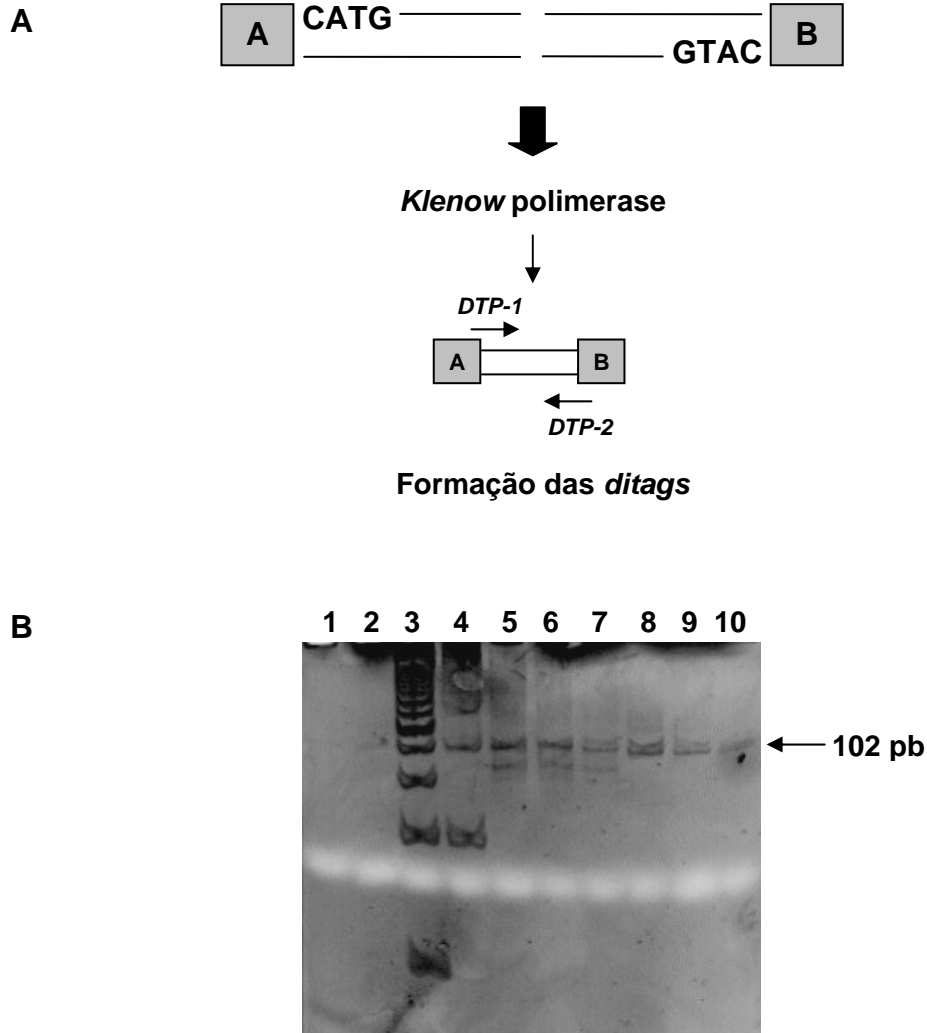


**Figura 4:** Representação esquemática da digestão do DNA complementar (cDNA), ligado ao adaptador A ou ao B, com a enzima de restrição *BsmF* I. Ao se verificar a eficiência da digestão pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) observa-se a ausência dos produtos de 350 pares de bases (pb), presentes antes da digestão com a enzima *BsmF* I

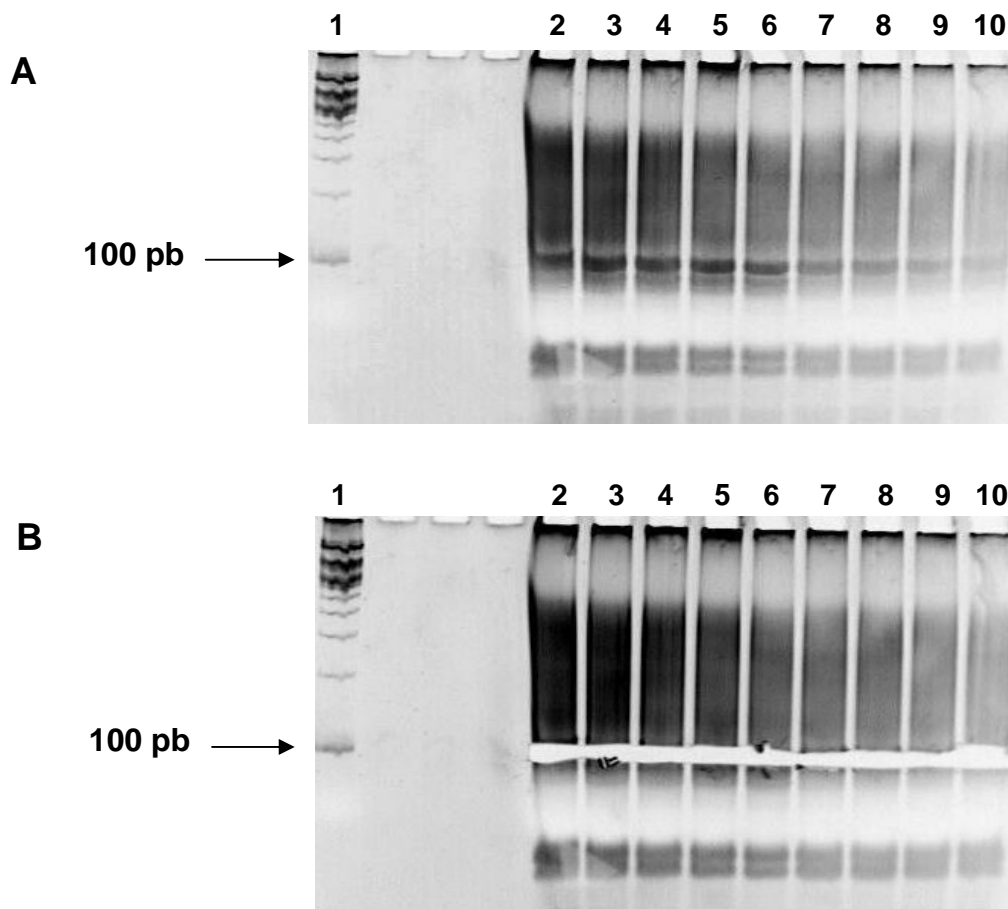
A seguir, as *tags* ligadas aos adaptadores A ou B foram tratadas com a enzima *Klenow* polimerase para preenchimento das extremidades provenientes da digestão com *BsmFI* e unidas entre si com a utilização da enzima T4 ligase, para formar a chamada *ditag* (Figura 5A).

As *ditags* obtidas foram diluídas serialmente e testadas para a verificação do número de reações necessário para produzir *ditags* suficientes para a formação dos concatâmeros. Após o teste, concluiu-se que seriam necessárias 300 reações e que a melhor diluição era de 1:100. A diluição de 1:100 foi a escolhida para a amplificação das *ditags* por ter possibilitado anteriormente a obtenção de produtos com 102 pb com intensidade similar ao controle positivo I-SAGE, conforme recomendações do próprio fabricante (Figura 5B).

Os produtos da amplificação das *ditags* por PCR em larga escala foram colocados em um único tubo para a extração com fenol e clorofórmio e posterior precipitação com etanol, acetato de amônio 7,5 M e glicogênio. Após a precipitação, os produtos foram aplicados em gel de poliacrilamida 12% para a obtenção de fragmentos de 102 pb (Figura 6A), que foram removidos (Figura 6B) e purificados em colunas S.N.A.P.<sup>™</sup>, por centrifugação. O eluído foi, então, novamente precipitado com etanol, acetato de amônio 7,5 M e glicogênio.



**Figura 5:** (A) Representação esquemática da ligação e amplificação das *ditags* pela reação em cadeia da polimerase (PCR). (B) Produtos da amplificação das *ditags* por PCR, sendo: (1) Controle negativo sem amostra (branco); (2) Controle negativo sem a enzima *Klenow* polimerase; (3) Marcador de peso molecular Ladder 25 pares de bases (pb); (4) Marcador de peso molecular Ladder 50 pb; (5, 6 e 7) Produtos da PCR nas diluições 1:50, 1:100 e 1:200, respectivamente; (8) Controle positivo *I-SAGE*; (9) Controle positivo *I-SAGE* na diluição 1:2; (10) Controle positivo *I-SAGE* na diluição 1:4



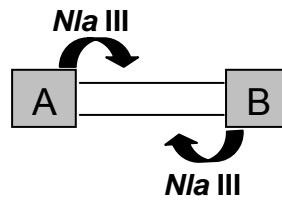
**Figura 6:** Produtos da amplificação das *ditags* em grande escala, na diluição 1:100, onde: (1) Marcador de peso molecular Ladder 100 pares de bases (pb); (2-10) Fragmentos de 102 pb referentes às *ditags* amplificadas. (A) Produtos da amplificação das *ditags* em grande escala em gel de poliacrilamida 12%. (B) Gel após a remoção dos fragmentos de 102 pb para posterior purificação e precipitação



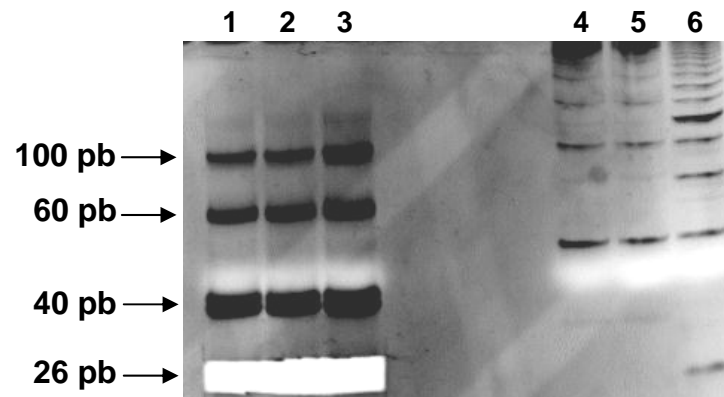
Os produtos da PCR, purificados e precipitados, foram digeridos novamente com a enzima *Nla* III para eliminar os adaptadores e obter somente as *ditags* de 26 pb (Figura 7A). Os produtos da digestão foram aplicados em gel de poliacrilamida 12% e deram origem a fragmentos de 40 pb, correspondentes aos adaptadores, e fragmentos de 60 e 100 pb, resultantes da digestão parcial das *ditags* pela enzima *Nla* III (Figura 7B). Deste gel foram retirados os fragmentos de 26 pb, posteriormente purificados em colunas S.N.A.P.<sup>TM</sup>.

As *ditags* purificadas foram ligadas umas às outras, com a utilização da enzima T4 DNA ligase, para formar uma estrutura maior, denominada concatâmero (Figura 8A). Após a ligação, os concatâmeros foram submetidos a corrida em gel de poliacrilamida 8%, no qual uma seleção por tamanho foi feita, sendo extraídos do gel fragmentos de 300 a 500 pb, de 500 a 800 pb e de 800 a 1000 pb (Figura 8B). Cada fragmento foi, posteriormente, purificado em coluna S.N.A.P.<sup>TM</sup> e, a seguir, precipitado para clonagem.

A



B

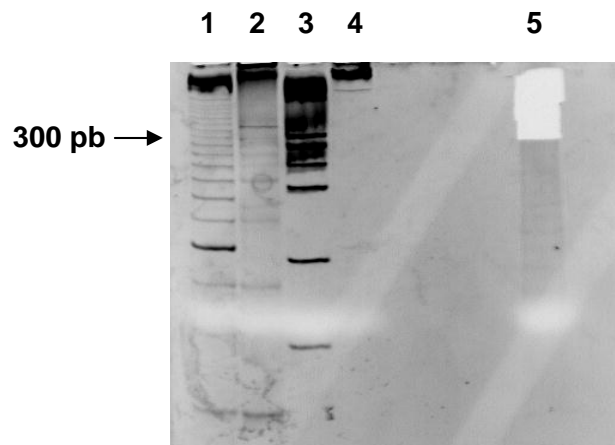


**Figura 7:** (A) Representação esquemática da digestão das *ditags* com a enzima *Nla* III. (B) produtos da digestão das *ditags* com a enzima *Nla* III em gel de poliacrilamida 12%, onde: (1, 2 e 3) Fragmentos de 40 pares de bases (pb), correspondentes aos adaptadores, fragmentos de 60 e 100 pb, resultantes de digestão parcial das *ditags*, e fragmentos de 26 pb, correspondentes à digestão completa das *ditags*, que foram isolados do gel para posterior purificação; (4 e 5) Marcador de peso molecular Ladder 50 pb; (6) Marcador de peso molecular Ladder 25 pb

A



B



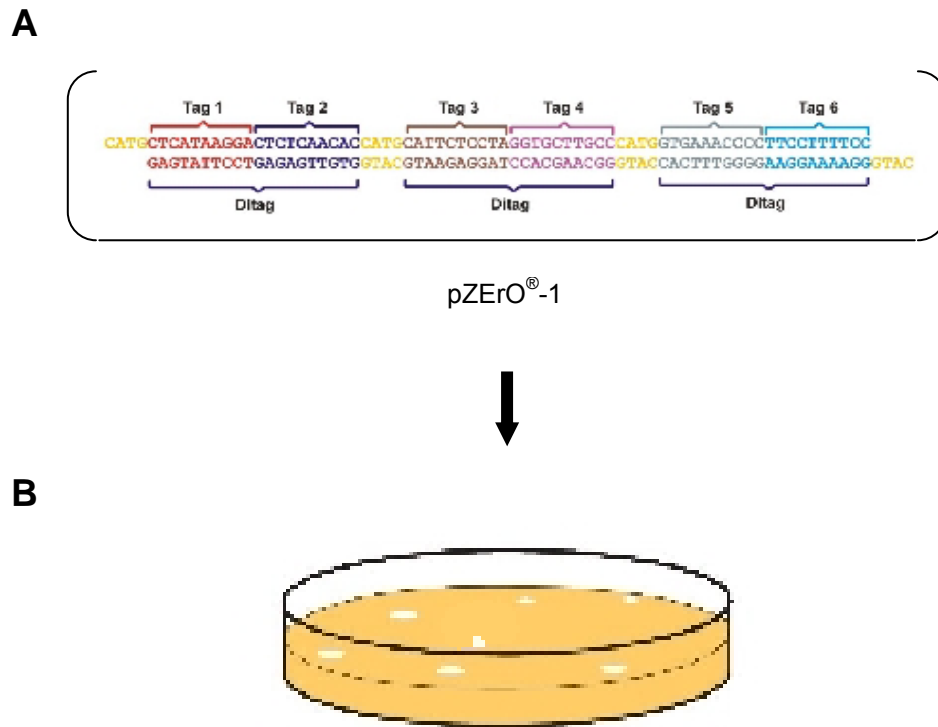
**Figura 8:** (A) Representação esquemática da ligação das *ditags* pela enzima T4 DNA ligase para a formação dos concatêmeros. (B) Gel de poliacrilamida 8% com o perfil de fragmentos de concatêmeros, onde: (1) Marcador de peso molecular Ladder 25 pares de bases (pb); (2) Marcador de peso molecular Ladder 50 pb; (3) Marcador de peso molecular  $\Phi$ x174; (4) Marcador de peso molecular Lambda *Hind*; (5) Fragmentos de 300 a 500 pb, de 500 a 800 pb e de 800 a 1000 pb, isolados do gel para posterior clonagem dos insertos

## 4.2 Clonagem dos concatâmeros

Os diferentes tamanhos de concatâmeros foram clonados em plasmídeos bacterianos pZErO®-1, previamente linearizados com a utilização da enzima *Sph* I (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA). Os plasmídeos foram posteriormente inseridos em bactérias eletrocompetentes *E. coli* por choque elétrico, mecanismo denominado eletroporação. Para tal procedimento, foi utilizada a linhagem de bactérias comercializada com o conjunto de reagentes *One Shot® TOP10 Eletrocomp™ E. coli* (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA), cubetas de eletroporação de 0,1 cm e o eletroporador *Gene Pulser II* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), ajustado para 1,8 kV, 25mF de capacitância e 200 ohms de resistência.

Após a eletroporação, as bactérias foram incubadas em meio líquido SOB (Bacto-triptona, Bacto-extrato levedura, NaCl e KCl) por uma hora, em banho maria a 37°C, em tubos distintos para os diferentes tamanhos de inserto. Em seguida, foram distribuídas em placas para os diferentes tamanhos de inserto, contendo meio *LB Low Salt* com agar e o antibiótico Zeocin™ na concentração de 50µg/ml (Figura 8A) e incubadas em estufa, a 37°C, durante toda a noite.

Uma característica importante do vetor pZErO®-1 é a existência de um gene denominado *CCDB* que, na ausência de inserto, ativa uma endonuclease que degrada as bactérias, possibilitando o crescimento nas placas apenas de bactérias contendo plasmídeos com insertos (Figuras 9A e 9B).

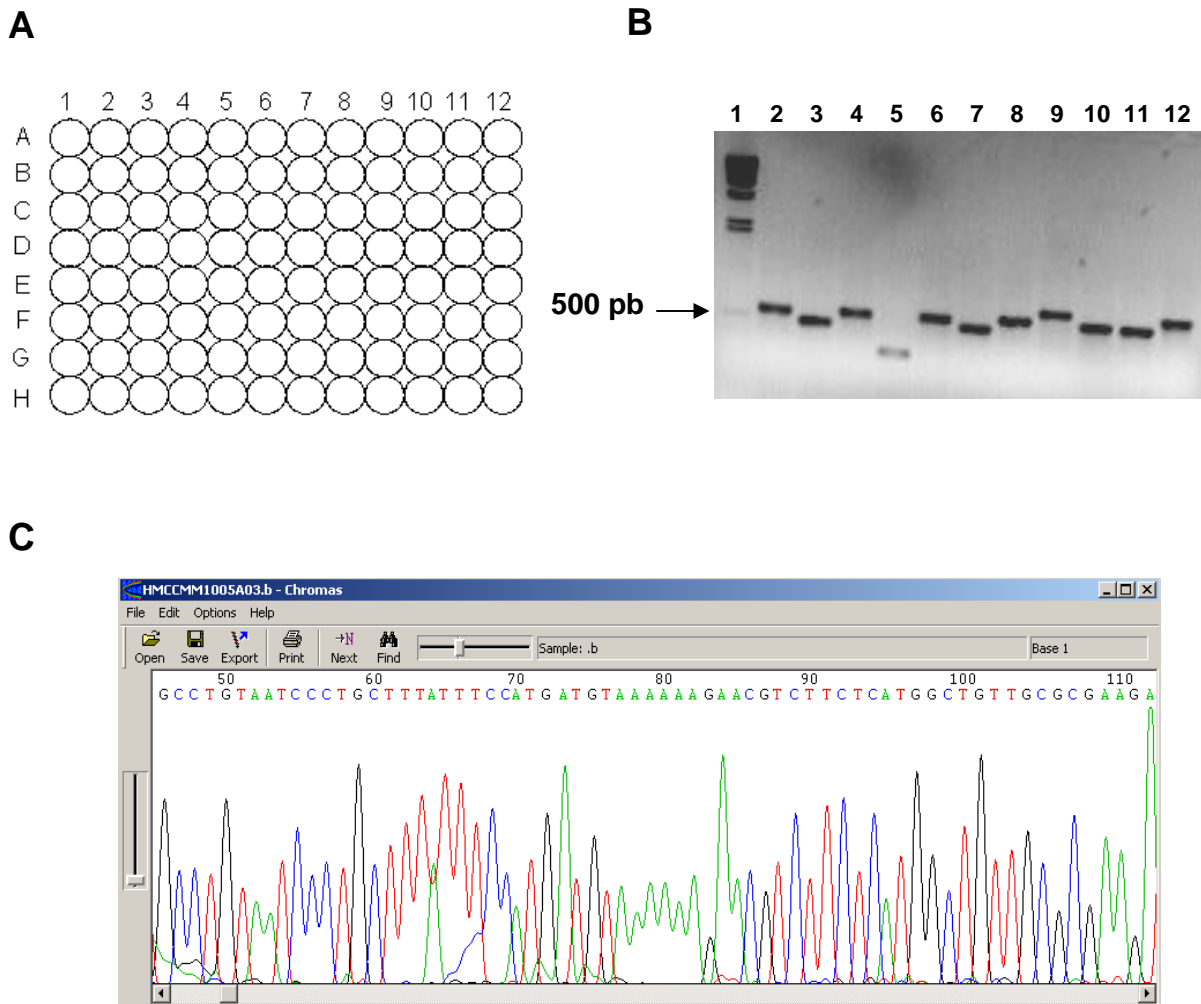


**Figura 9:** (A) Representação esquemática de um plasmídeo pZErO<sup>®</sup>-1 clonado, o qual contém fragmentos (insertos) de DNA complementar (cDNA) com 300 a 500 pares de bases (pb), 500 a 800 pb ou 800 a 1000 pb. (B) Representação esquemática de uma placa com bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* em meio de cultura *LB Low Salt* sólido com o antibiótico Zeocin<sup>™</sup>, para a seleção daquelas que contêm plasmídeos clonados com os distintos tamanhos de inserto

### 4.3 Amplificação de insertos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento

As colônias obtidas foram inoculadas em placas de cultura com 96 poços, distintas para cada tamanho de inserto, contendo meio líquido SOB e o antibiótico Zeocin™ na concentração de 50 µg/ml (Figura 10A). Uma alíquota de cada um dos 96 poços de cada placa de cultura foi utilizada para a realização da PCR com os iniciadores M13, os quais apresentam sítios específicos de ligação no plasmídeo pZErO®-1 nos dois sentidos, direto e indireto. Desta forma, os insertos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (Figura 10B). Fragmentos de DNA com 300 a 500 pb, 500 a 800 pb e 800 a 1000 pb corresponderam aos diferentes tamanhos de insertos.

A seguir, os fragmentos amplificados foram submetidos a seqüenciamento automático, com a utilização do conjunto de reagentes *Thermo Sequenase Dye Terminator Cycle Sequencing Pre-Mix* (Amersham Life Science, Inc., Cleveland, Ohio, USA), no sequenciador *MEGA BACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics, Amersham, Life Science, Inc., Cleveland, Ohio, USA), segundo as recomendações do fabricante (Figura 10C).



**Figura 10:** (A) Representação esquemática de uma placa de cultura para a proliferação de bactérias contendo insertos de diferentes tamanhos. (B) Produtos da amplificação direta dos fragmentos de DNA complementar (cDNA) pela reação em cadeia da polimerase (PCR), onde: (1) Marcador de peso molecular Lambda *Hind*; (2-12) Fragmentos correspondentes a clones com insertos de 500 pares de bases (pb). (C) Eletroesferogramas gerados pela análise no *MEGA BACE 1000 DNA Analysis System*, a partir da amplificação dos fragmentos de cDNA pela PCR

#### 4.4 Análise dos resultados obtidos pelo método SAGE

Os eletroesferogramas gerados no seqüenciamento automático foram analisados pelo programa *Phred Phrap* (<http://genome.washington.edu/phrap.docs/phred.html>; <http://genome.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>). Bases de baixa qualidade e seqüências correspondentes a vetores foram excluídas da análise pelo próprio programa.

A obtenção e posterior contagem das *tags* das bibliotecas SAGE CC e SAGE CN foram realizadas utilizando o programa *Tools for Analysing SAGE Data v1.2<sup>a</sup>* (eSAGE v1.2a) (MARGULIES & INNIS, 2000).

Para a identificação das *tags* foi utilizado o banco de dados *Best Gene for a Tag, SAGEGenie* (CGAP) (BOON et al., 2000), o qual foi concebido de forma a associar cada *tag* a somente um número de *Unigene* (*Homo sapiens, Hs number*).

As *tags* foram classificadas de acordo com as seguintes categorias: genes identificados, cDNA, mRNA, proteínas hipotéticas e genes não identificados (*no matches*), quando nenhum número de *Unigene* a elas relativo pôde ser encontrado e, ainda, como seqüências denominadas *expressed sequence tags (ESTs)* e *open reading frame tags (ORFs)*, as quais receberam números de *Unigene*, embora fossem conhecidas apenas em sua estrutura mas não em suas funções.



## **5. Análise comparativa das expressões gênicas de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e normais (SAGE CN)**

Convencionamos considerar como genes diferencialmente expressos em células epiteliais neoplásicas aqueles cujas expressões foram pelo menos cinco vezes maiores, genes hiperexpressos, ou menores, genes hipoexpressos, do que as expressões observadas em células epiteliais normais, e cujas diferenças foram altamente significativas ( $P < 0,001$ ).

## **6. Validação dos resultados obtidos pelo método SAGE**

As expressões de 10 genes selecionados foram avaliadas, por meio da qPCR, nas amostras de cDNA de células epiteliais neoplásicas e normais utilizadas para a obtenção das bibliotecas, com o intuito de verificar os resultados anteriormente obtidos pelo método SAGE. Para a validação da biblioteca foram selecionados cinco genes hiperexpressos, três genes hipoexpressos e dois genes igualmente expressos, quando feita a comparação entre as bibliotecas SAGE CC e SAGE CN. Para esta seleção, foram utilizados como critérios as maiores diferenças de expressão (genes hiper ou hipoexpressos) e potenciais relações entre os genes escolhidos e o tecido estudado. Foram excluídos da seleção genes correspondentes a *tags* classificadas como *no matches* ou não identificadas, *ESTs*, *ORFs*, cDNAs, mRNAs e proteínas hipotéticas.

### **6.1 Síntese do DNA complementar (cDNA)**

As amostras de RNA de células epiteliais neoplásicas e normais foram submetidas à síntese de cDNA com o conjunto de reagentes *Superscript III RT™* (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA). Os RNAs (2,5µg) foram tratados com DNase para afastar a contaminação por DNA. Foram adicionados a cada amostra, 1µl de DNase I 1 U/µl (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA), 1µl de DNase I Reaction Buffer 10X (200mM Tris-HCl, 20mM MgCl<sub>2</sub>,

500mM KCl<sub>2</sub>) e H<sub>2</sub>O para um volume final de 10µl. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e a reação paralisada com 1µl de EDTA 25mM, por 10 minutos, a 65°C.

A seguir, foram adicionados 1µl de oligodT 50µM e 1µl de deoxiribonucleotídeos (dNTP's) 10mM às amostras, com subseqüentes incubações por 5 minutos, a 65°C, e por 1 minuto, a 4°C. Cada amostra recebeu então 2µl de RT buffer 10X, 2µl de DTT 0,1M, 4µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1µl de RNaseOUT™ 40U/µl e 1µl de *Superscript* III RT™ 1U/µl, com incubações por 50 minutos a 50°C, e por 5 minutos a 85°C. A seguir, acrescentou-se às amostras 1µl de *E. coli* RNase H 2U/µl e elas foram incubadas por 20 minutos, a 37°C.

A quantificação do cDNA foi realizada no espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc, Wilmington, DE, USA).

A verificação da síntese de cDNA foi feita por meio da amplificação do gene da β-actina (*BAC*) por PCR. Para tal foram utilizados 5µl de tampão *Taq* polimerase 10X, 1µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1µl de dNTP's 10mM, 1µl dos iniciadores *BAC* direto (5'-AAGAGATGGCCACGGCTGCT-3') e indireto (5'-TCGCTCCAACCGACTGCTGT-3'), na concentração de 10mM, 0,5µl de *Taq* polimerase 5U/µl, 1µl de cDNA e 39µl de H<sub>2</sub>O para um volume final de 50µl. O programa da PCR teve início a 94°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e foi finalizado a 72°C por 7 minutos. Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo, para verificação da amplificação de fragmento de aproximadamente 640 pb.

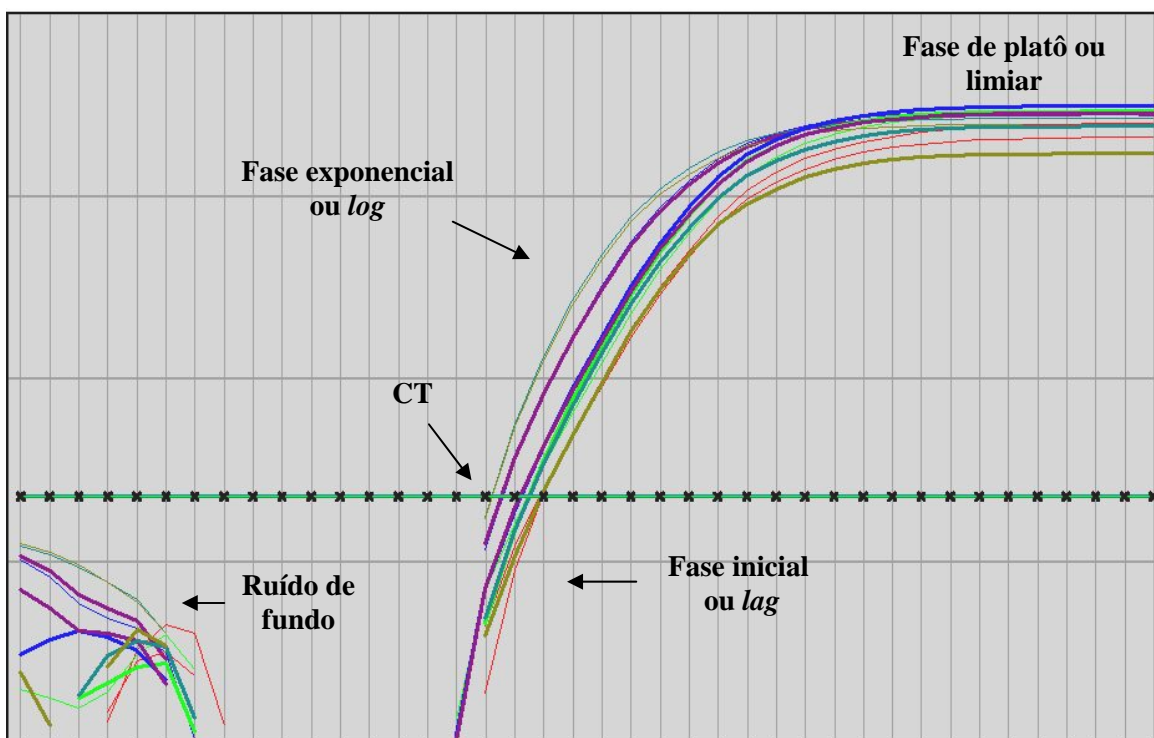
## **6.2 Quantificação da expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

A qPCR é um método de quantificação da expressão gênica que tem como base o monitoramento da fluorescência emitida pela ligação do corante *SYBRGreen* à fita de DNA recém sintetizada em cada ciclo da PCR (HIGUCHI,

1993). A fluorescência emitida é captada por uma câmara CCD (Charge-Coupled Device), acoplada ao equipamento *GeneAmp® 5700 SDS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que possui uma amplitude de detecção de 530 a 580nm.

Quando o programa detecta o aumento da fluorescência (fase inicial ou *lag*) associada ao aumento exponencial (fase *log*) do produto da PCR é determinado o ciclo de limiar (CT). Quanto maior a expressão de um gene, mais precoce será a amplificação do mesmo e, conseqüentemente, menor será o CT (Figura 11).

Convencionamos considerar como genes diferencialmente expressos em células epiteliais neoplásicas aqueles cujas expressões foram pelo menos quatro vezes maiores, genes hiperexpressos, ou menores, genes hipoexpressos, do que as expressões observadas em células epiteliais normais. Expressões com valores compreendidos entre -4 e 4 foram consideradas semelhantes.



**Figura 11:** Representação de um gráfico de fluorescência dos produtos de amplificação gênica da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). A análise da morfologia das curvas é um forte indicativo de que a reação ocorreu sem problemas. As curvas devem ter uma morfologia sigmóide, mostrando as fases *lag* ou inicial e *log* ou exponencial e fase de platô ou linear, onde não ocorrem mais ampliações. No aumento da fluorescência, durante a fase inicial associada com o aumento exponencial do produto da PCR é determinado o ciclo de limiar (CT). A quantificação da fluorescência na fase exponencial da qPCR é convertida em dados de expressão gênica. O CT é determinado pelo pesquisador, acima do ruído de fundo da reação, para excluir valores de fluorescência atribuídos a ligações inespecíficas e anelamento entre os iniciadores

Em nosso estudo, os iniciadores para a amplificação dos genes, cujas expressões foram quantificadas nas reações da qPCR, foram desenhados com o uso do programa *Primer Express* (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) e, posteriormente, analisados no programa *Blast* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)), para verificar as suas especificidades. Também foram analisados no programa *Gene Runner version 3.05* (Hastings Softwares, Hudson, NY, USA) para verificar possíveis alinhamentos entre os mesmos. Os iniciadores direto e reverso foram desenhados em éxons separados de forma a detectar uma eventual contaminação com DNA genômico, uma vez que a amplificação do íntron entre os éxons aumentaria o tamanho do produto amplificado. Também foi seguido o critério de desenhá-los o mais próximo possível da cauda poli-A do mRNA. Os iniciadores utilizados para a amplificação do gene controle endógeno, *GAPDH*, e dos genes selecionados foram sintetizados pela Promega (XXIDT Integrated DNA Technologies, Inc., EUA) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes selecionados para a validação do método análise seriada da expressão gênica (SAGE) nas bibliotecas de células epiteliais neoplásicas e normais pelo método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e tamanhos dos fragmentos amplificados

Iniciadores	Seqüência dos iniciadores	Tamanho dos fragmentos amplificados (pb)
<i>GAPDH</i>	D – 5' GCACCGTCAAGGCTGAGAAC 3'	89
	R – 5' CCACTTGATTTTGGAGGGATCT 3'	
<i>CEACAM6</i>	D – 5' TGAAGAAGCAACCGGACAGTT 3'	71
	R – 5' TGGAGTTGTTGCTGGAGATGG 3'	
<i>KLK6</i>	D – 5' GCCAGATCACCCAGAACATGT 3'	86
	R – 5' TACCAGCGGACCCCCAG 3'	
<i>LYZ</i>	D – 5' TGATCCACAAGGCATTAGAGCA 3'	71
	R – 5' CATACTGACGGACATCTCTGTTTTG 3'	
<i>PFN1</i>	D – 5' CACCTTCAATGTCACTGTCACCA 3'	80
	R – 5' TCAAACCACCGTGGACACCT 3'	
<i>PLA1A</i>	D – 5' ACTGCCCTTTTGCCTGTCAA 3'	71
	R – 5' CTTGCTTGTAAGTTCACTGGTTCA 3'	
<i>S100A8</i>	D – 5' CCTGAAGAAATTGCTAGAGACCG 3'	78
	R – 5' TCCAACCTTTGAACCAGACGT 3'	
<i>S100A9</i>	D – 5' ACCCAGACACCCTGAACCAG 3'	93
	R – 5' TGACCTTTTCATTCTTATTCTCCTT 3'	

**continuação**

---

<i>VIL2</i>	D – 5' AGGCGGTGGATCAGATAAAGAG 3'	72
	R – 5' GGGCAATCTTGGCAGTGTATT 3'	
<i>ZFHX1B</i>	D – 5' CCCTTCTGCGACATAAATACGA 3'	94
	R – 5' CGATAAGGTGGTGCTTGTGTTT 3'	
<i>ZNF277</i>	D – 5' TTGTCATAGCTGATGTCAAGTTGG 3'	75
	R – 5' TTCAGTGAACCTTTTCCTCCAA 3'	

---

D: iniciador direto; R: iniciador reverso

Os iniciadores foram diluídos em H<sub>2</sub>O em capela de fluxo laminar estéril, para obter a concentração de 100μM, e quantificados em espectrofotômetro.

Foram realizadas PCRs convencionais em diferentes temperaturas para padronizar as temperaturas ideais para a amplificação de cada gene a ser validado, utilizando o cDNA obtido da linhagem celular K562, que expressa sabidamente a maioria dos genes, com o intuito de poupar o cDNA das amostras utilizadas no método SAGE.

A reação da PCR foi realizada utilizando 5μl de tampão *Taq* polimerase 10X, 2μl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1μl de dNTPs 10mM, 1μl dos iniciadores direto e reverso na concentração de 10μM, 0,2μl de *Taq* polimerase 5U/μl, 1μl de cDNA e 38,8μl de H<sub>2</sub>O, para um volume final de 50μl. Os produtos da reação foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 1,3%.

Foram realizadas qPCRs com iniciadores direto e reverso nas concentrações de 150nM, 300nM e 600nM para identificar a concentração ideal dos mesmos para cada um dos genes a ser avaliado. A concentração ideal de cada iniciador foi obtida durante a fase exponencial das curvas de fluorescência obtidas.

A partir das curvas de fluorescência obtidas, uma reta foi gerada pelo programa *GeneAmp® 5700 SDS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), o qual calculou o coeficiente de correlação da reta pela fórmula:  $E = 10^{(-1/slope)-1}$ , onde o *slope* é o coeficiente de inclinação da reta (PFAFFL, 2001). Para que a qPCR fosse confiável e reprodutiva, foi necessário que as amplificações apresentassem 95-100% de eficiência de amplificação, definidas como a identificação do coeficiente de correlação de Pearson maior do que 0,95 a cada ciclo em duplicata e a presença de inclinação da reta entre -3,1 e 3,6.

A seguir, foram realizadas as qPCRs com as concentrações ideais de cada iniciador, mas com seis concentrações de cDNA da linhagem K562 (2,0 ng, 6,32 ng, 20 ng, 63,26 ng, 120 ng e 200 ng), para definir a quantidade ideal que possibilitasse alta eficiência da reação. Os resultados da qPCR para cada gene foram obtidos pelo equipamento *GeneAmp® 5700 SDS* (Applied Biosystems,



Foster City, CA, USA), em forma de gráficos de fluorescência versus número de ciclos da qPCR.

A seguir, a quantificação da expressão dos genes selecionados para a validação do método SAGE foi realizada com o reagente *SYBRGreen PCR Master Mix*® (Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MS, USA), composto pelo corante *SYBRGreen*, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Tampão e *Taq Ampli-Gold*. As reações realizadas continham 12,5µl do reagente *SyberGreen PCR Master Mix*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 2,0 ng de amostra de cDNA das células epiteliais neoplásicas e das células epiteliais normais e a concentração ideal de cada iniciador, determinada anteriormente, perfazendo um volume final de 25µl. O programa foi iniciado a 95°C por 10 minutos, seguindo-se de 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles negativos, com água estéril em substituição ao cDNA, também foram utilizados.

A expressão dos genes de interesse na amostra SAGE CC foi normalizada considerando-se a expressão do gene controle (*GAPDH*). A seguir, a expressão de cada gene das células epiteliais neoplásicas foi calculada pela aplicação da fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Para tanto, a quantificação da fluorescência na fase exponencial da qPCR foi convertida em dados de expressão gênica ou CT. O CT foi determinado pelo pesquisador, acima do ruído de fundo da reação.

Foram calculadas as médias entre os valores de CT obtidos das reações, realizadas em duplicata, para cada amostra. A derivação aritmética  $\Delta CT$  foi a diferença entre o CT de cada gene e o CT do gene controle. A seguir, foi aplicada a fórmula  $\Delta\Delta CT$ , que foi a diferença entre o  $\Delta CT$  de cada amostra e o  $\Delta CT$  da amostra calibradora, que foi a amostra SAGE CN. Após este passo, foi aplicada a fórmula aritmética  $2^{-\Delta\Delta CT}$  e gerado o valor da expressão de cada gene. Nos casos em que o valor obtido foi menor que zero, foi aplicada a fórmula  $-(1/2^{-\Delta\Delta CT})$  para a obtenção do valor da expressão do gene. Vale comentar que o valor da expressão de cada gene na amostra calibradora foi subtraído dele mesmo ( $\Delta\Delta CT = 0$ ) e, em seguida, submetido à fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ( $2^{-0} = 1$ ) sendo, portanto, igual a um.

Para a certificação de que a fluorescência emitida não foi gerada por amplificação inespecífica dos iniciadores, foi feita a análise da curva de dissociação de cada gene de interesse, gerada pelo programa do equipamento. Esta curva foi baseada na temperatura de dissociação, específica de cada produto amplificado, que foi determinada pela sua composição de nucleotídeos. A amplificação específica dos iniciadores determinou uma única curva de dissociação, enquanto que a presença de mais de uma curva indicou que ocorreram amplificações inespecíficas.

Os passos descritos foram seguidos de acordo com as recomendações citadas no *GeneAmp® 5700 Sequence Detection System – User's Manual* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **6.3. Expressões dos genes de interesse na amostra do SAGE CC**

Assim, as expressões de 10 genes de interesse, medidas por qPCR na amostra de células epiteliais neoplásicas utilizadas para a construção da biblioteca SAGE CC, foram comparadas com as identificadas na mesma amostra pelo método SAGE.

É importante comentar que a qPCR foi considerada o padrão ouro para a quantificação da expressão gênica e, desta forma, a comparação das expressões gênicas medidas pelos dois métodos serviu para verificar a eficácia do método SAGE na identificação da expressão gênica em células epiteliais neoplásicas.

## **7. Análise da expressão dos genes de interesse em outras amostras**

As expressões dos 10 genes de interesse foram posteriormente medidas pela qPCR em amostras de células epiteliais de cinco pacientes com ACE moderadamente diferenciado para verificar se os resultados obtidos pelo método SAGE foram reprodutíveis na doença.

## **8. Perfil funcional dos transcritos**

Os 171 transcritos diferencialmente expressos identificados em células epiteliais normais e neoplásicas do cólon foram distribuídos de acordo com duas categorias funcionais, a de processos biológicos e a de funções moleculares.

As análises foram realizadas considerando-se o segundo nível de especificidade da plataforma *Gene Ontology Consortium* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) para a identificação dos processos biológicos e das funções moleculares, respectivamente (ASHBURNER et al., 2000).

## **9. Aspectos éticos**

O estudo foi realizado em amostras de tumor ou mucosa normal de cólon obtidas por ocasião de intervenção cirúrgica inevitável no Hospital das Clínicas da UNICAMP para a retirada de tumor maligno ou para a correção de megacólon chagásico, respectivamente.

Os procedimentos foram realizados após a obtenção dos termos de consentimento, livre e esclarecido pós-informação, assinados por pacientes (Anexo 4) e por controles (Anexo 5) que aceitaram participar do estudo, e após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer n.º: 565/2002) e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP (Parecer n.º: 999/2003) (Anexo 6).

## **RESULTADOS**

---



## 1. Aspectos clínicos

Foram inseridos no estudo pacientes com ACE, ao diagnóstico, e indivíduos controle com megacólon chagásico, atendidos no Ambulatório de Proctologia e submetidos a intervenção cirúrgica inevitável no Hospital das Clínicas da UNICAMP, no período de 04/08/03 a 05/12/05.

Foram avaliados 24 pacientes com ACE e seis indivíduos controle no período do estudo. Dezoito dos 24 pacientes foram excluídos da análise por apresentarem ACE bem ou pouco diferenciado (n= 1), grau de pureza das células insuficiente (<90%) no resultado da citometria de fluxo (n= 3) ou amostras com número de células epiteliais insuficiente para a extração de RNA (n= 14).

Dos seis indivíduos controle, quatro foram excluídos do estudo por apresentarem grau de pureza das amostras de células insuficiente (<90%) no resultado da citometria de fluxo (n= 1) ou amostras com número de células epiteliais insuficiente para a extração de RNA (n= 3).

Assim, foram incluídos no estudo seis pacientes com ACE moderadamente diferenciado e dois indivíduos controle.

Os pacientes incluídos no estudo apresentaram mediana da idade de 72 anos (variação: 32–89) e idade média de 65,7 anos. A distribuição dos pacientes por sexo mostrou um predomínio da doença em pacientes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino (relação 2,0:1,0). Todos foram caucasianos e não tabagistas ou ex-tabagistas.

Dos seis pacientes incluídos no estudo, três apresentaram tumor de localização proximal e três de localização distal. Cinco pacientes apresentaram ACE moderadamente diferenciado do estágio III e apenas um apresentou ACE moderadamente diferenciado do estágio II.

As distribuições individualizadas dos seis pacientes de acordo com seus aspectos clínicos e laboratoriais estão apresentadas na Tabela 2.

Os dois indivíduos controle tinham como características: 50 anos de idade, sexo masculino, negróide e ex-tabagista, e 39 anos de idade, sexo feminino, caucasóide e não tabagista, respectivamente.

**Tabela 2:** Dados relativos à idade, ao sexo, à raça, ao hábito de fumar, à localização do tumor, ao estágio da doença e ao grau de diferenciação do tumor dos seis pacientes com adenocarcinoma de cólon do estudo

Nº do caso	Idade (anos)	Sexo	Raça	Tabagismo	Localização do tumor	Estadiamento TNM	Grau de diferenciação do adenocarcinoma	Células epiteliais após separação (%)
1	70	M	C	NT	P	III	moderado	92,4
2	74	F	C	NT	D	III	moderado	96,5
3	54	M	C	ET	P	II	moderado	96,0
4	89	M	C	NT	D	III	moderado	90,6
5	32	F	C	NT	P	III	moderado	92,0
6	75	M	C	NT	D	III	moderado	93,2

M: masculino; F: feminino; C: caucasóide; NT: não tabagista; ET: ex-tabagista; P: proximal; D: distal

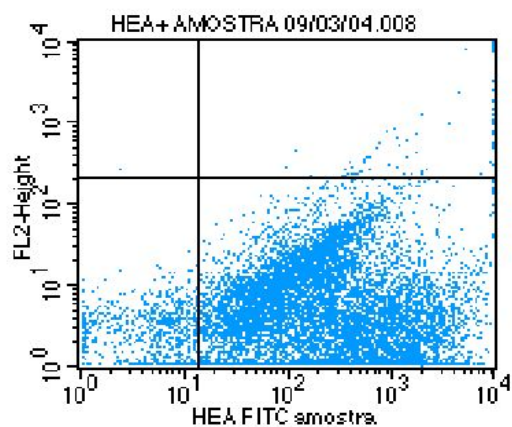


## **2. Obtenção de amostras purificadas de células epiteliais neoplásicas**

As distribuições individualizadas das porcentagens de células epiteliais obtidas após separação em coluna magnética estão apresentadas na Tabela 2.

As amostras de células epiteliais dos seis pacientes com ACE moderadamente diferenciado incluídos no estudo apresentaram grau de pureza maior do que 90,0% (Tabela 2; Figura 12).

O caso de número 1 foi utilizado para a construção da biblioteca SAGE de células epiteliais neoplásicas.

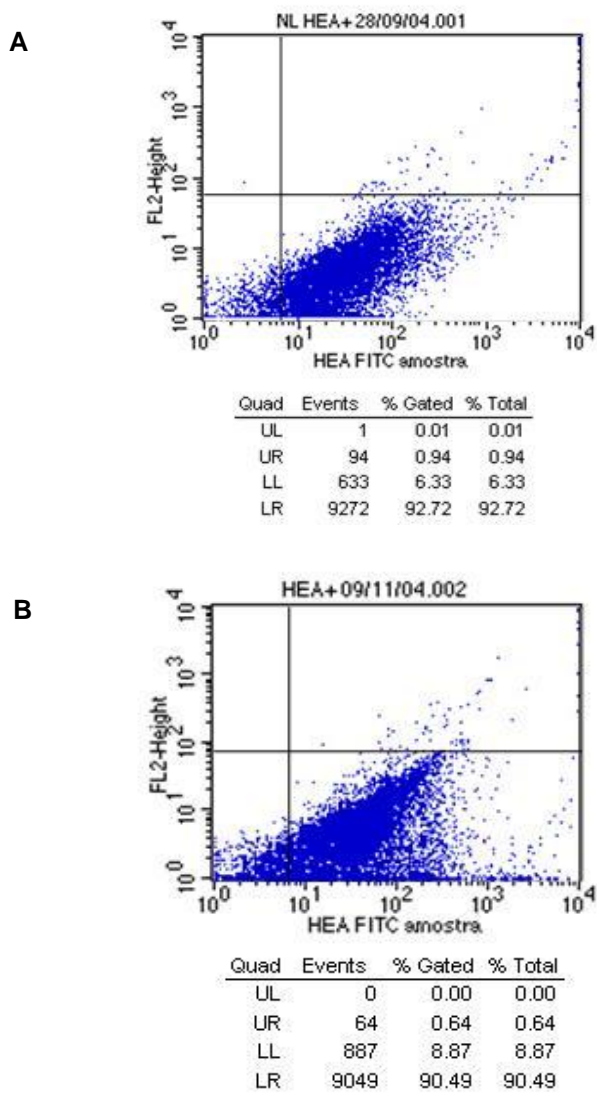


Quad	Events	% Gated	% Total
UL	1	0.01	0.01
UR	74	0.74	0.74
LL	689	6.89	6.89
LR	9236	92.36	92.36

**Figura 12:** Células epiteliais de paciente com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado, obtidas por meio da marcação com o anticorpo anti-HEA macs microbeads e seleção positiva em coluna magnética em quadrante inferior direito de gráfico de pontos obtido por citometria de fluxo com a marcação das células pelo fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (grau de pureza da amostra: 92,36%)

### **3. Obtenção de amostras purificadas de células epiteliais normais**

As amostras de células epiteliais dos dois indivíduos controle incluídos no estudo apresentaram graus de pureza de 92,72% e 90,49%, respectivamente (Figuras 13A e 13B). Os dois casos foram utilizados para a construção da biblioteca SAGE de células epiteliais normais.



**Figura 13:** Células epiteliais normais de pacientes com megacólon chagásico, obtidas por meio da marcação com o anticorpo anti-HEA *macs* *microbeads* e seleção positiva em coluna magnética em quadrante inferior direito de gráfico de pontos obtido por citometria de fluxo com a marcação das células pelo fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (graus de pureza das amostras: 92,72% e 90,49%, respectivamente)

#### **4. Extração do RNA total de células epiteliais neoplásicas e normais**

RNA de qualidade e quantidade adequadas foi obtido das amostras de pacientes com ACE moderadamente diferenciado e das amostras de células epiteliais normais (Tabela 3).

**Tabela 3:** Quantificação dos RNAs obtidos das amostras de pacientes com ACE moderadamente diferenciado (amostras 1 a 6) e das amostras de células epiteliais normais (amostras 7 e 8)

<b>Amostras</b>	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Quantificação (ng/<math>\mu</math>l)</b>	556,2	657,1	662,6	649,8	670,6	623,6	609,9	656,4

## 5. Método da análise seriada da expressão gênica (SAGE)

Após o seqüenciamento de, aproximadamente, 9.000 clones, totais de 44.004 *tags* e de 43.570 *tags* foram obtidas das bibliotecas SAGE CC e SAGE CN, representando 16.484 e 13.479 *tags* únicas, respectivamente. Assim, as *tags* únicas constituíram cerca de 40% do total de *tags* obtidas na biblioteca SAGE CC e cerca de 30% do total das *tags* obtidas na biblioteca SAGE CN.

As *tags* únicas foram classificadas pelo banco de dados *Best Gene for a Tag* e *SAGEGenie* (CGAP) nas categorias apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4:** Sumário do número de tags únicas observadas nas bibliotecas de células epiteliais intestinais neoplásicas (SAGE CC) e normais (SAGE CN)

<b>Classificação das <i>tags</i> únicas</b>	<b>SAGE CC</b>	<b>SAGE CN</b>
Genes identificados	9.346 (56,7%)	6.716 (49,8%)
<i>ESTs</i> , <i>ORFs</i> , proteínas hipotéticas, cDNA e mRNA	5.622 (34,1%)	5.376 (39,9%)
Genes não identificados	1.516 (9,2%)	1.387 (10,3%)



Vale comentar que cerca de 10% das *tags* únicas corresponderam a genes não identificados em ambas as bibliotecas.

As distribuições das *tags* únicas de acordo com as frequências de ocorrência nas bibliotecas SAGE CC e CN estão apresentadas na Tabela 5. Verificamos que a maioria delas, cerca de 97%, foi detectada dez vezes ou menos e que apenas um pequeno número de *tags* únicas, cerca de 0,3%, foi identificado mais do que 100 vezes nos materiais examinados.

Dentre as *tags* únicas identificadas em ambas as bibliotecas, 12.578 foram exclusivas da biblioteca SAGE CC e 9.573 foram exclusivas da biblioteca SAGE CN.

Os 171 genes com hiper e hipoexpressão em células epiteliais neoplásicas do cólon na biblioteca SAGE CC, quando comparadas às expressões da biblioteca SAGE CN pelo banco de dados *Best Gene for a Tag*, estão apresentados nos Apêndices 1 e 2, respectivamente.

Os primeiros 100 genes expressos de forma similar em células epiteliais neoplásicas e normais do cólon estão apresentados no Apêndice 3.

As composições completas das bibliotecas estão apresentadas na página <http://www.hemocentro.unicamp.br/cancerdecolon>.

**Tabela 5:** Distribuição relativa das freqüências, em número e porcentagem, das tags únicas identificadas nas bibliotecas de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e de células epiteliais normais (SAGE CN)

	<b>SAGE CC</b>		<b>SAGE CN</b>	
	<i>Tags</i> (número)	<i>Tags</i> (%)	<i>Tags</i> (número)	<i>Tags</i> (%)
1	12.189	73,95	10.609	78,71
2 a 10	3.860	23,42	2.514	18,65
11 a 19	217	1,31	141	1,04
20 a 49	123	0,75	117	0,87
50 a 100	58	0,35	51	0,38
> 100	37	0,22	47	0,35

## **6. Análise comparativa das expressões gênicas de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e normais (SAGE CN) do cólon**

Foram identificados 171 genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas de células epiteliais neoplásicas e normais, sendo que 86 (50,3%) estavam hiperexpressos e 85 (49,7%) estavam hipoexpressos na biblioteca SAGE CC.

## **7. Validação dos resultados obtidos pelo método SAGE**

As expressões de 10 genes selecionados da biblioteca SAGE CC, cinco genes hiperexpressos (Tabela 6), três genes hipoexpressos (Tabela 7) e dois genes com expressão semelhante (Tabela 8), foram medidas por qPCR na amostra de cDNA de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) e de células epiteliais normais (SAGE CN).

**Tabela 6:** Distribuição dos cinco genes hiperexpressos em células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) em relação às células epiteliais normais (SAGE CN) do cólon, localização cromossômica dos genes, diferença de expressão entre as bibliotecas e significância estatística da comparação entre as bibliotecas

	<b>Símbolo</b>	<b>Localização cromossômica</b>	<b>Descrição</b>	<b>SAGE CC</b>	<b>SAGE CN</b>	<b>Diferença de Expressão</b>	<b>Valor de P</b>
<b>1</b>	<i>S100A8</i>	1q21	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	89	1	88,12	6,7763E <sup>-21</sup>
<b>2</b>	<i>LYZ</i>	12q15	Lysozyme (renal amyloidosis)	78	0	77,23	6,7763E <sup>-21</sup>
<b>3</b>	<i>S100A9</i>	1q21	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	33	1	32,67	2,4674E <sup>-09</sup>
<b>4</b>	<i>KLK6</i>	19q13.3	Kallikrein 6 (neurosin-zyme)	28	0	27,72	4,2995E <sup>-09</sup>
<b>5</b>	<i>CEACAM6</i>	19q13.2	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	20	0	19,8	1,058E <sup>-06</sup>

**Tabela 7:** Distribuição dos três genes hipoeexpressos em células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) em relação às células epiteliais normais (SAGE CN) do cólon, localização cromossômica dos genes, diferença de expressão entre as bibliotecas e significância estatística da comparação entre as bibliotecas

	<b>Símbolo</b>	<b>Localização cromossômica</b>	<b>Descrição</b>	<b>SAGE CC</b>	<b>SAGE CN</b>	<b>Diferença de Expressão</b>	<b>Valor de P</b>
<b>1</b>	<i>ZFHX1B</i>	2q22	Zinc finger homeobox 1b	1	109	-110,09	6,7763E <sup>-21</sup>
<b>2</b>	<i>PLA1A</i>	3q13.13-q13	Phospholipase A1 member A	3	50	-16,83	2,298E <sup>-12</sup>
<b>3</b>	<i>ZNF277</i>	7q31.1	Zinc finger protein 277	6	90	-15,15	6,7763E <sup>-21</sup>

**Tabela 8:** Distribuição dos dois genes igualmente expressos na biblioteca de células epiteliais neoplásicas (SAGE CC) em relação às células epiteliais normais (SAGE CN) do cólon, localização cromossômica dos genes, diferença de expressão entre as bibliotecas e significância estatística da comparação entre as bibliotecas

	<b>Símbolo</b>	<b>Localização cromossômica</b>	<b>Descrição</b>	<b>SAGE CC</b>	<b>SAGE CN</b>	<b>Diferença de Expressão</b>	<b>Valor de P</b>
<b>1</b>	<i>VIL2</i>	6q25.2-q26	Villin 2 (ezrin)	25	22	1,13	0,69072096
<b>2</b>	<i>PFN1</i>	17p13.3	Profilin 1	22	19	1,15	0,66729607

### **7.1. Síntese do DNA complementar (cDNA)**

A qualidade da síntese do cDNA a partir de RNA total de amostras de células epiteliais neoplásicas e normais do cólon foi avaliada através da amplificação, por PCR, do gene *BAC* nas amostras.

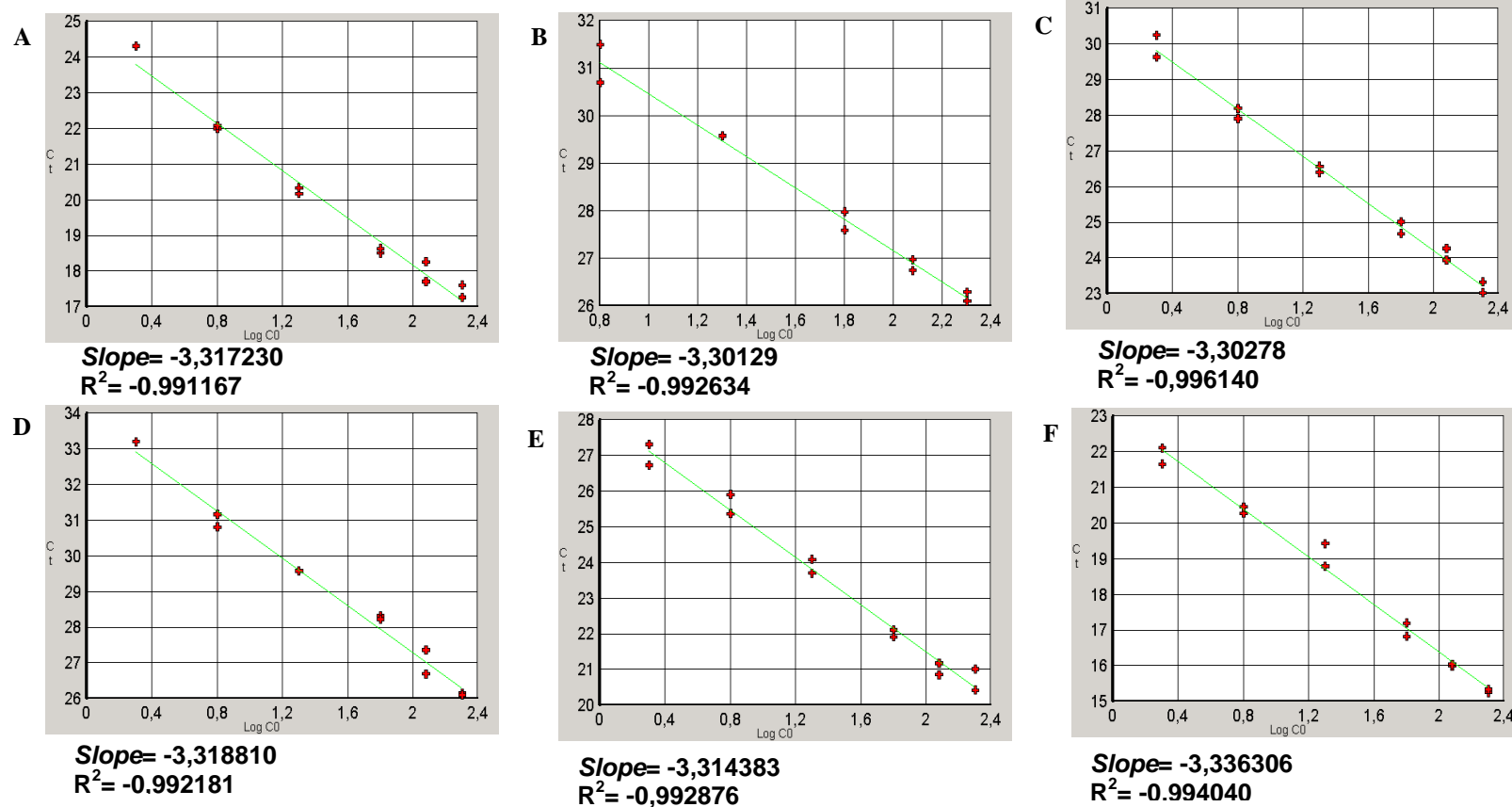
### **7.2. Quantificação da expressão gênica por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

Os iniciadores foram sintetizados e as reações para a qPCR foram padronizadas de forma satisfatória.

As análises da eficiência da amplificação de seis dos 10 iniciadores estão apresentadas na Figura 14. As reações foram otimizadas para que tivessem de 95-100% de eficiência de amplificação e coeficiente da reta entre 3,1 e 3,6. As análises das curvas de dissociação relativas a estes genes estão apresentadas na Figura 15.

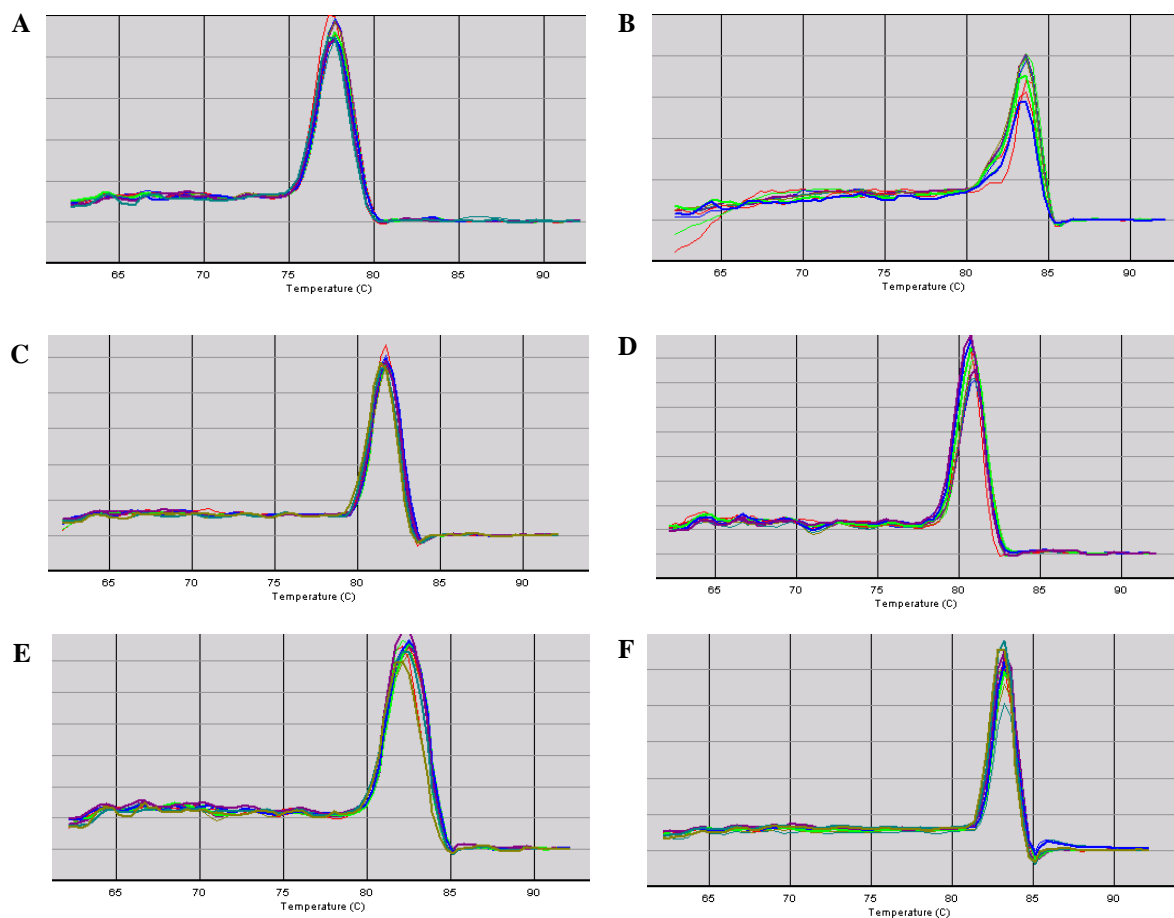
Vale comentar que resultados semelhantes e não apresentados foram obtidos para as mesmas análises dos outros sete genes utilizados para a validação do SAGE.

As concentrações, as eficiências e as temperaturas de dissociação dos iniciadores utilizados na amplificação dos 10 genes selecionados para a validação, pela qPCR, nas amostras de células epiteliais neoplásicas do SAGE CC estão apresentados na Tabela 9.



**Figura 14:** Representação gráfica das análises da eficiência de amplificação de seis iniciadores, utilizados no método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). As reações foram otimizadas para que tivessem de 95-100% de eficiência e *slope* ou coeficiente de inclinação da reta entre 3,1 e 3,6. No eixo “x” encontra-se a fase exponencial (*log*) das concentrações de DNA complementar utilizadas para o programa gerar as curvas padrão de eficiência em duplicata e, no eixo “y” encontra-se o ciclo onde foi detectada a fluorescência na fase exponencial (*lag*). (A) gene *S100A8*, (B) gene *KLK6*, (C) gene *ZFH1B*, (D) gene *ZNF277*, (E) gene *VIL2* e (F) gene *PFN1*





**Figura 15:** Representação gráfica das curvas de dissociação para identificar a presença de contaminantes ou produtos inespecíficos. A curva de dissociação ocorre quando, em determinada temperatura, o produto da reação em cadeia da polimerase separa as fitas de DNA, com queda de fluorescência, já que o *SYBRGreen* intercala somente dupla fita de DNA. A temperatura de dissociação ( $T_m$ ) é vista como um pico nos gráficos. O eixo “x” representa as temperaturas, e o eixo “y”, a derivativa negativa da emissão da fluorescência. (A) gene *S100A8*, (B) gene *KLK6*, (C) gene *ZFHX1B*, (D) gene *ZNF277*, (E) gene *VIL2*, (F) gene *PFN1*

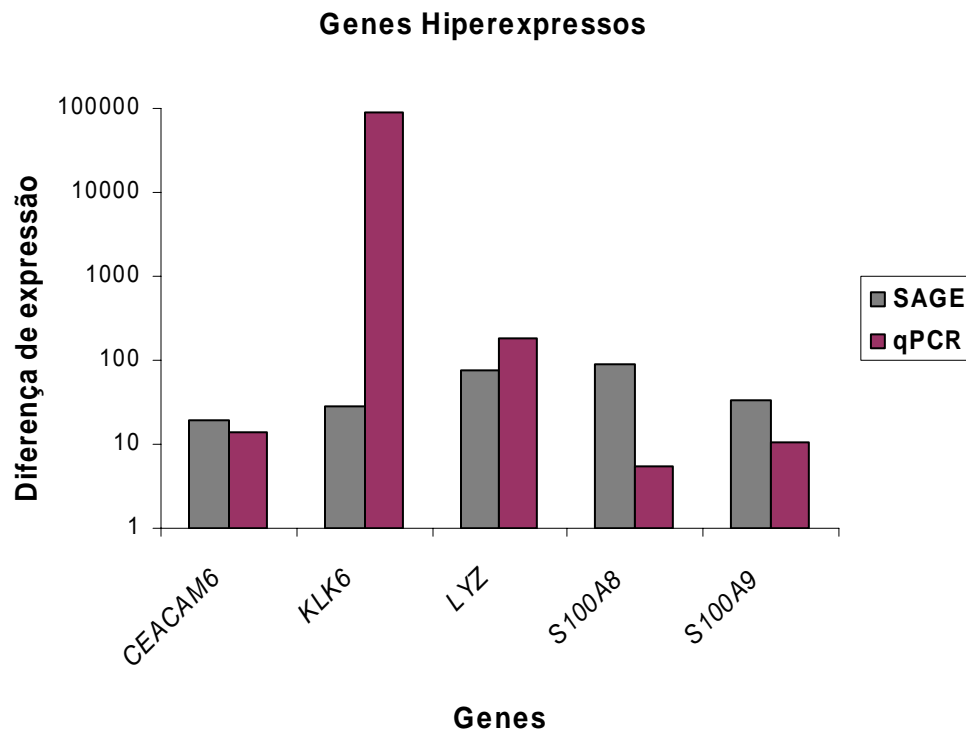
**Tabela 9:** Características dos iniciadores e reações de amplificação dos genes para a validação do método de análise seriada da expressão gênica total (SAGE) pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

<b>Iniciadores</b>	<b>Concentração dos iniciadores otimizada</b>	<b>Eficiência de amplificação (%)</b>	<b>Temperaturas de dissociação (TM)</b>
<i>GAPDH</i>	300 nM	100,00	81
<i>CEACAM6</i>	300nM	99,6	82
<i>KLK6</i>	600nM	99,8	83
<i>LYZ</i>	300nM	100,0	79
<i>PFN1</i>	150nM	100,0	81
<i>PLA1A</i>	150nM	100,0	78
<i>S100A8</i>	150nM	99,9	78
<i>S100A9</i>	600nM	100,0	77
<i>VIL2</i>	300nM	100,0	83
<i>ZFHX1B</i>	300nM	99,6	77
<i>ZNF277</i>	300nM	99,7	75

### 7.3. Expressões dos genes de interesse em amostra do SAGE CC

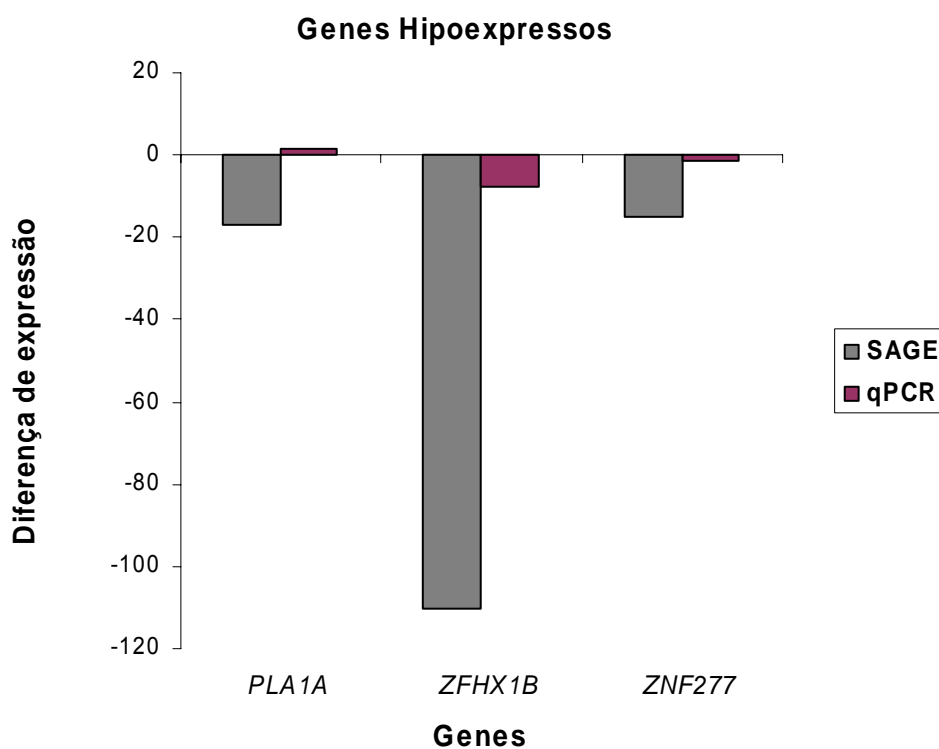
Expressões gênicas concordantes, medidas por SAGE e qPCR, foram identificadas em oito dos 10 genes avaliados (80,0%).

As expressões gênicas foram concordantes nos cinco genes hiperexpressos ao SAGE (Figura 16).



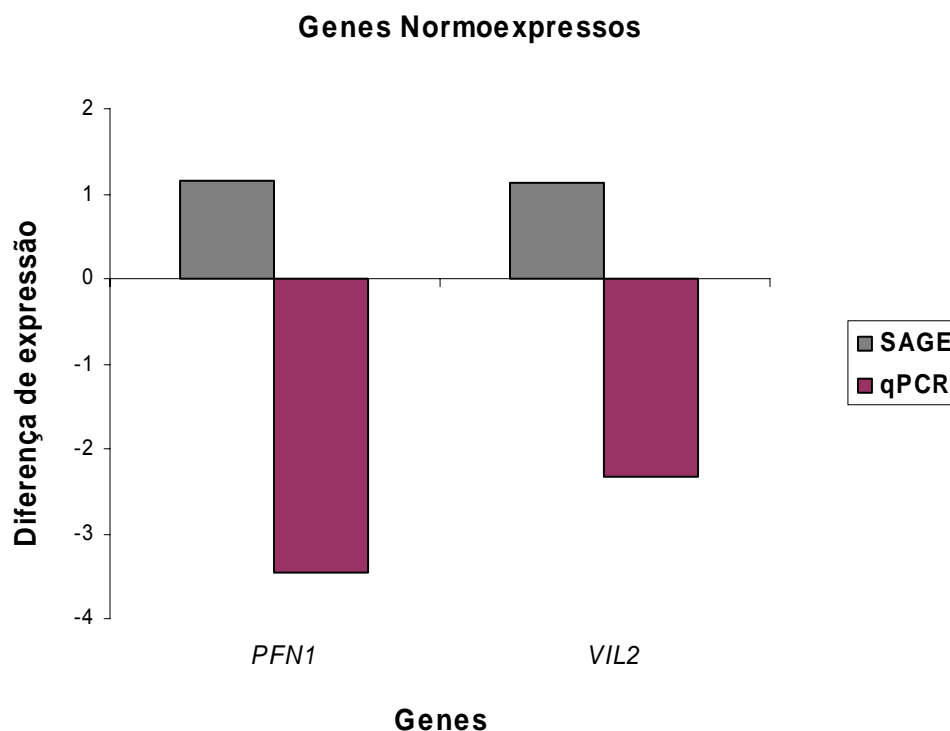
**Figura 16:** Representação gráfica de cinco expressões gênicas concordantes medidas pelo método SAGE e pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), em amostra de células epiteliais neoplásicas do adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado, a partir da qual foi construída a biblioteca SAGE

Expressões gênicas discordantes, medidas por SAGE e qPCR, foram identificadas em dois dos três genes hipoeexpressos (Figura 17).



**Figura 17:** Representação gráfica de duas expressões gênicas discordantes e uma expressão gênica concordante medidas pelo método SAGE e pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), em amostra de células epiteliais neoplásicas do adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado, a partir da qual foi construída a biblioteca SAGE

Os resultados das expressões gênicas concordantes para os dois genes normoexpressos, avaliados por SAGE e qPCR, estão apresentados na Figura 18.



**Figura 18:** Representação gráfica de duas expressões gênicas concordantes, medidas pelo método SAGE e pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR), em amostra de células epiteliais neoplásicas do adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado, a partir da qual foi construída a biblioteca SAGE

## **8. Análise da expressão dos genes de interesse em outras amostras**

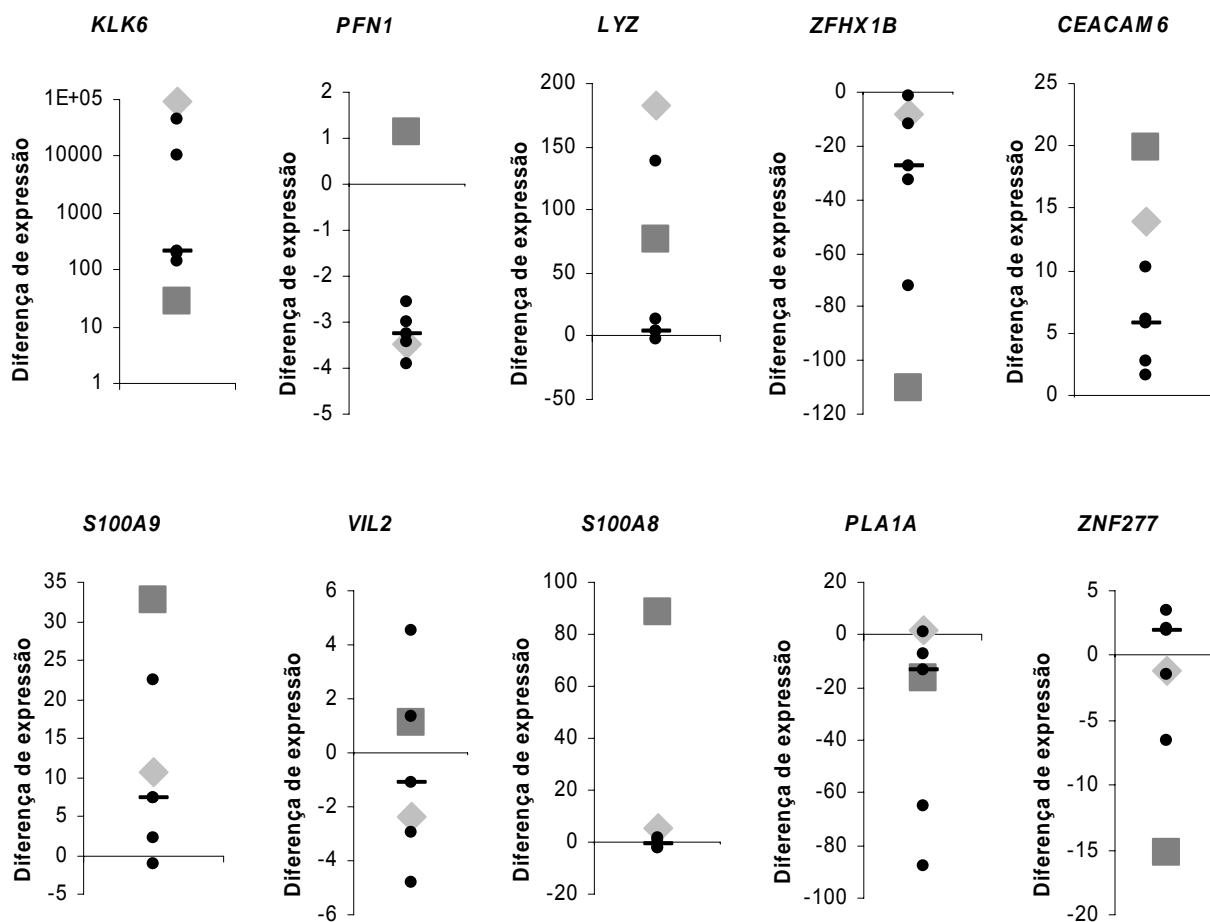
As expressões dos 10 genes de interesse foram posteriormente medidas pela qPCR em amostras de células epiteliais de cinco pacientes com ACE (Casos nº 2 a nº 6, Tabela 2) e estão apresentadas na Tabela 10.

As expressões do total dos genes de interesse foram concordantes com as obtidas pelo método SAGE para a maioria das amostras dos pacientes avaliados (Figura 19). Vale comentar que as expressões de cada gene foram, em geral, também semelhantes às medidas pela qPCR na amostra utilizada para a construção da biblioteca SAGE CC. Ainda, observa-se que a variação dos níveis das expressões gênicas entre os pacientes não apresenta correlação entre as mesmas.

Assim, 100% das amostras foram concordantes para os genes *KLK6* e *PFN1*. Para os genes *LYZ*, *PLA1A* e *ZFHX1B*, 80% das amostras foram concordantes; para os genes *CEACAM6*, *S100A9* e *VIL2*, 60% foram concordantes; e para o gene *ZNF277*, 20% foram concordantes. Para o gene *S100A8*, 100% das amostras foram discordantes.

**Tabela 10:** Distribuição dos seis pacientes com adenocarcinoma de cólon moderadamente diferenciado inseridos no estudo de acordo com as diferenças de expressão gênica medidas por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real em células epiteliais neoplásicas e normais do cólon

Expressão Gênica (N° de vezes)										
Amostra	<i>KLK6</i>	<i>CEACAM6</i>	<i>S100A8</i>	<i>S100A9</i>	<i>LYZ</i>	<i>ZFHX1B</i>	<i>PFN1</i>	<i>VIL2</i>	<i>PLA1A</i>	<i>ZNF277</i>
1	89215,08	13,90	5,39	10,56	182,90	-7,94	-3,46	-2,33	1,69	-1,19
2	199,81	1,56	-1,96	7,26	4,21	-32,60	-3,42	-4,81	-13,22	2,00
3	138,62	2,77	1,14	7,31	-2,71	-27,50	-3,25	-2,94	-65,34	-6,49
4	213,78	10,30	1,57	22,47	138,60	-1,27	-3,01	4,53	1,36	1,97
5	44995,72	6,09	-2,11	2,25	4,21	-11,90	-3,92	1,35	-7,16	3,39
6	10697,60	5,84	-1,01	-1,27	13,55	-72,50	-2,54	-1,12	-88,03	-1,53



**Figura 19:** Representação gráfica da comparação entre as expressões dos genes, *KLK6*, *PFN1*, *LYZ*, *ZFH1B*, *CEACAM6*, *S100A9*, *VIL2*, *S100A8*, *PLA1A* e *ZNF277*, medidas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), em amostras de células epiteliais do cólon dos cinco pacientes com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado (mediana representada pela linha horizontal). As expressões de cada gene foram, em geral, semelhantes às medidas na amostra utilizada para a construção da biblioteca SAGE CC (♦) e concordantes com as medidas pelo método SAGE (■), considerando-se o padrão de expressão estabelecido na escala de cada gráfico de acordo com a classificação do gene como hiper ou hipoexpresso (diferença de expressão  $\geq 4$ ) ou normoexpresso (diferença de expressão  $< 4$ ), sendo que para o gene *S100A8* elas foram completamente divergentes em relação à medida na amostra utilizada para a construção da biblioteca SAGE CC



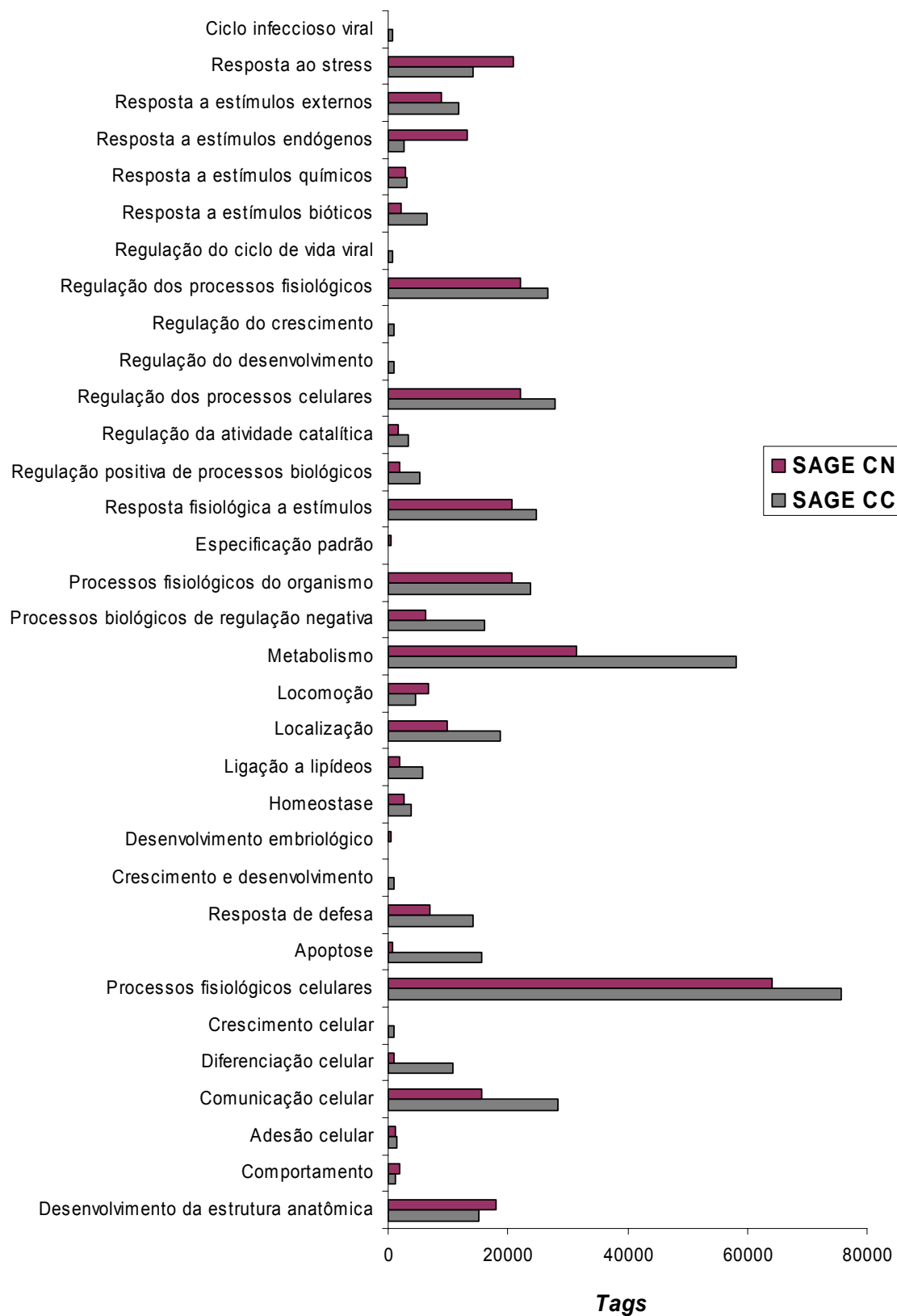
## **9. Perfil funcional dos transcritos**

Os transcritos diferencialmente expressos identificados em células epiteliais normais e neoplásicas do cólon pelo método SAGE foram distribuídos em 33 categorias funcionais de processos biológicos, no segundo nível de especificidade da plataforma utilizada (Figura 20 e Tabela 11).

Os maiores números de transcritos pertenceram às categorias funcionais de metabolismo e processos fisiológicos celulares. Já os menores números de transcritos pertenceram às categorias funcionais de desenvolvimento embriológico e padrão de especificação.

As maiores diferenças de expressões gênicas avaliadas em células epiteliais neoplásicas comparadas às células epiteliais normais do cólon foram identificadas nas categorias funcionais de crescimento e desenvolvimento e regulação do desenvolvimento.

**Categorias funcionais**



**Figura 20:** Representação esquemática da distribuição de transcritos identificados em células epiteliais neoplásicas do cólon de um paciente com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado e de células epiteliais normais do cólon de um paciente com megacólon chagásico, de acordo com as categorias funcionais de processos biológicos a eles relacionados. Estes foram classificados considerando o segundo nível de especificidade da plataforma *Gene Ontology Consortium* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org))

**Tabela 11:** Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos identificados em células epiteliais neoplásicas e normais do cólon de acordo com as categorias funcionais de processos biológicos

<b>Categoria funcional</b>	<b>SAGE CC *</b>	<b>SAGE CN *</b>	<b>Total de tags *</b>	<b>Diferença de expressão</b>
Crescimento e desenvolvimento	1071	0	1071	1071
Regulação do desenvolvimento	1071	0	1071	1071
Crescimento celular	841,5	0	841,5	841
Regulação do crescimento	841,5	0	841,5	841
Apoptose	15529	837,2	16367	18,5
Regulação do ciclo de vida viral	612	33,49	645,5	18,3
Ciclo infeccioso viral	612	33,49	645,5	18,3
Diferenciação celular	10901	870,7	11772	12,5
Resposta a estímulos bióticos	6464	2076	8541	3,11
Ligação a lipídeos	5814	1875	7689	3,1
Processos biológicos de regulação negativa	16103	6129	22232	2,63
Regulação positiva de processos biológicos	5202	2009	7211	2,59
Regulação da atividade catalítica	3366	1574	4940	2,14
Resposta de defesa	14114	6865	20980	2,06
Localização	18857	9745	28603	1,93
Metabolismo	58063	31413	89476	1,85
Comunicação celular	28458	15707	44164	1,81
Homeostase	3787	2612	6399	1,45
Resposta a estímulos externos	11666	8774	20440	1,33
Regulação dos processos celulares	27961	22036	49997	1,27
Regulação dos processos fisiológicos	26775	22036	48811	1,22
Resposta fisiológica a estímulos	24862	20563	45425	1,21
Processos fisiológicos celulares	75773	64200	1E+05	1,18
Resposta a estímulos químicos	3213	2780	5993	1,16
Processos fisiológicos do organismo	23753	20663	44416	1,15
Adesão celular	1415	1306	2721	1,08
Desenvolvimento da estrutura anatômica	15147	18051	33198	-1,19
Locomoção	4590	6731	11321	-1,47
Resposta ao stress	14229	20998	35227	-1,48
Comportamento	1186	1909	3095	-1,61
Resposta a estímulos endógenos	2754	13262	16016	-4,82
Desenvolvimento embriológico	0	468,9	468,9	-469
Padrão de especificação	0	468,9	468,9	-469

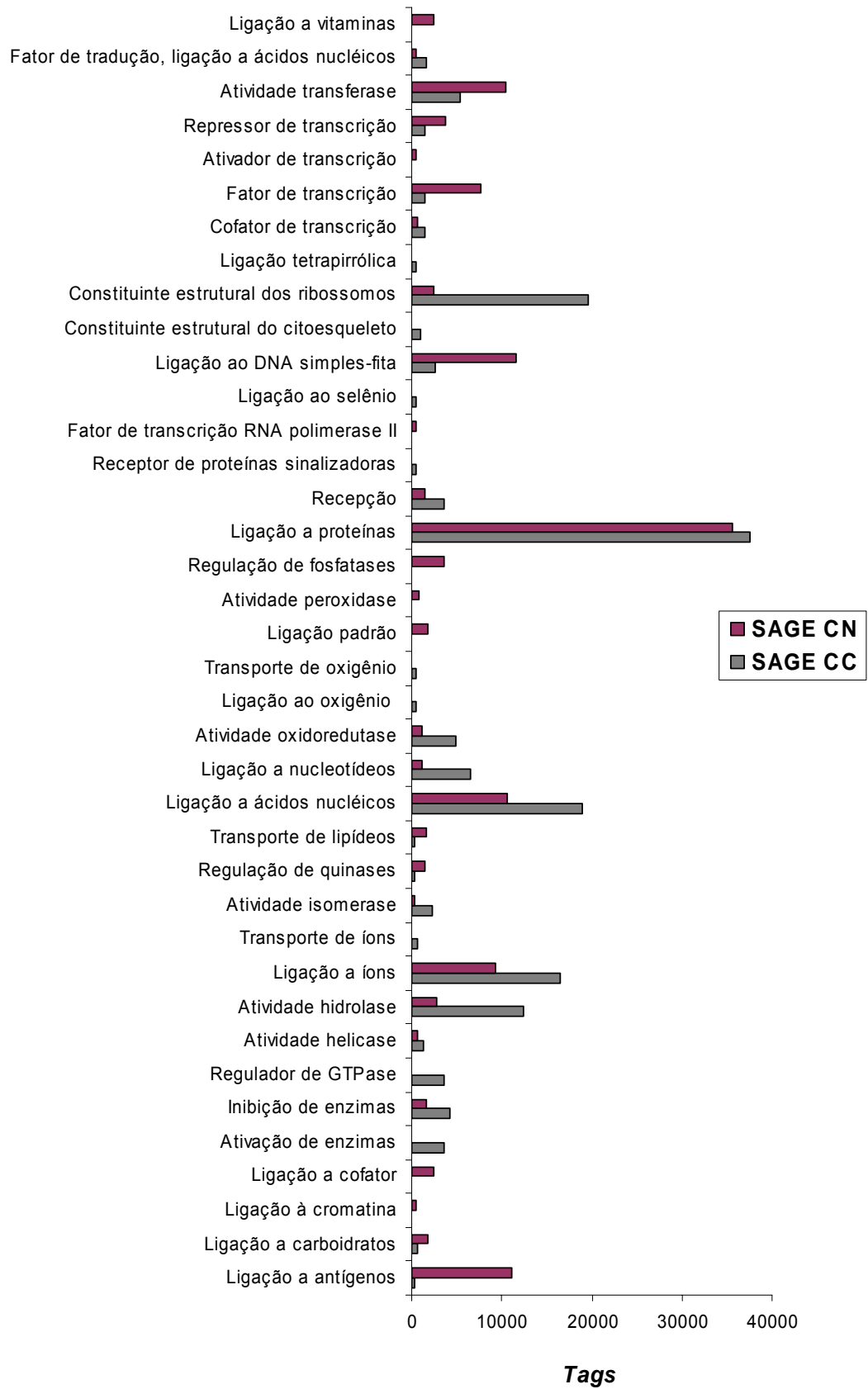
\*: Valores expressos em tags por milhão

Os transcritos diferencialmente expressos identificados em células epiteliais normais e neoplásicas do cólon pelo método SAGE foram distribuídos em 38 categorias funcionais de funções moleculares, no segundo nível de especificidade da plataforma utilizada (Figura 21 e Tabela 12).

Os maiores números de transcritos pertenceram às categorias funcionais de ligação a proteínas e ligação a ácidos nucléicos. Já os menores números de transcritos pertenceram às categorias funcionais de ligação e transporte de oxigênio, ligação ao selênio e ligação tetrapirrólica.

As maiores diferenças de expressões gênicas avaliadas em células epiteliais neoplásicas comparadas às células epiteliais normais do cólon foram identificadas nas categorias funcionais de ativação de enzimas, regulação da GTPase e atividade peroxidase.

**Categorias funcionais**



**Figura 21:** Representação esquemática da distribuição de transcritos identificados em células epiteliais neoplásicas do cólon de um paciente com adenocarcinoma de cólon esporádico moderadamente diferenciado e de células epiteliais normais do cólon de um paciente com megacólon chagásico, de acordo com as categorias funcionais de funções moleculares a eles relacionados. Estes foram classificados considerando o segundo nível de especificidade da plataforma *Gene Ontology Consortium* ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org))

**Tabela 12:** Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos identificados em células epiteliais neoplásicas e normais do cólon de acordo com as categorias funcionais de funções moleculares

<b>Categoria funcional</b>	<b>SAGE CC</b>	<b>SAGE CN</b>	<b>Total de tags</b>	<b>Diferença de expressão</b>
Ativação de enzimas	3519	0	3519	3519
Regulador de GTPase	3519	0	3519	3519
Receptor de proteínas sinalizadoras	497,2	0	497,2	497
Ligação ao oxigênio	459	0	459	459
Transporte de oxigênio	459	0	459	459
Ligação ao selênio	459	0	459	459
Ligação tetrapirrólica	459	0	459	459
Transporte de íons	612	66,98	679	9,14
Atividade isomerase	2333	267,9	2601	8,71
Constituinte estrutural dos ribossomos	19660	2512	22172	7,83
Constituinte estrutural do citoesqueleto	918	134	1052	6,85
Ligação a nucleotídeos	6502	1172	7675	5,55
Atividade oxidoreductase	4972	1105	6078	4,5
Atividade hidrolase	12355	2847	15201	4,34
Fator de tradução, ligação a ácidos nucleicos	1683	502,3	2185	3,35
Inibição de enzimas	4284	1708	5992	2,51
Recepção	3595	1440	5036	2,5
Cofator de transcrição	1415	636,3	2052	2,22
Atividade helicase	1262	636,3	1899	1,98
Ligação a ácidos nucleicos	18895	10583	29478	1,79
Ligação a íons	16409	9310	25719	1,76
Ligação a proteínas	37561	35532	73094	1,06
Atividade transferase	5317	10482	15799	-2
Repressor de transcrição	1415	3818	5233	-2,7
Ligação a carboidratos	650,2	1875	2526	-2,9
Ligação ao DNA simples-fita	2639	11520	14160	-4,4
Regulação de quinases	306	1474	1780	-4,8
Fator de transcrição	1453	7669	9123	-5,3
Transporte de lipídeos	306	1674	1980	-5,5
Fator de transcrição RNA polimerase II	153	1875	2028	-12
Ativador de transcrição	38,25	468,9	507,1	-12
Ligação à cromatina	38,25	468,9	507,1	-12
Ligação a cofator	153	2411	2564	-16
Ligação a vitaminas	153	2411	2564	-16
Ligação a antígenos	267,7	11119	11386	-42
Regulação de fosfatases	38,25	3650	3689	-95
Ligação padrão	0	468,9	468,9	-469
Atividade peroxidase	0	736,8	736,8	-737

\*: Valores expressos em tags por milhão



A distribuição dos 171 transcritos (*tags*) diferencialmente expressos em células epiteliais neoplásicas do cólon de um paciente com ACE moderadamente diferenciado quando comparadas a células epiteliais normais do cólon de pacientes com megacólon chagásico, classificados de acordo com as categorias funcionais de processos biológicos e funções moleculares a eles relacionados, está apresentada nos Apêndices 4 e 5.

As mais relevantes funções, possivelmente envolvidas no desenvolvimento e progressão da carcinogênese do cólon, observadas entre os transcritos diferencialmente expressos foram as relacionadas à proliferação, à migração e à diferenciação celular, à regulação da apoptose e à resposta ao stress e a estímulos químicos, sendo que algumas delas pertenceram a transcritos exclusivos de uma das duas bibliotecas.

## **DISCUSSÃO**

---



O CC é uma das neoplasias malignas mais estudadas nas últimas décadas, devido à sua ocorrência e à alta mortalidade a ela atribuída. Sendo assim, seu comportamento biológico está entre os melhor estabelecidos dentre as neoplasias malignas (PINHO & ROSSI, 1999; VETTORE & CABALLERO, 2004). Anormalidades em oncogenes ou genes supressores tumorais, a instabilidade de microsátélites e a desregulação de sinais das vias de transdução parecem estar definitivamente associadas à doença (FEARON et al., 1987; FINLEY et al., 1989; VOGELSTEIN et al., 1989; MELHAM et al., 1992; SIDRANSKY et al., 1992; IONOV et al., 1993; GUILLEM et al., 1995). Ainda, mutações de alta penetrância foram descritas em pacientes com CC familiar (BURT et al., 1990; BURT & GRODEN, 1993; PELTOMAK et al., 1993; BURT, 1995; PINHO & ROSSI, 1999; HOULSTON & TOMLINSON, 2001; VETTORE & CABALLERO, 2004) e mutações em oncogenes e genes supressores tumorais, e polimorfismos de baixa penetrância podem alterar o risco para a doença em ambos os cânceres, esporádico e familiar (PINHO & ROSSI, 1999; HOULSTON & TOMLINSON, 2001; VETTORE & CABALLERO, 2004).

Entretanto, vários de seus aspectos, como a etiologia e a fisiopatologia, ainda estão por ser determinados com exatidão, o que justifica a realização de estudos que possam identificar fatores prognósticos ou potenciais alvos para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

O método de microarranjos tem sido utilizado na identificação de padrões de expressão gênica que pudessem estar relacionados ao CC. Vários estudos puderam, com a utilização do método, identificar perfis gênicos diferenciados entre células normais e neoplásicas do cólon (SOETH et al., 2001; CONACCISORRELL et al., 2002; CEN et al., 2004; KOMATSU et al., 2006) e entre células do CC localizado ou metastático e normais do cólon (ZIMMER & THOMAS, 2002; DE LOTT et al., 2005; KUMARAKULASINGHAM et al., 2005; WATSON et al., 2006; JUBB et al., 2006; VAN GEELLEN et al., 2006; KLEIVI et al., 2007; BLUMENTHAL et al., 2007). Foi também possível, com a utilização deste método, identificar padrões de expressão gênica que, aparentemente, constituem marcadores prognósticos para pacientes com CC. Assim, foi descrito que a

expressão aumentada do gene que codifica o CEA protegeu uma linhagem de células tumorais contra estímulos apoptóticos e a ação de quimioterápicos como o 5-FU, sugerindo que sua inibição pode ser uma nova estratégia terapêutica a ser considerada em pacientes com CC (SOETH et al., 2001).

Porém, apesar do método de microarranjos possibilitar a avaliação de um grande número de diferentes genes ou tecidos em um único estudo e ter contribuído imensamente com a identificação de anormalidades gênicas na doença, para a sua utilização é necessário o conhecimento prévio dos genes a serem avaliados, o que impossibilita a avaliação de genes ainda não descritos ou não relacionados.

Recentemente, o método SAGE foi descrito como mais eficaz, em relação aos microarranjos, para rastrear anormalidades na expressão gênica, visto que a técnica possibilita a identificação e quantificação da expressão total de genes de um determinado tipo celular normal (LEE et al., 2001; ZHOU et al., 2001) ou neoplásico (VAN DEN BERG et al., 1999; PARLE-McDERMOTT et al., 2000; KROP et al., 2001), sem que haja um conhecimento prévio destes genes, incluindo genes não descritos ou não associados anteriormente ao tecido estudado (BOON et al., 2000; PARLE-McDERMOTT et al., 2000).

Com a utilização do método SAGE ou de resultados obtidos por ele foi possível a identificação de perfis de expressão gênica de linhagens celulares e tecidos do CC humano e do cólon normal, bem como de células epiteliais intestinais normais, neoplásicas e metastáticas para o fígado (POLYAK et al., 1997; HE et al., 1999; PARLE-McDERMOTT et al., 2000; ST. CROIX et al., 2000; BUCKHAULTS et al., 2001; SAHA et al., 2001; ZHOU et al., 2002; BUCKHAULTS et al., 2003; YOUSEF et al., 2004; HUANG et al., 2006).

Levando-se em conta que, em nosso conhecimento, ainda não foi descrita a expressão do total de genes de células epiteliais do ACE moderadamente diferenciado ou de genes não previamente identificados ou relacionados à doença com a utilização da técnica SAGE, consideramos a realização deste estudo uma contribuição pertinente nesta área do conhecimento.

Dos seis pacientes incluídos em nosso estudo, três apresentaram tumor de localização proximal e três de localização distal. Cinco pacientes apresentaram ACE moderadamente diferenciado do estágio III e apenas um, ACE moderadamente diferenciado do estágio II. Vale comentar que, para a homogeneização da amostra estudada, foram incluídos no estudo apenas pacientes com grau de diferenciação moderado.

Foram utilizadas no estudo apenas amostras purificadas de células epiteliais intestinais, de pacientes e controles, com grau de pureza superior a 90%, visando garantir que as expressões gênicas obtidas fossem predominantemente de células epiteliais, normais ou neoplásicas, do cólon e não de outro tipo celular.

As expressões identificadas pelo método SAGE foram confirmadas pela qPCR em oito (*CEACAM6*, *KLK6*, *LYZ*, *PFN1*, *S100A8*, *S100A9*, *VIL2* e *ZFHX1B*) dos dez genes selecionados para a validação do método. Este resultado, 80% de concordância, esteve de acordo com os obtidos em estudos prévios (65 a 100% de concordância) (VAN DEN BERG et al., 1999; PARLE-McDERMOTT et al., 2000; KROP et al., 2001; LEE et al., 2001; SAHA et al., 2001; ZHOU et al., 2001). Apenas as expressões dos genes *PLA1A* e *ZNF277* não foram validadas em nosso estudo.

Foram obtidas 44.004 e 43.570 *tags* totais das bibliotecas SAGE CC e SAGE CN, sendo que cerca de 35% delas foram *tags* únicas. Estes números foram considerados adequados para a estimativa atual de 30.000 a 40.000 genes preditos no genoma humano (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001).

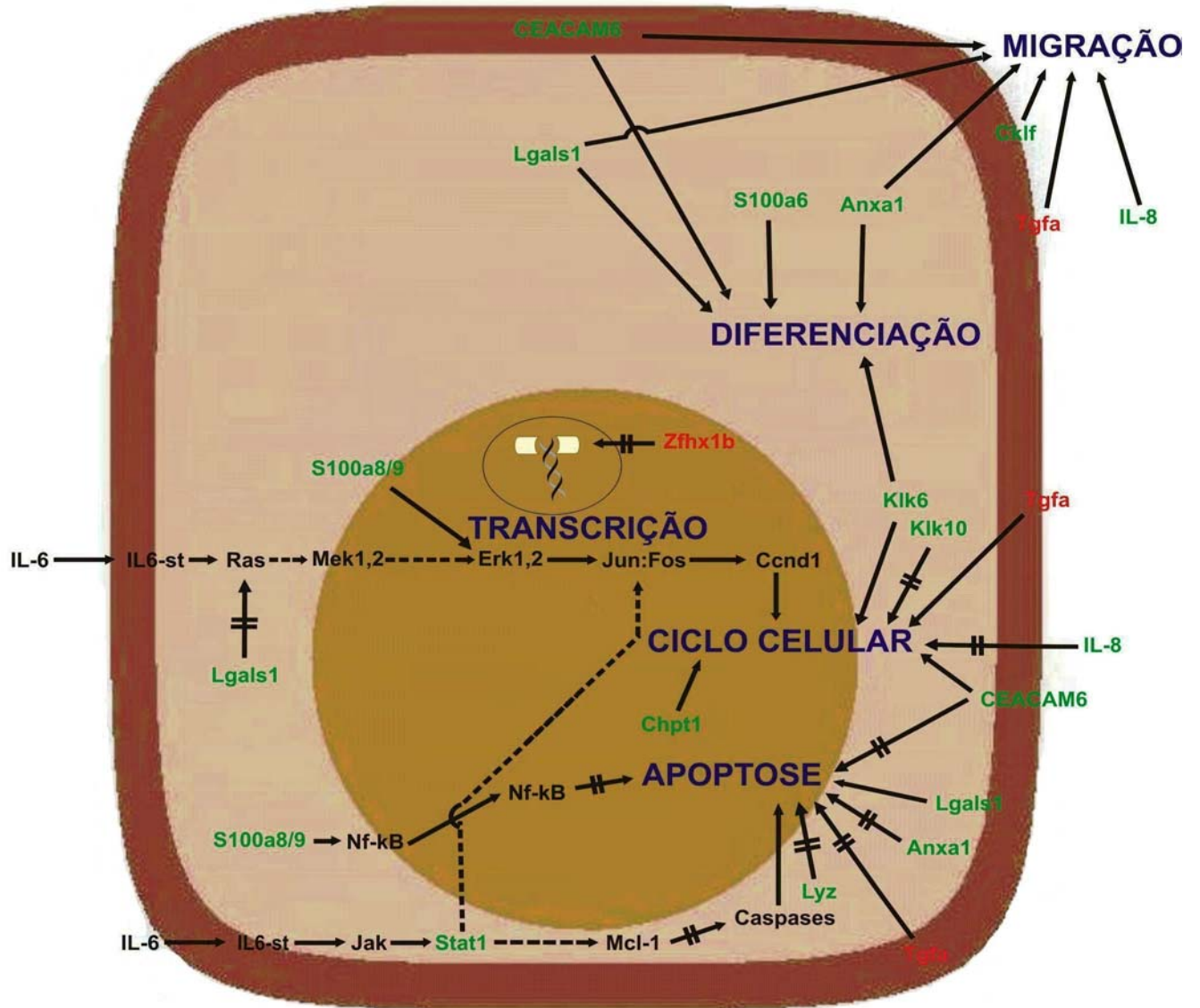
A comparação entre as bibliotecas possibilitou a identificação de 171 transcritos diferencialmente expressos. Dentre eles, cerca de 50% estavam hiperexpressos e os outros 50% hipoexpressos nas células epiteliais neoplásicas do ACE moderadamente diferenciado.

Os genes diferencialmente expressos em células epiteliais neoplásicas do cólon foram distribuídos em categorias funcionais distintas. Assim, observamos a hiperexpressão de genes relacionados com a proliferação celular (*CEACAM6*, *CHPT1*, *KLK6*, *LGALS1*), a apoptose (*ANXA1*, *CEACAM6*, *LGALS1*, *LYZ*, *STAT1*), a migração (*ANXA1*, *CEACAM6*, *CKLF*, *LGALS1*), a diferenciação celular (*ANXA1*,

*CEACAM6, KLK6, LGALS1, S100A6*), a comunicação celular (*ANXA1, CEACAM6, KLK6, LGALS1, S100A6, S100A9, STAT1*) e o potencial metastático (*CEACAM6, KLK6*) em células epiteliais neoplásicas do cólon. Ainda, foi observada a hipoexpressão de genes relacionados à resposta ao stress (*CAT*), à apoptose (*EIF3S2, TGFA, ZFH1B*), ao potencial metastático (*TGFA, CAT*), e a processos de transcrição.

As interações conhecidas ou presumidas entre proteínas produzidas pelos principais genes com expressões anômalas em células epiteliais do ACE moderadamente diferenciado identificadas no estudo com outras proteínas de vias de sinalização intra e extracelular estão apresentadas na Figura 22.

## MATRIZ EXTRACELULAR





**Figura 22:** Representação esquemática das interações conhecidas ou presumidas entre proteínas possivelmente produzidas pelos principais genes com expressões anômalas em células epiteliais do adenocarcinoma de cólon esporádico (ACE) com outras proteínas de vias de sinalização celular. A produção de interleucina-6 (IL-6) ativa proteínas da via de sinalização JAK/STAT, que regulam a proliferação celular e a apoptose. O excesso da proteína Stat1, desta via de sinalização, impede a apoptose das células epiteliais do ACE. Hiperexpressões das proteínas S100a8, S100a9 e Stat1, por ativação das proteínas Erk1 e 2, Jun:fos e Ccnd1, da via de sinalização ERK/MAPK, induzem a proliferação exacerbada de células epiteliais do ACE por facilitar a entrada das células no ciclo celular. Ainda, as proteínas S100a8 e S100a9, em excesso, permitem a transferência da proteína Nf-kB do citoplasma para o núcleo e a ativação de seus genes alvo, desencadeando sua ação anti-apoptótica nuclear. As proteínas hiperexpressas CEACAM6, Lyz e Anxa1 e a proteína hipoexpressa Tgfa também atuam como inibidoras da apoptose. Já a proteína hiperexpressa Lgals1 estimula a apoptose. A proliferação celular é estimulada pela hiperexpressão das proteínas Chpt1, Klk6 e CEACAM6 e pela proteína hipoexpressa Tgfa; já a diferenciação celular, é estimulada pelo excesso das proteínas S100a6, Klk6, Anxa1, S100a6, Lgals1 e CEACAM6. Por outro lado, as proteínas hiperexpressas interleucina 8 (IL-8), Lgals1 e Klk10 inibem a proliferação celular. Já as proteínas hiperexpressas Anxa1, Cklf, Lgals1, IL-8 e CEACAM6 e a proteína hipoexpressa Tgfa promovem a migração das células. Estes resultados, em seu conjunto, contribuem para a compreensão da fisiopatologia do ACE, bem como para a identificação de novos alvos terapêuticos para a doença. (—>) representa a ativação de vias de sinalização celular por ações conhecidas ou presumidas de proteínas; (- - ->) representa a ativação de vias de sinalização celular por outras proteínas; (≠>)

representa o bloqueio de vias de sinalização celular por proteínas; proteínas hiperexpressas estão representadas por letras verdes; proteínas hipoexpressas estão representadas por letras vermelhas; letras pretas representam outras proteínas com possível expressão normal nas vias de sinalização celular de células epiteliais do ACE

Dentre os genes hiperexpressos selecionados para validação através da comparação com os resultados obtidos pela qPCR, todos tiveram resultados concordantes com o obtido pelo SAGE.

O gene *CEACAM6* codifica uma molécula de adesão celular, da superfamília das imunoglobulinas, que desempenha, ainda, funções na comunicação, regulação da diferenciação, invasão e potencial metastático (BENCHIMOL et al., 1989; OIKAWA et al., 1989; STANNERS & FUKS, 1998). Em concordância com os nossos resultados, foi descrita a hiperexpressão deste gene na superfície das células de vários cânceres humanos, inclusive o CC, o que pode inibir a apoptose (ORDOÑEZ et al., 2000) e a diferenciação, bloquear a polarização celular e modificar a arquitetura normal do tecido (ORDOÑEZ et al., 2000; ILANTZIS et al., 2002). Ainda em relação ao *CEACAM6*, Jantscheff et al. (2003) observaram o aumento de sua expressão em pacientes com CC, utilizando a técnica de imunohistoquímica, sendo este aumento associado a um prognóstico desfavorável para os pacientes, com a diminuição das sobrevidas global e livre de doença. Foi identificado também, por citometria de fluxo, o aumento da sua expressão em linhagens celulares de tumores sólidos de mama, cólon, pâncreas e pulmão, sendo que a inibição do potencial metastático destas células, após exposição ao anticorpo anti-*CEACAM6*, deu suporte à premissa de que a proteína atua na propagação da doença (BLUMENTHAL et al., 2005; BLUMENTHAL et al., 2007).

Outro gene, o *KLK6*, está envolvido funcionalmente com comunicação e diferenciação celular, processos fisiológicos, crescimento, metabolismo, resposta a estímulos, regulação do desenvolvimento, resposta ao stress, atividade hidrolase e ligação a proteínas. Em nosso estudo, também foi observada a hiperexpressão do gene *KLK10*, outro membro da família das kaliceínas que tem funções semelhantes às do *KLK6*. Em concordância com os resultados observados em nosso estudo, Yousef et al. (2004) fizeram uma análise *in-silico* da expressão dos genes da kaliceína em tecidos e linhagens celulares, normais e tumorais, do cólon e encontraram os genes *KLK6* e *KLK10* com expressão aumentada. Em outro estudo, Ogawa et al. (2005) observaram, utilizando os

métodos qPCR e imunohistoquímica, a hiperexpressão do gene *KLK6* em CC e uma correlação direta entre os níveis de expressão do gene e a invasão da serosa, a presença de metástases hepáticas, o estágio avançado da doença e prognóstico desfavorável. Ainda, foi descrita, com a utilização de microarranjos e imunohistoquímica, a hiperexpressão do *KLK6* em células epiteliais de tumores de pele, o que afetou a proliferação, a adesão, a migração e a invasão, todos processos criticamente implicados no desenvolvimento do câncer (KLUCKY et al., 2007). Mais recentemente, Rückert et al. (2008), utilizando técnicas de bioinformática, imunohistoquímica, Elisa, Western Blot e RT-PCR descreveram um aumento na expressão das proteínas Klk6 e Klk10 em tecido de carcinoma do pâncreas, sendo que a co-expressão das duas proteínas parece estar associada à piora no prognóstico da doença e na sobrevida dos pacientes.

O gene *LYZ* codifica uma enzima, a lisozima, que tem atividade bacteriolítica. Esta enzima é expressa em grânulos secretórios de monócitos, macrófagos e leucócitos e em células do trato gastrointestinal, estando envolvida em processos fisiológicos celulares, regulação da apoptose, defesa, metabolismo, resposta a estímulos e atividade hidrolase (FLEMING, 1922; SUGI et al., 1996; VAN DER SLUYS VEER et al., 1998). Buckhaults et al. (2001) analisaram a expressão gênica global em tecido colorretal normal, adenoma colorretal e CC, por meio da técnica SAGE, e identificaram um aumento na expressão do gene *LYZ*, tanto nas bibliotecas dos carcinomas quanto nas dos adenomas, resultado concordante com o obtido no nosso estudo. Foi ainda descrita, após avaliação por qPCR e Northern blot, sua expressão aumentada em células do intestino delgado (WEHKAMP et al., 2006) e também, após análises por microarranjos e RT-PCR, em linhagens celulares de hepatoma (LEE et al., 2007).

A família das proteínas S100 ligantes ao cálcio contém 20 membros identificados que participam de processos celulares como crescimento e motilidade celular, regulação do ciclo celular, transcrição e diferenciação, também em células de outros tipos de tumor, como os de próstata, pele e gástrico (GEBHARDT et al., 2002; CROSS et al., 2005; HERMANI et al., 2006) e também de bexiga (YAO et al., 2007).

Os genes *S100A8* e *S100A9*, membros da família S100 de proteínas ligantes ao cálcio, têm como principais funções: comunicação, defesa, resposta a estímulos fisiológicos, resposta ao stress, regulação da transcrição e da tradução, regulação da adesão celular e indução da apoptose (STRIZ & TREBICHAVSKY, 2004; GEBHARDT et al., 2006). Da mesma forma que em nossos resultados, foi identificada a hiperexpressão das proteínas s100a9 (calgranulina B) e s100a8 (calgranulina A), ou do heterocomplexo s100a9/ s100a8 (calprotectina), pelas técnicas de eletroforese bidimensional, análise imunohistológica e espectrometria de massa, em CC, sendo que o aumento da concentração destas proteínas no local da lesão pareceu determinar a indução da apoptose e regressão do tumor (STULÍK et al., 1999). Outro estudo mais recente revelou, através das técnicas de microarranjos, qPCR e RT-PCR, os genes *S100A8* e *S100A9* como marcadores do potencial metastático de células epiteliais da mama (MOON et al., 2008). Em nosso estudo, observamos ainda a hiperexpressão de outro gene da mesma família, o *S100A6*, que também é descrito como hiperexpresso em CC, carcinoma de ovário e de mama (CROSS et al., 2005).

Dentre os demais genes hiperexpressos, o *CKLF* codifica uma quimiocina e tem funções relacionadas à proliferação e diferenciação de células de músculo esquelético em murinos (HAN et al., 2001) e de células progenitoras da medula em humanos (KE et al., 2002). Em nosso conhecimento, não há descrições do gene relacionadas à neoplasia do cólon.

Já o gene *LGALS1* foi descrito como tendo expressão aumentada, avaliada por imunohistoquímica e RT-PCR, em células do cólon, tendo sido associado a funções relacionadas à adesão, regulação do crescimento e apoptose, parecendo ser um elemento importante na malignização do tecido, já que modula as interações célula-célula e célula-matriz e aumenta ou diminui a adesão celular, dependendo do contato fisiológico em questão (HITTELET et al., 2003). Foram atribuídas a ele funções como promover a adesão (MOISEEVA et al., 2003), migração (MOISEEVA et al., 1999), diferenciação (SASAKI et al., 2004), processamento do pré-mRNA (VYAKARNAM et al., 1997), transformação neoplásica (PAZ et al., 2001) e indução da apoptose em várias células (PERILLO

et al., 1997; ELLERHORST et al., 1999; WELLS et al., 1999; NGUYEN et al., 2001). Em outro trabalho, foram identificadas altas concentrações da proteína Lgals1 em células de Leydig, o que resultou na diminuição da viabilidade das células, por indução da apoptose (BIRON et al., 2006). Em um estudo mais recente, Thijssen et al. (2008) identificaram, por qPCR, Western Blot, citometria de fluxo e imunohistoquímica, em culturas de células e tecido humano, um aumento na expressão da Lgals1 em células endoteliais de tecidos tumorais quando comparadas às células endoteliais de tecido normal, o que sugere uma função importante da proteína na angiogênese tumoral.

O gene *STAT1* codifica um fator de transcrição com papel importante na proliferação celular, sobrevivência, indução da apoptose e diferenciação, sendo essencial para a sinalização do  $\gamma$ -interferon ( $IFN\gamma$ ), que pode ter papel crítico no crescimento e na morte celular (KIM et al., 2007). Stempelj et al. (2007) descreveram o papel fundamental da via sinalizadora JAK/STAT1 na produção de óxido nítrico (NO) e na expressão da NO sintase indutível (iNOS), enzima envolvida na síntese do NO, em células epiteliais intestinais tratadas com fator de necrose tumoral (TNF) e  $IFN\gamma$ . O NO é um radical livre altamente reativo, que modula a tumorigênese através de sua habilidade em regular a proliferação e morte celular, a migração e a angiogênese.

Outro gene identificado, o *ANXA1*, é um membro da família das anexinas, proteínas ligantes ao  $Ca^{2+}$  e aos fosfolípídeos. Sua proteína correspondente está associada à redução do extravasamento celular na resposta inflamatória, e tem funções relacionadas à migração e adesão celular (HAYHOE et al., 2006). É também descrita como um mediador célula-célula dos efeitos de glicocorticóides sobre a secreção da corticotrofina (ACTH) sendo, portanto, considerada um regulador da função neuroendócrina (JOHN et al., 2007). Já o gene *CHPT1* esteve hiperexpresso em células tumorais de mama e tem função catalisadora da reação de biossíntese do fosfolípídeo de membrana PC, um marcador de células com altas taxas de proliferação (AKECH et al., 2005).

Observamos, ainda, expressões diferenciadas de genes como o do fator de crescimento *TGFBI*, com funções de ligação a proteínas, regulação negativa da

adesão celular, proliferação e crescimento. Expressão aumentada desse gene em CC foi também descrita em estudos anteriores, confirmando nossos achados (BUCKHAULTS et al., 2001; HUANG et al., 2006).

Verificamos, ainda, aumento na expressão do gene *IL8*, uma citoquimiocina relacionada ao controle da angiogênese, à motilidade e proliferação celular e à regulação da adesão. Landi et al. (2003) descreveram a associação entre um polimorfismo no gene *IL8* e a diminuição do risco do CC. Mais recentemente, em concordância com o resultado obtido em nosso estudo, Cacev et al. (2008) identificaram, através de imunohistoquímica, a hiperexpressão deste gene, sendo que a marcação imunohistoquímica IL-8 positiva foi mais freqüente em tumores pouco e moderadamente diferenciados em comparação com os bem diferenciados, e, também, sua influência sobre a migração e invasão celular *in vitro* em linhagens celulares HT-29 de adenocarcinoma do cólon humano comparadas com as mucosas normais correspondentes, sugerindo a importância da IL-8 no desenvolvimento e progressão do adenocarcinoma do cólon.

Dentre os genes hipoexpressos escolhidos para a validação, o gene *ZFHX1B* teve resultados semelhantes entre o SAGE e a qPCR.

O gene *ZFHX1B* está envolvido no metabolismo, na regulação de processos celulares e fisiológicos, nas ligações a íons e ácidos nucleicos e na transcrição. O gene codifica um proteína do tipo fator de transcrição com domínio dedos de zinco, envolvida na via de sinalização do fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (VERSCHUEREN et al., 1999; POSTIGO et al., 2003). Em estudo, o gene foi descrito como tendo expressão aumentada em linhagens celulares de câncer de mama humano (Lombaerts et al., 2006) ao contrário de nossos resultados, que indicaram uma diminuição na expressão do gene em células epiteliais neoplásicas do cólon. Assim, é possível que diferentes tumores possam apresentar diferentes níveis de expressão de um mesmo gene. Em outro estudo, utilizando as técnicas de *immunoblotting* e RT-PCR, foi descrita a participação do gene na senescência de células hepáticas carcinomatosas e sugerido que ele tem a função de gene supressor tumoral na doença (Ozturk et al., 2006). Outro gene identificado foi o *EIF3S2*, que codifica uma proteína que

interage com o receptor tipo II do TGF- $\beta$ , agindo como modulador de sua resposta (CHOY & DERYNCK, 1998).

O gene *TGFA*, também identificado em nosso trabalho, é um membro da família EGF (fator de crescimento epidermal) e foi descrito, após avaliação em células de CC, que a proteína codificada por ele tem função apoptótica (JANES, 2005). Outro estudo avaliou, em células de CC, o efeito da oxido-redução sobre a ativação da cascata da MAPK, que sinaliza a proliferação celular, e concluiu que a liberação do TGFA para a fosforilação do EGFR (receptor de EGF) é dependente de metaloproteinases (NKABYO et al., 2005). Mais recentemente, Pochampalli et al. (2007) avaliaram a progressão do câncer de mama em camundongos transgênicos identificando o TGFA como um potente indutor de transformação e progressão metastática, sendo que a expressão de Mucl aumentou dramaticamente a transformação dependente de TGFA.

Finalmente, dentre os genes hipoexpressos, a função que mais nos chamou a atenção foi a de antioxidantes, relacionada ao gene *catalase* (*CAT*) que, surpreendentemente, foi exclusivo da biblioteca SAGE CN. Este gene está relacionado à resposta ao stress oxidativo, um dos fatores ambientais melhor conhecidos como envolvidos no aumento das chances de ocorrência do CC. Esta observação pode ser útil para a melhor compreensão da importância de genes codificadores de enzimas que atuam na proteção do organismo contra a ocorrência do câncer sendo que, nos casos em que estes genes tenham expressões diminuídas, deve-se tentar uma prevenção mais cuidadosa, principalmente evitando a exposição a carcinógenos ambientais. A enzima catalase, codificada por este gene, é responsável pelo catabolismo do peróxido de hidrogênio, reconhecidamente um importante agente oxidante cuja ação pode contribuir para o desenvolvimento da neoplasia. Foi descrita, ainda, uma ação inibidora de metástases hepáticas do CC pela catalase em camundongos (NISHIKAWA et al., 2004).

Já os genes *PLA1A* e *ZNF277*, hipoexpressos quando avaliados pelo SAGE, tiveram nível de expressão gênica normal, quando medido pela qPCR em nosso estudo e não foram, portanto, considerados validados.



O gene *PLA1A*, codifica uma enzima com função de hidrólise de ácidos graxos, além de estar envolvida em processos fisiológicos e metabolismo. Esta proteína foi descrita como presente em tecidos gastrointestinais (ALOULOU et al., 2006), porém não há, em nosso conhecimento, nenhum outro estudo de expressão da mesma em tecido de cólon normal ou neoplásico. Em nosso conhecimento, os níveis de expressão do gene *ZNF277* no tecido colônico não foram ainda descritos.

Dentre as funções observadas entre os genes diferencialmente expressos pelo SAGE no estudo, algumas têm, sabidamente, claras relações com a evolução ou inibição da tumorigênese.

As principais funções, identificadas em nosso estudo como envolvidas com a progressão da carcinogênese foram a proliferação, o crescimento, a migração e a diferenciação celular, e a regulação da apoptose e da angiogênese. Estas funções atuam diretamente na capacidade das células tumorais se reproduzirem e se difundirem de forma a garantir a constante evolução do tumor e uma possível invasão metastática de outros tecidos. A partir da descoberta dos genes envolvidos com tais funções na doença, será possível desenvolver tratamentos com o objetivo de inibir ou anular a capacidade das células neoplásicas de se estabelecerem ou se difundirem pelo organismo.

As expressões dos genes de interesse foram ainda quantificadas pela qPCR, em um grupo de amostras de células epiteliais intestinais purificadas de cinco pacientes com ACE moderadamente diferenciado, para verificarmos a reprodutibilidade dos resultados obtidos por SAGE na doença.

Na maior parte dos casos, observamos que as expressões gênicas nos pacientes com ACE, quando quantificadas pela qPCR, foram concordantes com os resultados obtidos pelo SAGE em nosso estudo, sugerindo que o método é adequado para a identificação da expressão gênica na doença.

De maneira geral, identificamos expressão anormal de alguns genes anteriormente relacionados ao CC (*CEACAM6*, *KLK6*, *KLK10*, *LYZ*, *S100A6*, *S100A8*, *S100A9*, *S100A11*, *ZFHX1B*, *TGFBI* e *CAT*) e de genes ainda não relacionados (*PLA1A*, *ZNF277*, e *IL8*), porém envolvidos em vias fundamentais

para a carcinogênese, como a inibição e estimulação da apoptose, a proliferação e diferenciação das células epiteliais neoplásicas e a resposta ao *stress* oxidativo (Figura 22), os quais podem contribuir para a compreensão e identificação de novas terapêuticas para pacientes com a doença. A realização de estudos adicionais pode resultar na identificação de fatores prognósticos, maior precisão na escolha da melhor opção terapêutica com conseqüente aumento de sua eficácia e, finalmente, servir como parâmetro para eventuais modificações em tratamentos que porventura se mostrem ineficazes para alguns pacientes.

Nossos resultados podem, ainda, contribuir para o desenvolvimento de novas terapêuticas com anticorpos monoclonais (ACm).

Considerando-se a necessidade de novos regimes terapêuticos para o tratamento do CC, foram desenvolvidos recentemente os ACm, cujo objetivo é neutralizar a ação de células-alvo, direta ou indiretamente envolvidas no processo da carcinogênese.

Um dos ACm melhor estabelecidos até o momento é o cetuximabe, um inibidor quimérico do receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), indicado no tratamento de pacientes com o CC metastático em associação com o quimioterápico irinotecan, ou isoladamente, em pacientes com intolerância ao irinotecan (WONG, 2005). Outros estudos foram desenvolvidos com o objetivo de testar a eficácia do cetuximabe no tratamento de pacientes com CC, confirmando sua eficiência, associado ou não a outros medicamentos (ALTUNDAG et al., 2005; VALLBÖHMER et al., 2005; VAN CUTSEM, 2006; ROSELL et al., 2006; GUNDGAARD et al., 2008; MAHTANI & MAC DONALD, 2008; NG & ZHU, 2008; PICKERING ET al., 2008).

Outro ACm já bem estabelecido é o bevacizumabe, que tem como alvo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e que é, portanto, um inibidor da angiogênese, fundamental para o desenvolvimento e proliferação de tumores sólidos (SHIH & LINDLEY, 2006). É comumente utilizado sozinho, porém estudos sugerem que a combinação do bevacizumabe com quimioterápicos ou outros agentes terapêuticos pode aumentar a eficácia do tratamento e diminuir sua toxicidade (SHIH & LINDLEY, 2006; MORABITO et al., 2006; MIZOBE et al.,

2008). Ainda, foi avaliado o valor prognóstico ou preditor do VEGF, da trombospondina-2 (THBS-2) e da densidade de microvasos (MVD), por hibridização in situ (ISH), imunohistoquímica, microarranjos e contagem de Chalkley, com relação à resposta de pacientes com CC metastático tratados com o bevacizumabe associado à terapia irinotecan, fluorouracil e leucovorin (IFL), sendo que os resultados obtidos sugerem que a adição do bevacizumab à IFL melhora a sobrevida dos pacientes, independentemente dos níveis de VEGF, expressão da THBS-2 ou MVD (JUBB et al., 2006).

Em outro estudo recente, Weihrauch et al. (2008) avaliaram a resposta clínica de um paciente com CC e metástase hepática irressecável. Após tratamento neoadjuvante com cetuximabe, bevacizumabe e XELOX (capecitabina + oxaliplatina) o paciente mostrou remissão completa da lesão metastática e pôde ser operado; o tecido ressecado e os linfonodos se apresentavam, histopatologicamente, livres de tumor residual.

Com o objetivo de identificar novas terapêuticas para o tratamento do câncer, pesquisadores têm, nos últimos anos, buscado novos alvos para a utilização de ACm.

Imakiire et al. (2004) produziram, utilizando camundongos transgênicos que contêm fragmentos de cromossomos humanos, ACm humanos (ACmh), tendo como alvo terapêutico o antígeno carcinoembrionário (CEA), uma proteína expressa na superfície de várias células tumorais, inclusive as do CC. Os autores tiveram como objetivo obter ACmh com especificidade para células tumorais que expressem o CEA e que pudessem ser utilizados como agentes terapêuticos em pacientes com a doença.

Posteriormente, tendo como alvo o CEACAM6, membro da família do antígeno carcinoembrionário (CEA), cuja considerável expressão foi identificada, por citometria de fluxo, em linhagens celulares de tumores sólidos de mama, cólon, pâncreas e pulmão, Blumenthal et al. (2005) identificaram o ACm anti-CEACAM6. Após a exposição das células ao anti-CEACAM6, seu potencial metastático foi significativamente inibido, sugerindo uma possibilidade de

utilização deste ACm no tratamento de pacientes com CC metastático com expressão do CEACAM6.

Mais recentemente, foi descrita a participação de proteínas ligantes, como a fibronectina ou a integrina  $\alpha 5\beta 1$ , no processo de adesão celular dos antígenos CEA e CEACAM6. A descoberta sugere que estas proteínas ligantes poderiam ser novos alvos para o desenvolvimento de ACm que possam inibir os processos celulares mediados pelos antígenos CEA e CEACAM6, como a proliferação de células neoplásicas (ORDOÑEZ et al., 2007).

Estes agentes, que atuam na inibição do crescimento tumoral ou na destruição de células tumorais, têm papel isolado ou intensificando a ação dos agentes anti-neoplásicos como os comumente utilizados no tratamento de pacientes com CC. No entanto, esta terapêutica é diretamente dependente da identificação de marcadores gênicos tumorais irrefutavelmente associados à doença, que possam servir como alvos comprovadamente eficientes para sua ação.

Assim, identificamos a expressão anormal de genes envolvidos com vias metabólicas de proliferação celular, migração, diferenciação e sobrevivência das células epiteliais neoplásicas, além de genes não descritos anteriormente na doença e de possíveis genes desconhecidos. Estes resultados, em seu conjunto, certamente contribuem para o entendimento da fisiopatologia do ACE e, ainda, funcionam como possíveis alvos para o desenvolvimento de terapias específicas para a doença.



## **CONCLUSÕES**

---



- O método SAGE foi eficaz para identificar a expressão gênica total de células epiteliais anormais do ACE moderadamente diferenciado
- O método SAGE foi eficaz para identificar anormalidades da expressão de genes relacionados com a proliferação, diferenciação ou apoptose de células epiteliais do ACE moderadamente diferenciado
- O método SAGE também possibilitou a identificação de anormalidades de expressão de genes não relacionados à doença e de genes não identificados, o que pode, no futuro, contribuir para a melhor compreensão da doença e, possivelmente, para a identificação de novos alvos terapêuticos

Em seu conjunto, esses resultados contribuem para a compreensão da fisiopatologia do ACE moderadamente diferenciado, bem como para o possível desenvolvimento de novas terapias alvo-específicas para a doença.





## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKECH, J.; ROY, S. S.; DAS, S. K. – Modulation of cholinephosphotransferase activity in breast cancer cell lines by Ro5-4864, a peripheral benzodiazepine receptor agonist. **Biochem Biophys Res Comm**, **333**: 35–41, 2005.
- ALOULOU, A.; RODRIGUEZ, J. A.; FERNANDEZ, S.; OOSTERHOUT, D. V.; PUCCINELLI, D.; CARRIÈRE, F. – Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. **Biochim Biophys Acta**, **1761**: 995–1013, 2006.
- ALTUNDAG, K.; SILAY, Y. S.; ALTUNDAG, O.; YIGITBASI, O. G.; GUNDESLIOGLU, O.; GUNDUZ, M. – Selenium supplementation may increase the efficacy of cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. **Med Hypotheses**, **64**(6): 1162–1165, 2005.
- ASHBURNER M.; BALL, C. A.; BLAKE, J. A.; BOTSTEIN, D.; BUTLER, H.; CHERRY, J. M.; DAVIS, A. P.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S. S.; EPPIG, J. T.; HARRIS, M. A.; HILL, D. P.; ISSEL-TARVER, L.; KASARSKIS, A.; LEWIS, S.; MATESE, J. C.; RICHARDSON, J. E.; RINGWALD, M.; RUBIN, G. M.; SHERLOCK, G. – Geneontology: toll for the unification of biology. The gene ontology consortium. **Nat. Genet.**, **25**: 25-29, 2000.
- AUDIC, S. & CLAVERIE, J. M. – The significance of digital gene expression profiles. **Genome Res.**, **7**: 986-995, 1997.
- BARDELLI, A.; SAHA, S.; SAGER, J. A.; ROMANS, K. E.; XIN, B.; MARKOWITZ, S. D.; LENGAUER, C.; VELCULESCU, V. E.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. – PRL-3 expression in metastatic cancers. **Clin Cancer Res**, **9**: 5607-5615, 2003.
- BENCHIMOL, S.; FUKS, A.; JOTHY, S.; BEAUCHEMIN, N.; SHIROTA, K.; STANNERS, C. P. – Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as a intercellular adhesion molecule. **Cell**, **57**: 327-334, 1989.
- BIRON, V. A.; IGLESIAS, M. M.; TRONCOSO, M. F.; BESIO-MORENO; M.; PATRIGNANI, Z. J.; PIGNATARO, O. P.; WOLFENSTEIN-TODEL, C. – Galectin-1: biphasic growth regulation of Leydig tumor cells. **Glycobiology**, **16**(9): 810–821, 2006.
- BLAGOSKLONNY, M. V. – Hsp-90-associated oncoproteins: multiple targets of geldanamycin and its analogs. **Leukemia**, **16**: 455-462, 2002.

- BLUMENTHAL, R. D.; HANSEN, H. J.; GOLDENBERG, D. M. – Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). **Cancer Res**, **65**(19): 8809-17, 2005.
- BLUMENTHAL, R. D.; LEON, E.; HANSEN, H. J.; GOLDENBERG, D. M. – Expression patterns of CEACAM5 and CEACAM6 in primary and metastatic cancers. **BMC Cancer**, **7**: 2-16, 2007.
- BOON, K.; OSÓRIO, E. C.; GREEHUT, S. F.; SCHAEFER, C. F.; SHOEMAKER, J.; POLYAK, K.; MORIN, P. J.; BUETOW, K. H.; STRAUSBERG, R. L.; DE SOUZA, S. J.; RIGGINS, G. J. – An anatomy of normal and malignant gene expression. **PNAS**, **99**: 11287-11292, 2002.
- BRODERS, A. C. – The grading of carcinoma. **Minn. Med.**, **8**: 726-730, 1925.
- BUCKHAULTS, P.; RAGO, C., ST. CROIX, B.; ROMANS, K.; SAHA, S.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. – Secreted and cell surface genes expressed in benign and malignant colorectal tumors. **Cancer Res**, **61**: 6996–7001, 2001.
- BUCKHAULTS, P.; ZHANG, Z.; CHEN, Y. C.; WANG, T. L.; ST. CROIX, B.; SAHA, S.; BARDELLI, A.; MORIN, P. J.; POLYAK, K.; HRUBAN, R. H.; VELCULESCU, V. E.; SHIH, I. M. – Identifying tumor origin using a gene expression-based classification map. **Cancer Res.**, **63**: 4144-4149, 2003.
- BURT, R. W.; BISHOP, D. T.; LYNCH, H. T.; ROZEN, P.; WINAWER, S. J. – Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer. **Bull World Health Organ**, **68**(5): 655-665, 1990.
- BURT, R. W. & GRODEN, J. – The genetic and molecular diagnosis of adenomatous polyposis coli. **Gastroenterology**, **104**: 1211-1214, 1993.
- BURT, R. W. – Inheritance – General Issues. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 51-59.
- CACEV, T.; RADOSEVIĆ, S.; KRIZANAC, S.; KAPITANOVIĆ, S. – Influence of interleukin-8 and interleukin-10 on sporadic colon cancer development and progression. **Carcinogenesis**, **29**(8): 1572-80, 2008.
- CEN, H.; ZHENG, S.; FANG, Y. M.; TANG, X. P.; DONG, Q. – Induction of HSF1 expression is associated with sporadic colorectal cancer. **World J Gastroenterol**, **10**(21): 3122-26, 2004.

- CHIANG, J. M.; CHOU, Y. H. W.; MA, S. C.; CHEN, J. R. – Influence of age on adenomatous polyposis coli and p53 mutation frequency in sporadic colorectal cancer – rarity of co-occurrence of mutations in APC, K-ras, and p53 genes. **Virchows Arch**, **445**: 465-71, 2004.
- CHOY, L. & DERYNCK, R. – The Type II Transforming Growth Factor (TGF)-b Receptor-Interacting Protein TRIP-1 Acts as a Modulator of the TGF-b Response. **J Biol Chem**, **273**(47): 31455–31462, 1998.
- CONACCI-SORRELL, M. E.; BEN-YEDIDIA, T.; SHTUTMAN, M.; FEINSTEIN, E.; EINAT, P.; BEN-ZE'EV, A. – Nr-CAM is a target gene of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. **Genes Dev**, **16**: 2058-72, 2002.
- COTTON, S. C.; SHARP, L.; LITTLE, J.; BROCKTON, N. – Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. **Am. J. Epidemiol.**, **151**(1): 7-32, 2000.
- CROSS, S. S.; HAMDY, F. C.; DELOULME, J. C.; REHMAN, I. – Expression of S100 proteins in normal human tissues and common cancers using tissue microarrays: S100A6, S100A8, S100A9 and S100A11 are all overexpressed in common cancers. **Histopathology**, **46**: 256-269, 2005.
- CUNHA, A. J. U. – Aspectos genéticos relacionados ao câncer do estômago e do intestino grosso. In: Habr-Gama, A; Gama-Rodrigues, J.J.; Betarello, A. – **Câncer do Estômago e do Intestino Grosso: Prevenção e Detecção**. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1980. p. 43-57.
- DE LOTT, L. B.; MORRISON, C.; SUSTER, S.; COHN, D. E.; FRANKEL, W. L. – CDX2 is a useful marker of intestinal-type differentiation. **Arch Pathol Lab Med**, **129**: 1100–1105, 2005.
- FEARON, E. R.; HAMILTON, S. R.; VOGELSTEIN, B. – Clonal analysis of human colorectal tumors. **Science**, **238**: 193-197, 1987.
- FERNÁNDEZ-PERALTA, A. M.; NEJDA, N.; OLIART, S.; MEDINA, V.; AZCOITA, M. M.; GONZÁLEZ-AGUILERA, J. J. – Significance of mutations in *TGFBR2* and *BAX* in neoplastic progression and patient outcome in sporadic colorectal tumors with high-frequency microsatellite instability. **Cancer Genet Cytogenet**, **157**: 18-24, 2005.
- FINLEY, G. G.; SCHULZ, N. T.; HILL, S. A.; GEISER, J. R.; PIPAS, J. M.; MEISLER, A.I. – Expression of the myc gene family in different stages of human colorectal cancer. **Oncogene**, **4**(8): 963-971, 1989.
- FLEMING, A. – On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proc R Soc**, **93**: 306–317, 1922.

FOSP – FUNDAÇÃO ONCOCENTRO DE SÃO PAULO. Mortalidade por Câncer no Estado de São Paulo: Tendência Temporal e Características Regionais (1987 a 2003). Cadernos FOSP, vol. 4, 2005.

FREEDMAN, A. N.; MICHALEK, A. M.; MARSHALL, J. R.; METTLIN, C. J.; PETRELLI, N. J.; ZHANG, Z-F.; BLACK, J. D.; SATCHIDANAND, S.; ASIRWATHAM, J. E. – The relationship between smoking exposure and p53 overexpression in colorectal cancer. **Br. J. Cancer**, **73**: 902-908, 1996.

GEBHARDT, C.; BREITENBACH, U.; TUCKERMANN, J. P.; DITTRICH, B. T.; RICHTER, K. H.; ANGEL, P. – Calgranulins S100A8 and S100A9 are negatively regulated by glucocorticoids in a c- Fos-dependent manner and overexpressed throughout skin carcinogenesis. **Oncogene**, **21**: 4266-4276, 2002.

GEBHARDT, C.; NÉMETH, J.; ANGEL, P.; HESS, J. – S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. **Biochem Pharmacol**, **72**: 1622-1631, 2006.

GERTIG, D. M.; STAMPFER, M.; HAIMAN, C.; HENNEKENS, C. H.; KELSEY, K.; HUNTER, D. J. – Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and colorectal cancer risk: a prospective study. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, **7**(11): 1001-1005, 1998.

GREENE, F. L.; PAGE, D. L.; FLEMING, I. D.; FRITZ, A. G.; BALCH, C. M.; HALLER, D. G.; MORROW, M. – Colon and Rectum. In: Greene, F.L.; Page, D.L.; Fleming, I.D.; Fritz, A.; Balch, C.M.; Haller, D.J.; Morrow, M. – **Cancer Staging Manual**. Chicago, Springer, 2002. p 113-23.

GUILLEM, J. G.; PATY, P. B.; ROSEN, N. – Molecular biology of colorectal cancer. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 149-156.

GUNDGAARD, M. G.; SOERENSEN, J. B.; EHRNROOTH, E. – Third-line therapy for metastatic colorectal cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, **61**(1): 1-13, 2008.

HARDEN, D. G. – Inherited susceptibility to mutation. In: Phillips, D.H. – **Environmental Mutagenesis**. Oxford, Bios. Scientific., 1995. p. 61-81.

HAYHOE, R. P. G.; KAMAL, A. M.; SOLITO, E.; FLOWER, R. J.; COOPER, D.; PERRETTI, M. – Annexin 1 and its bioactive peptide inhibit neutrophil-endothelium interactions under flow: indication of distinct receptor involvement. **Blood**, **107**: 2123-2130, 2006.

- HE, T. C.; CHAN, T. A.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. – PPAR $\delta$  is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Cell**, **99**: 335-45, 1999.
- HERMANI, A.; DE SERVI, B.; MEDUNJANIN, S.; TESSIER, P. A.; MAYER, D. – S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF-kappaB signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. **Exp. Cell Res.**, **312**: 184-197, 2006.
- HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. – Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, **11**(9): 1026-30, 1993.
- HITTELET, A.; LEGENDRE, H.; NAGY, N.; BRONCKART, Y.; PECTOR, J. - C.; SALMON, I.; YEATON, P.; GABIUS, H. - J.; KISS, R.; CAMBY, I. – Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. **Int J Cancer**, **103**: 370–379, 2003.
- HOULSTON, R. S. & PETO, J. Genetics of common cancers. In: Eeles, R.A.; Ponder, B.; Easton, D.E.; Horwich, A. – **Inherited predisposition to cancer**. London, Chapman Hall Medical, 1996. p 208-26.
- HOULSTON, R. S. & TOMLINSON, P. M. – Polymorphisms and colorectal risk. **Gastroenterology**, **121**: 282-301, 2001.
- HUANG, Z. G.; RAN, Z. H.; LU, W.; XIAO, S. D. – Analysis of gene expression profile in colon cancer using the Cancer Genome Anatomy Project and RNA interference. **Chin J Dig Dis**, **7**: 97-102, 2006.
- ILANTZIS, C.; DEMARTE, L.; SCREATON, R. A.; STANNERS, C. P. – Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. **Neoplasia**, **4**(2): 151-163, 2002.
- IMAKIIRE, T.; KUROKI, M.; SHIBAGUCHI, H.; ABE, H.; YAMAUCHI, Y.; UENO, A.; HIROSE, Y.; YAMADA, H.; YAMASHITA, Y.; SHIRAKUSA, T.; ISHIDA, I.; KUROKI, M. – Generation, immunologic characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen. **Int. J. Cancer**, **108**: 564–570, 2004.
- IONOV, Y.; PEINADO, M. A.; MALKHOSYAN, S.; SHIBATA, D.; PERUCHO, M. – Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, **363**(6429): 558-561, 1993.



- JANTSCHEFF, P.; TERRACCIANO, L.; LOWY, A.; GLATZ-KRIEGER, K.; GRUNERT, F.; MICHEEL, B.; BRÜMMER, J.; LAFFER, U.; METZGER, U.; HERRMANN, R.; ROCHLITZ, C. – Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance. **J Clin Oncol**, **21**: 3638-3646, 2003.
- JANES, K. A.; ALBECK, J. G.; GAUDET, S.; SORGER, P. K.; LAUFFENBURGER, D. A.; YAFFE, M. B. – A Systems Model of Signaling Identifies a Molecular Basis Set for Cytokine-Induced Apoptosis. **Science**, **310**: 1646-1653, 2005.
- JOHN, C. D.; SAHNI, V.; MEHET, D.; MORRIS, J. F.; CHRISTIAN, H. C.; PERRETTI, M.; FLOWER, R. J.; SOLITO, E.; BUCKINGHAM, J. C. – Formyl peptide receptors and the regulation of ACTH secretion: targets for annexin A1, lipoxins, and bacterial peptides. **FASEB J**, **21**: 1037–1046, 2007.
- JUBB, A. M.; HURWITZ, H. I.; NAI, W.; HOLMGREN, E. B.; TOBIN, P.; GUERRERO, A. S.; KABBINAVAR, F.; HOLDEN, S. N.; NOVOTNY, W. F.; FRANTZ, G. D.; HILLAN, K. J.; KOEPPEN, H. – Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. **J Clin Oncol**, **24**(2): 217-227, 2006.
- KATOH, T.; NAGATA, N.; KURODA, Y.; ITOH, H.; KAWAHARA, A.; KUROKI, N.; OOKUMA, R.; BELL, D. A. – Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphisms and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, **17**(9): 1855-1859, 1996.
- KIM, H. S.; LEE, M. - S. – STAT1 as a key modulator of cell death. **Cell Sign**, **19**: 454–465, 2007.
- KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. – Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, **87**: 159-170, 1996.
- KLEIVI, K.; LIND, G. E.; DIEP, C. B.; MELING, G. I.; BRANDAL, L. T.; NESLAND, J. M.; MYKLEBOST, O.; ROGNUM, T. O.; GIERCKSKY, K. - E.; SKOTHEIM, R. I.; LOTHE, R. A. – Gene expression profiles of primary colorectal carcinomas, liver metastases, and carcinomatoses. **Mol Cancer**, **6**: 2-17, 2007.
- KLUCKY, B.; MUELLER, R.; VOGT, I.; TEURICH, S.; HARTENSTEIN, B.; BREUHAHN, K.; FLECHTENMACHER, C.; ANGEL, P.; HESS, J. – Kallikrein 6 Induces E-Cadherin hedding and Promotes Cell Proliferation, Migration, and Invasion. **Cancer Res**, **67**(17):454-465, 2007.

- KOMATSU, K.; BUCHANAN, F. G.; OTAKA, M.; JIN, M.; ODASHIMA, M.; HORIKAWA, Y.; WATANABE, S.; DUBOIS, R. N. – Gene expression profiling constitutive activation of MEK1 and transformation of rat intestinal epithelial cells. **Mol Cancer**, **5**: 63-70, 2006.
- KROP, I. E.; SGROI, D.; PORTER, D. A.; LUNETTA, K. L.; LEVANGIE, R.; SETH, P.; KAELIN, C. M.; RHEI, E.; BOSENBERG, M.; SCHNITT, S.; MARKS, J. R.; PAGON, Z.; BELINA, D.; RAZUMOVIC, J.; POLYAC, K. – HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. **PNAS**, **98**(17): 9796-9801, 2001.
- KUMARAKULASINGHAM, M.; ROONEY, P. H.; DUNDAS, S. R.; TELFER, C.; MELVIN, W. T.; CURRAN, S.; MURRAY, G. I. – Cytochrome P450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. **Clin Cancer Res**, **11**(10): 3758-65, 2005.
- LANDI, S.; MORENO, V.; GIOIA-PATRICOLA, L.; GUINO, E.; NAVARRO, M.; DE OCA, J.; CAPELLA, G.; CANZIAN, F. – Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (*IL*)6, *IL8*, tumor necrosis factor  $\alpha$ , *NFKB1*, and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  with colorectal cancer. **Cancer Res**, **63**: 3560–3566, 2003.
- LEE, H. - S.; PARK, M. - H.; YANG, S. - J.; PARK, K. C.; KIM, N. - S.; KIM, Y. - S.; KIM, D. I.; YOO, H. - S.; CHOI, E. - J.; YEOM, Y. I. – Novel candidate targets of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in hepatoma cells. **Life Sciences**, **80**: 690–698, 2007.
- LEE, S.; ZHOU, G.; CLARK, T.; CHEN, J.; ROWLEY, J. D.; WANG, S. M. – The pattern of gene expression in human CD15+ myeloid progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98**: 3340-3345, 2001.
- LIMA, C. S.; NASCIMENTO, H.; BONADIA, L. C.; TEORI, M. T.; COY, C. S.; GOES, J. R.; COSTA, F. F.; BERTUZZO, C. S. – Polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) and the age of onset of sporadic colorectal adenocarcinoma. **Int J Colorectal Dis**, **22**(7): 757-63, 2007.
- LOMBAERTS, M.; VAN WEZEL, T.; PHILIPPO, K.; DIERSSEN, J. W. F.; ZIMMERMAN, R. M. E.; OOSTING, J.; VAN EIJK, R.; EILERS, P. H.; VAN DE WATER, B.; CORNELISSE, C. J.; CLETON-JANSEN, A. - M. – E-caderin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. **Br J Cancer**, **94**: 661-671, 2006.
- MAHTANI, R. L.; MAC DONALD, J. S. – Synergy between cetuximab and chemotherapy in tumors of the gastrointestinal tract. **Oncologist**, **13**(1): 39-50, 2008.

- MARGULIES, E. H. & INNIS, J. W. – eSAGE: Managing and analyzing data generated with Serial Analysis of Gene Expression (SAGE). **Bioinformatics**, **16**: 650-651, 2000.
- MELHAM, M. F.; NEISLER, A. I.; FINLEY, G. G. – Distribution of cells expressing myc proteins in human colorectal epithelium, polyps, and malignant tumors. **Cancer Res.**, **52**: 5853-5864, 1992.
- MIZOBE, T.; OGATA, Y.; MURAKAMI, H.; AKAGI, Y.; ISHIBASHI, N.; MORI, S.; SASATOMI, T.; SHIROUZU, K. – Efficacy of the combined use of bevacizumab and irinotecan as a postoperative adjuvant chemotherapy in colon carcinoma. **Oncol Rep**, **20**(3): 517-23, 2008.
- MOON, A.; YONG, H. Y.; SONG, J. I.; CUKOVIC, D.; SALAGRAMA, S.; KAPLAN, D.; PUTT, D.; KIM, H.; DOMBKOWSKI, A.; KIM, H. R. – Global gene expression profiling unveils S100A8/A9 as candidate markers in H-ras-mediated human breast epithelial cell invasion. **Mol Cancer Res**, **6**(10): 1544-53, 2008.
- MORABITO, A.; DE MAIO, E.; DI MAIO, M.; NORMANNO, N.; PERRONE, F. – Tyrosine kinase inhibitors of vascular endothelial growth factor receptors in clinical trials: current status and future directions. **Oncologist**, **11**: 753-764, 2006.
- NASCIMENTO, H.; COSTA, F. F.; LIMA, C. S. P. – Influência dos Polimorfismos dos Alelos do Sistema da Glutathione S-Transferase Mu 1 (*GSTM1*) e Theta 1 (*GSTT1*) e do Polimorfismo D104N do Gene *COL18A1* na Susceptibilidade ao Adenocarcinoma Colorretal Esporádico. Tese de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Clínica Médica. 2002.
- NG, K.; ZHU, A. X. – Targeting the epidermal growth factor receptor in metastatic colorectal cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, **65**(1): 8-20, 2008.
- NISHIKAWA, M.; TAMADA, A.; HYODOU, K.; UMEYAMA, Y.; TAKAHASHI, Y.; KOBAYASHI, Y.; KUMAI, H.; ISHIDA, E.; STAUD, F.; YABE, Y.; TAKAKURA, Y.; YAMASHITA, F.; HASHIDA, M. – Inhibition of experimental hepatic metastasis by targeted delivery of catalase in mice. *Clin Exp Metastasis*, **21**: 213–221, 2004.
- NKABYO, Y. S.; GO, Y. - M.; ZIEGLER, T. R.; JONES D. P. – Extracellular cysteine/cystine redox regulates the p44/p42 MAPK pathway by metalloproteinase-dependent epidermal growth factor receptor signaling. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, **289**: G70–G78, 2005.

- OCHEL, H. J.; GADEMANN, G. – Heat-shock protein 90: potential involvement in the pathogenesis of malignancy and pharmacological intervention. **Onkologie**, **25**: 466-473, 2002.
- OGAWA, K.; UTSUNOMIYA, T.; MIMORI, K.; TANAKA, F.; INOUE, H.; NAGAHARA, H.; MURAYAMA, S.; MORI, M. – Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, **11**(8): 2889-2893, 2005.
- OIKAWA, S.; INUZUKA, C.; KUROKI, M.; MATSUOKA, Y.; KOSAKI, G.; NAKAZATO, H. – Cell adhesion activity of non-specific cross-reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface: homophilic and heterophilic adhesion. **Biochem Biophys Res Comm**, **164**: 39-45, 1989.
- ORDOÑEZ, C.; SCREATON, R. A.; ILANTZIS, C.; STANNERS, C. P. – Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis. **Cancer Res**, **60**: 3419-3424, 2000.
- ORDONEZ, C.; ZHAI, A. B.; CAMACHO-LEAL, P.; DEMARTE, L.; FAN, M. M. Y.; STANNERS, C. P. – GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin  $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin interaction. **J Cell Physiol**, **210**: 757-765, 2007.
- OZTURK, N.; ERDAL, E.; MUMCUOGLU, M.; AKCALI, K. C.; YALCIN, O.; SENTURK, S.; ARSLAN-ERGUL, A.; GUR, B.; YULUG, I.; CETIN-ATALAY, R.; YAKICIER, C.; YAGCI, T.; TEZ, M.; OZTURK, M. – Reprogramming of replicative senescence in hepatocellular carcinoma-derived cells. **PNAS**, **103**(7): 2178-2183, 2006.
- PARKIN, D. M.; PISANI, P.; FERLAY, J. – Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **Int. J. Cancer**, **54**: 594-606, 1993.
- PARLE-McDERMOTT, A.; McWILLIAM, P.; TIGHE, O.; DUNICAN, D.; CROKE, D. T. – Serial analysis of gene expression identifies putative metastasis-associated transcripts in colon tumour cell lines. **Br. J. Cancer**, **83**(6): 725-728, 2000.
- PELTOMAKI, P.; AALTONEN, L. A.; SISTONEN, P.; PYLKKANEN, L.; MECKLIN, J.P.; JARVINEN, H.; GREEN, J. S.; JASS, J. R.; WEBER, J. L.; LEACH, F. S. – Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science**, **260**: 810-812, 1993.
- PETERS, R. K.; GARABRANT, D. H.; YU, M. C.; MACK, T. M. – A case-control study of occupational and dietary factors in colorectal cancer in young men by subsite. **Cancer Res.**, **49**: 5459-5468, 1989.

- PICKERING, L.; RUDMAN, S.; ROSS, P. J.; LESLIE, M. D. – Targeted therapy in colorectal carcinoma: more than a theory. **Colorectal Dis**, **10**(3): 209-18, 2008.
- PINHO, M. & ROSSI, B. M. – Câncer colorretal: modelo ideal para a compreensão da carcinogênese. In: Rossi, B.M. & Pinho, P. – **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. São Paulo, Lemar, 1999. p. 143-172.
- PFAFFL, M. W. – A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, **29**(9): e45, 2001.
- POCHAMPALLI, M. R.; BITLER, B. G.; SCHROEDER, J. A. – Transforming Growth Factor A-Dependent Cancer Progression Is Modulated by Muc1. **Cancer Res**, **67**(14): 6591-8, 2007.
- POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWEIER, J. L.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. – A model for p53-induced apoptosis. **Nature**, **389**(6648):300-305, 1997.
- POSTIGO, A. A.; DEPP, J. L.; TAYLOR, J. J.; KROLL, K. L. – Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. **EMBO J**, **22**: 2453–2462, 2003.
- RESZKA, E.; WASOWICZ, W.; GROMADZINSKA, J. – Genetic polymorfism of xenobiotic metabolising enzymes, diet and cancer susceptibility. **Br J Nutr**, **96**(4): 609-19, 2006.
- ROSELL, R.; TARON, M.; REGUART, N.; ISLA, D.; MORAN, T. – Epidermal growth factor receptor activation: how exon 19 and 21 mutations changed our understanding of the pathway. **Clin Cancer Res**, **12**(24): 7222-7231, 2006.
- RÜCKERT, F.; HENNIG, M.; PETRAKI, C. D.; WEHRUM, D.; DISTLER, M.; DENZ, A.; SCHRÖDER, M.; DAWELBAIT, G.; KALTHOFF, H.; SAEGER, H. D.; DIAMANDIS, E. P.; PILARSKY, C.; GRÜTZMANN, R. – Co-expression of KLK6 and KLK10 as prognostic factors for survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Br J Cancer**, **99**(9): 1484-92, 2008.
- SAHA, S.; BARDELLI, A.; BUCKHAULTS, P.; VELCULESCU, V. E.; RAGO, C.; ST. CROIX, B.; ROMANS, K. E.; CHOTI, M. A.; LENGAUER, C.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. – A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. **Science**, **294**: 1343-6, 2001.
- SARTO, C.; BINZ, P. A.; MOCARELLI, P. – Heat shock proteins in human cancer. **Electroforesis**, **21**: 1218-1226, 2000.
- SCHOTTENFELD, D. – Epidemiology. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 11-24.

- SHARP, L. & LITTLE, J. – Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, **159**: 423-443, 2004
- SHI, M.; CAPRAU, D.; ROMITTI, P.; CHRISTENSEN, K.; MURRAY, J. C. – Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH Human diversity panel for variants in folate pathway genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTRR*, *RFC1*, and *GCP2*. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, **67**: 545-549, 2003.
- SHIH, T.; LINDLEY, C. – Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. **Clin Ther**, **28**(11): 1779-1802, 2006.
- SHIKE, M. – Dietary Factors. In: Cohen, A.M.; Winawer, S.J.; Friedman, M.A.; Gunderson, L.L. – **Cancer of the Colon, Rectum, and Anus**. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 5-40.
- SIDRANSKY, D.; TOKINO, T.; HAMILTON, S. R.; KINZLER, K. W.; LEVIN, B.; FROST, P.; VOGELSTEIN, B. – Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. **Science**, **256**: 102-105, 1992.
- SOETH, E.; WIRTH, T.; LIST, H. J.; KUMBHANI, S.; PETERSEN, A.; NEUMAIER, M.; CZUBAYKO, F.; JUHL, H. – Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. **Clin Cancer Res**, **7**: 2022-30, 2001.
- ST. CROIX, B.; RAGO, C.; VELCULESCU, V.; TRAVERSO, G.; ROMANS, K. E.; MONTGOMERY, E.; LAL, A.; RIGGINS, G. J.; LENGAUER, C.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. – Genes expressed in human tumor endothelium. **Science**, **289**: 1197-1202, 2000.
- STANNERS, C. P.; FUKS, A. – Properties of adhesion mediated by the human CEA family. In: Stanners, C. P. – **Cell Adhesion and Communication by the CEA Family**. Vol. 5. Amsterdam, Harwood Academic Publishers, 1998. p. 57-72.
- STEMPELJ, M.; KEDINGER, M.; AUGENLICHT, L.; KLAMPFER, L. – Essential Role of the JAK/STAT1 Signaling Pathway in the Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase in Intestinal Epithelial Cells and Its Regulation by Butyrate. **J Biol Chem**, **282**(13): 9797-9804, 2007.
- STRIZ, I. & TREBICHAVSKY, I. – Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. **Physiol Res**, **53**: 245-253, 2004.

- STULIK, J.; OSTERREICHER, J.; KOUPILOVA, K.; KNIZEK, J.; MACELA, A.; BURES, J.; JANDIK, P.; LANGR, F.; DEDIC, K.; JUNGBLUT, P. R. – The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. **Electrophoresis**, **20**: 1047-1054, 1999.
- SUGI, K.; SAITOH, O.; HIRATA, I.; KATSU, K. – Fecal lactoferrin as a marker for disease activity in inflammatory bowel disease: comparison with other neutrophil-derived proteins. **Am J Gastroenterol**, **91**: 927–934, 1996.
- SUH, K. W.; KIM, F. H.; KIM, Y. B.; KIM, F.; FEONG, S. – Thymidylate synthase gene polymorphism as a prognostic factor for colon cancer. **J Gastrointest Surg**, **9**: 336-42, 2005.
- THIJSSSEN, V. L.; HULSMANS, S.; GRIFFIOEN, A. W. – The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. **Am J Pathol**, **172**(2): 545-53, 2008.
- VALLBÖHMER, D.; ZHANG, W.; GORDON, M.; YANG, D. Y.; YUN, J.; PRESS, O. A.; RHODES, K. E.; SHERROD, A. E.; IQBAL, S.; DANENBERG, K. D.; GROSHEN, S.; LENZ, H.-J. – Molecular determinants of cetuximab efficacy. **J Clin Oncol**, **23**: 3536-3544, 2005.
- VAN CUTSEM, E. – Challenges in the use of epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer. **The Oncologist**, **11**: 1010–1017, 2006.
- VAN DEN BERG, A.; VISSER, L.; POPPEMA, S. – High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. **Am J Pathol**, **154**(6): 1685-1691, 1999.
- VAN DER SLUYS VEER, A.; BROUWER, J.; BIEMOND, I.; BOHBOUTH, G. E.; VERSPAGET, H. W.; LAMERS, C. B. – Fecal lysozyme in assessment of disease activity in inflammatory bowel disease. **Dig Dis Sci**, **43**: 590–595, 1998.
- VAN GEELLEN, C. M.; WESTRA, E. G. V.; EK, W. B. - V.; ZWART, N.; HOLLEMA, H.; BOEZEN, H. M.; MULDER, N. H.; PLUKKER, J. T.; DE JONG, S.; KLEIBEUKER, J. H.; KOORNTRA, J. J. – Prognostic significance of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and its receptors in adjuvantly treated stage III colon cancer patients. **J Clin Oncol**, **24**(31): 4998-5004, 2006.
- VETTORE, A. L. & CABALLERO, O. L. – Câncer Colorretal. In: Ferreira, C.G. & Rocha, J.C. – **Oncologia Molecular**. São Paulo, Editora Atheneu. 2004. p: 171-181.

- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. – Serial Analysis of Gene Expression. **Science**, **270**(5235): 484-487, 1995.
- VERSCHUEREN, K.; REMACLE, J. E.; COLLART, C.; KRAFT, H.; BAKER, B. S.; TYLZANOWSKI, P.; NELLES, L.; WUYTENS, G.; SU, M. T.; BODMER, R.; SMITH, J. C.; HUYLEBROECK, D. – SIP1, a novel zinc finger/homeodomain repressor, interacts with Smad proteins and binds to 5'-CACCT sequences in candidate target genes. **J Biol Chem**, **274**: 20489–20498, 1999.
- VOGELSTEIN, B.; FEARON, E. R.; KERN, S. E.; HAMILTON, S. R.; PREISINGER, A. C.; NAKAMURA, Y.; WHITE, R. – Allelotype of colorectal carcinomas. **Science**, **244**(4901): 207-211, 1989.
- WANG, Y.; ZHANG, Y.; YANG, X.; HAN, W.; LIU, Y.; XU, Q.; ZHAO, R.; DI, C.; SONG, Q.; MA, D. – Chemokine-like factor 1 is a functional ligand for CC chemokine receptor 4 (CCR4). **Life Sci**, **78**: 614-621, 2006.
- WATSON, N. F. S.; DURRANT, Z. M.; ELLIS, I. O.; SCHOLEFIELD, J. H.; SPENDLOVE, I. – Expression of the membrane complement regulatory protein CD59 (protectin) is associated with reduced survival in colorectal cancer patients. **Cancer Immunol Immunother**, **55**: 973-980, 2006.
- WAYE, J. – Evolução do câncer do cólon. In: Habr-Gama, A; Gama-Rodrigues, J.J.; Betarello, A. – **Câncer do Estômago e do Intestino Grosso: Prevenção e Detecção**. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1980. p. 73-76.
- WEHKAMP, J.; CHU, H.; SHEN, B.; FEATHERS, R. W.; KAYS, R. J.; LEE, S. K.; BEVINS, C. L. – Paneth cell antimicrobial peptides: Topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. **FEBS Letters**, **580**: 5344–5350, 2006.
- WEIHRAUCH, M. R.; STIPPEL, D.; FRIES, J. W.; ARNOLD, D.; BOVENSCHULTE, H.; COUTELLE, O.; HACKER, U. – Complete remission in a colon cancer patient with a large, irresectable liver metastasis after XELOX/cetuximab/bevacizumab treatment. **Onkologie**, **31**(8-9): 464-7, 2008.
- WINAWER, S. J. & SHERLOCK, P. – Malignant neoplasms of the small and large intestine. In: Sleisenger, M.H. & Fordtran, J.S. – **Gastrointestinal Disease**. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1983, p. 1220-1249.
- WINAWER, S. J.; ENKER, W. E.; LIGHTDALE, C. J. – Malignant tumors of the colon and rectum. In: Berk, J.E. – **Gastroenterology**. Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1985, p. 2531-2574.



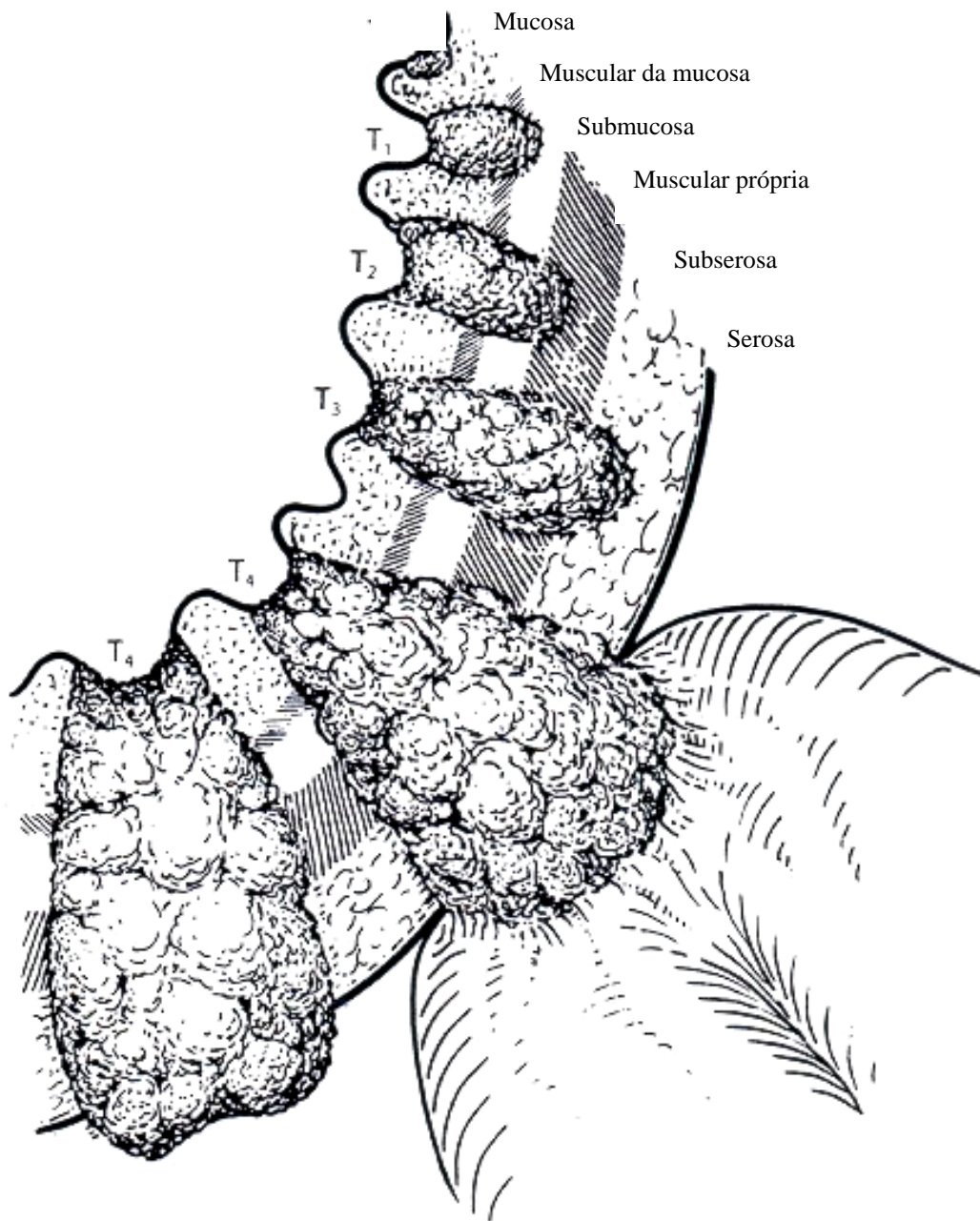
- WITKIN, S. S. – Heat shock protein expression and immunity: relevance to gynecologic oncology. **Eur J Gynaecol Oncol**, **22**: 249-256, 2001.
- WONG, S. - F. – Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. **Clin Ther** **27**(6): 684-694, 2005.
- YAO, R.; DAVIDSON, D. D.; LOPEZ-BELTRAN, A.; MACLENNAN, G. T.; MONTIRONI, R.; CHENG, L. – The S100 proteins for screening and prognostic grading of bladder cancer. **Histol Histopathol**, **22**: 1025-1032, 2007.
- YOUSEF, G. M.; BORGONO, C. A.; POPALIS, C.; YACOUB, G. M.; POLYMERIS, M. E.; SOOSAIPILLAI, A.; DIAMANDIS, E. P. – In-silico analysis of kallikrein gene expression in pancreatic and colon cancers. **Anticancer Res.**, **24**(1): 43-51, 2004.
- ZHOU, G.; CHEN, J.; LEE, S.; CLARK, T.; ROWLEY, J. D.; WANG, S. M. – The pattern of gene expression in human CD34+ stem/ progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98**: 13966-13971, 2001.
- ZHOU, M.; CHINNAIYAN, A. M.; KLEER, C. G.; LUCAS, P. C.; RUBIN, M. A. – Alpha-methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. **Am. J. Surg. Pathol.**, **26**(7): 926-31, 2002.
- ZIMMER, R. & THOMAS, P. – Expression profiling and interferon-beta regulation of liver metastases in colorectal cells. **Clin Exp Metastasis**, **19**: 541-50, 2002.

## **ANEXOS**

---



**Possibilidades da extensão de acometimento do câncer colorretal em parede do cólon e órgãos ou tecidos adjacentes**



**Anexo 1**



## Critérios de classificação do sistema de estadiamento TNM para o câncer de cólon

---

T <sub>x</sub>	Informações insuficientes para a avaliação do tumor primário
pT <sub>0</sub>	Nenhuma evidência de tumor primário
pT <sub>is</sub>	Carcinoma <i>in situ</i>
pT <sub>1</sub>	Tumor se estende até a submucosa
pT <sub>2</sub>	Tumor se estende até a muscular própria
pT <sub>3</sub>	Tumor ultrapassa a muscular própria até a subserosa ou tecidos pericólicos não peritoniais ou perirretais
pT <sub>4</sub>	Tumor se estende diretamente até outros órgãos ou tecidos, ou perfura o peritônio visceral
N <sub>x</sub>	Informações insuficientes para a avaliação de linfonodos regionais
pN <sub>0</sub>	Linfonodos sem metástases
pN <sub>1</sub>	Metástases em 1 a 3 linfonodos pericólicos ou perirretais
pN <sub>2</sub>	Metástases em 4 ou mais linfonodos pericólicos ou perirretais
pN <sub>3</sub>	Metástase em qualquer linfonodo ao longo do curso de um tronco vascular principal
M <sub>x</sub>	Informações insuficientes para a avaliação de metástases distantes
M <sub>0</sub>	Sem metástases distantes
M <sub>1</sub>	Metástase distante presente

---



## Grupos de estadiamento e características TNM do câncer de cólon

Estágio	Código
Estágio 0	$pT_{is}, pN_0, M_0$
Estágio I	$pT_1, pN_0, M_0$
	$pT_2, pN_0, M_0$
Estágio II	$pT_3, pN_0, M_0$
	$pT_4, pN_0, M_0$
Estágio III	qualquer $pT, pN_1, M_0$
	qualquer $pT, pN_2, M_0$
	qualquer $pT, pN_3, M_0$
Estágio IV	qualquer $pT, qualquer pN, M_1$

**Anexo 3**







**Carta de consentimento pós-informação a ser obtida dos pacientes, para participação no estudo intitulado “Caracterização da Expressão Gênica de Células Tumorais de Pacientes com Adenocarcinoma de Cólon Esporádico”**

**Nome do paciente:**.....

**Idade:**.....anos      **RG:**.....**HC:**.....

**Endereço:**.....

**Nome do responsável legal** (se paciente incapacitado):.....

**RG:**.....**Grau de parentesco:**.....

**Endereço:**.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei um pequeno pedaço do meu intestino grosso (3-4 cm de diâmetro), a ser obtido durante cirurgia necessária para o tratamento da minha doença. Estou ciente de que este pequeno pedaço será utilizado para a avaliação de características genéticas que possam estar relacionadas com o câncer do intestino grosso. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. O material biológico obtido será utilizado apenas para cumprir os objetivos deste estudo. Para qualquer outro uso do mesmo material, um novo projeto de pesquisa será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dr.<sup>a</sup> Carmen Silvia Passos Lima no Hemocentro - UNICAMP. Tel: 3788-8740/3788-9219.

**Anexo 4**

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do CEP. Tel: 3788-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....  
**Assinatura do paciente**

.....  
**Assinatura do responsável legal**

.....  
**Assinatura do pesquisador legal**  
**Dra. Carmen Silvia Passos Lima**  
**RG: 9675366**

Campinas,..... / ..... / .....

**Anexo 4**



**Carta de consentimento pós-informação a ser obtida dos indivíduos controle, para participação no estudo intitulado “Caracterização da Expressão Gênica de Células Tumorais de Pacientes com Adenocarcinoma de Cólon Esporádico”**

**Nome:**.....

**RG:** .....

**Idade:** .....anos

**Endereço residencial:**.....

.....

**Endereço comercial:** .....

.....

Aceito participar do estudo proposto, no qual fornecerei um pequeno pedaço do meu intestino grosso (3-4 cm de comprimento), a ser obtido durante cirurgia necessária para o tratamento da minha doença. Estou ciente de que este pequeno pedaço será utilizado para a avaliação de características genéticas que possam estar relacionadas com o câncer do intestino grosso. Estou ciente de que não terei prejuízos com a realização deste exame. O material biológico obtido será utilizado apenas para cumprir os objetivos deste estudo. Para qualquer outro uso do mesmo material, um novo projeto de pesquisa será encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não vai prejudicar o meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dr.<sup>a</sup> Carmen Silvia Passos Lima no Hemocentro - UNICAMP. Tel: 3788-8740/3788-9219.

**Anexo 5**

Se tiver reclamações sobre qualquer procedimento do estudo poderei procurar a secretaria do CEP. Tel: 3788-8936.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

.....  
**Assinatura do paciente**

.....  
**Assinatura do responsável legal**

.....  
**Assinatura do pesquisador legal**  
**Dra. Carmen Silvia Passos Lima**  
**RG: 9675366**

Campinas,..... / ..... / .....

**Anexo 5**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**PARECER Nº 999/2003**

**Registro CONEP: 7778** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**Registro CEP: 565/2002**

**Processo nº 25000.052156/2003-58**

**Projeto de Pesquisa:** "Caracterização da expressão gênica de células tumorais de pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico"

**Pesquisador Responsável:** Helvia Nascimento (doutoranda)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carmen Sílvia P. Lima (orientadora)

**Instituição:** UNICAMP - Hemocentro

**Área Temática Especial:** Genética Humana

**Objetivos:**

- determinar o perfil de expressão gênica de células epiteliais do adenocarcinoma colorretal esporádico – ACE por meio da comparação com o perfil de expressão gênica de células epiteliais de cólon normal, pela técnica "Serial Analysis of Gene Expression – SAGE";
- validar os resultados obtidos pela técnica SAGE para genes diferentemente expressos e de interesse em pacientes com o diagnóstico de ACE através da reação em cadeia da polimerase em tempo real e pelo método de "Western blot";
- identificar as seqüências de interesse, pertencentes a genes ainda não descritos na doença, por sequenciamento.

Serão avaliados dez pacientes com diagnóstico de ACE e haverá um paciente acompanhado no Ambulatório de Proctologia sem doença neoplásica ou pré-neoplásica como controle. Pretende-se com este estudo melhorar o entendimento da etiologia e fisiopatologia da doença. O recrutamento ocorrerá no período pré-operatório, após a obtenção do consentimento. Cada paciente terá avaliação clínica e laboratorial.

O projeto foi colocado em pendência pelo CEP para revisão dos critérios de inclusão e exclusão, detalhamento dos riscos e benefícios, dos aspectos éticos e do TCLE. Sendo então, aprovado.

As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais das Resolução CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

**Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa -CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.**

**Situação:** Projeto aprovado  
Brasília, 26 de junho de 2003

  
WILLIAM SAAD HOSSNE  
Coordenador da CONEP/CNS/MS

**Anexo 6**



## **APÊNDICES**

---





## Transcritos hiperexpressos observados na biblioteca de células epiteliais neoplásicas

Tag	Símbolo	Descrição	N°Unigene	SAGE CC	SAGE CN	P valor	Diferença de expressão
GGTTGAAAAA	NI	Transcribed locus- weakly similar to XP_516951.1 PREDICTED: similar to chromosome 3 open reading frame 6 long isoform [Pan troglodytes]	Hs.446545	92	0	6,8E-21	91,09
TACCTGCAGA	S100A8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	Hs.416073	89	1	6,8E-21	88,12
ATGTAAAAAA	LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.524579	78	0	6,8E-21	77,23
TGGGGTTCTT	DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	0	2,3E-18	58,42
CGCCGACGAT	G1P3	Interferon- alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	Hs.523847	49	1	5,9E-14	48,52
CCATCGTCCT	ND	ND	ND	44	0	7,1E-14	43,57
GTGGCCACGG	S100A9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	Hs.112405	33	1	2,5E-09	32,67
CACTCAATAA	KLK6	Kallikrein 6 (neurosin- zyme)	Hs.79361	28	0	4,3E-09	27,72
ATGAAAAGAA	MAL2	Mal- T-cell differentiation protein 2	Hs.201083	27	0	8,6E-09	26,73
CCTTCGAGAT	RPS5	Ribosomal protein S5	Hs.378103	26	1	2,5E-07	25,74
TGGCTAGTGT	PSMB7	Proteasome (prosome- macropain) subunit- beta type- 7	Hs.213470	23	0	1,3E-07	22,77
GAAGGAGATA	CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	0	2,7E-07	21,78
TGAAAGGTTT	HSPA6	Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')	Hs.3268	22	1	3,3E-06	21,78
AAGGATAAAA	CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	Hs.466814	20	0	1,1E-06	19,8
GGAAAAGTGG	SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor- clade A (alpha-1 antiproteinase- antitrypsin)- member 1	Hs.525557	20	1	1,2E-05	19,8
GTGCGCTGAG	HLA-C	Major histocompatibility complex- class I- C	Hs.534125	38	2	9,4E-10	18,81
CACTTCAAGG	LY6E	Lymphocyte antigen 6 complex- locus E	Hs.521903	18	0	4,2E-06	17,82
AGAAAGATGT	ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	1E-12	17,16
CTTCTTGCCC	HBA2	Hemoglobin- alpha 2	Hs.398636	17	0	8,3E-06	16,83
GCCTGCTATT	DEFA1	Defensin- alpha 1	Hs.380781	16	0	1,7E-05	15,84
TGGAAGCACT	IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	0,00016	15,84

**Apêndice 1**

*continuação*

ACAACTCAAT	BRI3	Brain protein I3	Hs.446429	15	0	3,3E-05	14,85
AAAGTGAAGA	NI	Similar to RPE-spondin	Hs.356766	15	1	0,0003	14,85
AGACATTGTA	SYT13	Synaptotagmin XIII	Hs.436643	15	0	3,3E-05	14,85
GTGTGTTTGT	TGFBI	Transforming growth factor- beta-induced- 68kDa	Hs.369397	15	0	3,3E-05	14,85
TGCCTTACTT	PDCD6	Aryl-hydrocarbon receptor repressor	Hs.50823	14	0	6,6E-05	13,86
TTGTTGTTGA	CALM2	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase- delta)	Hs.468442	14	0	6,6E-05	13,86
AATTAATTA	LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.524579	14	0	6,6E-05	13,86
TCCTATTAAG	ND	ND	ND	14	1	0,00056	13,86
CCGAGGCTTG	ND	ND	ND	14	0	6,6E-05	13,86
GCCTGCAGTC	SPINT2	Serine peptidase inhibitor- Kunitz type- 2	Hs.31439	14	0	6,6E-05	13,86
GCCCCAATA	LGALS1	Lectin- galactoside-binding- soluble- 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	0	0,00013	12,87
CAATGCTGT	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1- 91kDa	Hs.470943	13	0	0,00013	12,87
AACGCGGCCA	MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	3,4E-06	12,38
CCCAACGCGC	HBA2	Hemoglobin- alpha 2	Hs.398636	12	0	0,00026	11,88
GCAAGAAAGT	HBB	Hemoglobin- beta	Hs.523443	12	0	0,00026	11,88
TGCCCTCAGG	LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24p3)	Hs.204238	47	4	1,6E-10	11,63
AAAAAAAAGA	CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	0	0,00052	10,89
GACTGCTATT	DEFA1	Defensin- alpha 1	Hs.380781	11	0	0,00052	10,89
AATATTGAGA	EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3- subunit 6 48kDa	Hs.411881	11	0	0,00052	10,89
TGTAGGTCAT	GPR87	G protein-coupled receptor 87	Hs.58561	11	0	0,00052	10,89
TAAGGCTTAA	KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	0	0,00052	10,89
CCCCTGGATC	ND	ND	ND	11	0	0,00052	10,89

**Apêndice 1**

*continuação*

TCACAAAAGA	ZC3HDC1	Poly (ADP-ribose) polymerase family- member 12	Hs.12646	11	0	0,00052	10,89
AGGCGAGATC	PSMA7	Proteasome (prosome- macropain) subunit- alpha type- 7	Hs.233952	11	0	0,00052	10,89
ATGTGAAGAG	SPARC	Secreted protein- acidic- cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	11	0	0,00052	10,89
GCCTACCCGA	TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Hs.23582	11	0	0,00052	10,89
CCGTCCAAGG	RPS16	Ribosomal protein S16	Hs.397609	53	5	2,4E-11	10,50
ACCTGTATCC	IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	Hs.374650	21	2	4E-05	10,40
CCCCCTGGAT	S100A6	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	Hs.275243	63	6	3,3E-13	10,40
ACTGGGTCTA	NME2	Non-metastatic cells 2- protein (NM23B) expressed in	Hs.558361	20	2	7,3E-05	9,90
GCCGAGGAAG	RPS12	Ribosomal protein S12	Hs.546289	70	7	2,7E-14	9,90
GCTTTTAAGG	RPS20	Ribosomal protein S20	Hs.8102	30	3	8,8E-07	9,90
TTATGGGATC	GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein)- beta polypeptide 2-like 1	Hs.5662	18	2	0,00024	8,91
TTCTTGTGGC	2'-PDE	2'-phosphodiesterase	Hs.151293	17	2	0,00044	8,42
ATGACTCAAG	NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2- group F- member 6	Hs.466148	17	2	0,00044	8,42
GAAACAAGAT	PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	Hs.78771	17	2	0,00044	8,42
GTTCACATTA	CD74	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex- class II antigen-associated)	Hs.436568	142	17	6,8E-21	8,27
GAAATGTAAG	PCBP2	Poly(rC) binding protein 2	Hs.546271	25	3	1,7E-05	8,25
TACATTTTCA	RGS19IP1	GIPC PDZ domain containing family- member 1	Hs.6454	16	2	0,00079	7,92
GATGAGTCTC	PSMA7	Proteasome (prosome- macropain) subunit- alpha type- 7	Hs.233952	16	2	0,00079	7,92
GGGCGCTGTG	UQCR	Ubiquinol-cytochrome c reductase- 6.4kDa subunit	Hs.8372	16	2	0,00079	7,92
TGTACCTGTA	K-ALPHA-1	Tubulin- alpha- ubiquitous	Hs.334017	89	12	9E-16	7,34
TCTTGTGCAT	LDHA	Lactate dehydrogenase A	Hs.2795	22	3	9,7E-05	7,26
CGTGGAAGCA	LOC90637	Zinc finger- AN1-type domain 2A	Hs.116567	22	3	9,7E-05	7,26

**Apêndice 1**

*continuação*

---

GAAATGATGA	PFDN5	Prefoldin 5	Hs.288856	36	5	5,2E-07	7,13
TCACAAGCAA	MGC71999	Alpha-NAC protein	Hs.558777	27	4	2,2E-05	6,68
TCTTAATGAA	EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A- isoform 2	Hs.478553	33	5	2,8E-06	6,53
AGAGGGTGGG	DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog- subfamily B- member 1	Hs.515210	26	4	3,8E-05	6,44
GCACAAGAAG	GAS5	Growth arrest-specific 5	Hs.531856	52	8	3,7E-09	6,44
GGAGTGGACA	RPL18	Ribosomal protein L18	Hs.515517	26	4	3,8E-05	6,44
CCCTGGGTTC	FTL	Ferritin- light polypeptide	Hs.558330	32	5	4,9E-06	6,34
CTCAACATCT	RPLP0	Ribosomal protein- large- P0	Hs.448226	32	5	4,9E-06	6,34
TCCCGTACAT	ND	ND	ND	19	3	0,00053	6,27
TGATGTCTGG	TMEPAI	Transmembrane- prostate androgen induced RNA	Hs.517155	19	3	0,00053	6,27
CTTCCAGCTA	ANXA2	Annexin A2	Hs.511605	18	3	0,00093	5,94
TGGCTGTGTG	LOC284361	Hypothetical protein LOC284361	Hs.515550	18	3	0,00093	5,94
GACATCAAGT	KRT19	Keratin 19	Hs.514167	24	4	0,00012	5,94
ACAGTGGGGA	TEBP	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	1,9E-06	5,94
GGGAAATCG	TMSB10	Thymosin- beta 10	Hs.446574	35	6	3,3E-06	5,78
AAGGTGGAGG	RPL18A	Ribosomal protein L18a	Hs.558383	93	16	1,9E-14	5,76
CAGGCCCCAC	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	Hs.417004	23	4	0,0002	5,69
ATGGCTGGTA	RPS2	Ribosomal protein S2	Hs.506997	72	13	3,7E-11	5,48
TTGGAGATCT	NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex- 4- 9kDa	Hs.50098	33	6	9,6E-06	5,45
AAGGAGATGG	RPL31	Ribosomal protein L31	Hs.518551	75	14	2,4E-11	5,30
TACAAGAGGA	RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	3,6E-06	5,23

---

ND: não descrito; NI: não identificado

**Apêndice 1**

## Transcritos hipoexpressos observados na biblioteca de células epiteliais neoplásicas

<i>Tag</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Descrição</i>	<i>N°Unigene</i>	<i>SAGE CC</i>	<i>SAGE CN</i>	<i>P valor</i>	<i>Diferença de expressão</i>
AAATATCCTA	DAB1	Disabled homolog 1 (Drosophila)	Hs.477370	0	130	6,8E-21	-131,29
GTACGTATTC	ZFH1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	6,8E-21	-110,09
CTCCCCAAG	MGC27165	Hypothetical protein MGC27165	Hs.549044	3	185	6,8E-21	-62,28
TCAGTGGTAG	HT017	HT017 protein	Hs.558524	1	47	1,4E-13	-47,47
GCCCAGGTCA	NI	CDNA clone IMAGE:5759225	Hs.447537	2	92	6,8E-21	-46,46
CTCCCCAAA	MGC27165	Hypothetical protein MGC27165	Hs.549044	3	104	6,8E-21	-35,01
CGATTGGTGG	RFC1	Replication factor C (activator 1) 1- 145kDa	Hs.507475	0	33	9,8E-11	-33,33
TGTCACTGGG	NI	Transcribed locus	Hs.476965	1	30	1,3E-08	-30,30
ATTTGAGCAG	C20orf135	Chromosome 20 open reading frame 135	Hs.266774	0	26	1,3E-08	-26,26
CGACCCACAA	ND	ND	ND	0	24	5,3E-08	-24,24
CAAATAACC	IGHM	Immunoglobulin heavy constant mu	Hs.525648	1	22	2,7E-06	-22,22
CAAATCCAAA	ND	ND	ND	0	22	2,1E-07	-22,22
ATAATTGGAA	ND	ND	ND	0	22	2,1E-07	-22,22
GGCTGTGACG	ND	ND	ND	0	20	8,6E-07	-20,2
CGCCGAATAA	ND	ND	ND	3	58	1,3E-14	-19,53
CACCCCTGAT	CKB	Creatine kinase- brain	Hs.173724	1	19	1,9E-05	-19,19
GGGGTCAGGG	PYGB	Phosphorylase- glycogen; brain	Hs.368157	4	72	1,3E-17	-18,18
GGCTTTAGGG	SPDY1	Speedy homolog 1 (Drosophila)	Hs.511956	3	52	6,3E-13	-17,51
GCCTCCAAA	FLJ32871	Hypothetical protein FLJ32871	Hs.143519	1	17	7E-05	-17,17
CTCATAAAA	DKFZp434H2	LMBR1 domain containing 2	Hs.294103	3	51	1,2E-12	-17,17
CACACTACTA	ND	ND	ND	0	17	7E-06	-17,17

**Apêndice 2**

*continuação*

GAGTAAAAAA	PLA1A	Phospholipase A1 member A	Hs.437451	3	50	2,3E-12	-16,83
GCTAGGTTTA	NI	Transcribed locus	Hs.535016	8	132	6,8E-21	-16,66
GATCCCAACT	MT2A	Metallothionein 2A	Hs.418241	0	16	1,4E-05	-16,16
GTAAAACCCC	MMAB	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	Hs.12106	1	15	0,00025	-15,15
TGGCAGTCTG	ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	6,8E-21	-15,15
GGCTACACCT	ND	ND	ND	4	59	5,6E-14	-14,90
ACTTTCCAAA	AKAP1	A kinase (PRKA) anchor protein 1	Hs.463506	12	171	6,8E-21	-14,39
CTCAAAAAAA	CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	3,7E-13	-14,14
GCTAGGAATA	MGC3040	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	0	14	5,7E-05	-14,14
TGCTCCTACC	FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein	Hs.111732	2	28	4E-07	-14,14
GTGGCTCACA	MGC14817	Hypothetical protein MGC14817	Hs.504820	1	14	0,00048	-14,14
GAGTTTATTC	MGC27165	Hypothetical protein MGC27165	Hs.497723	0	14	5,7E-05	-14,14
GAAACATTCT	NFYC	Nuclear transcription factor Y- gamma	Hs.233458	1	14	0,00048	-14,14
TCACTGCACT	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta	Hs.491322	1	14	0,00048	-14,14
AAATATCCAA	NI	Transcribed locus	Hs.568041	0	14	5,7E-05	-14,14
ATTAATAAAA	UGDH	UDP-glucose dehydrogenase	Hs.28309	0	14	5,7E-05	-14,14
GCAAACCCCT	IKKBK	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells- kinase beta	Hs.413513	2	27	7,6E-07	-13,63
CCCGCCTCTT	NI	Hypothetical protein LOC283486	Hs.447504	3	40	1,3E-09	-13,47
GTGAAGCCCC	NI	MRNA; cDNA DKFZp686I03111 (from clone DKFZp686I03111)	Hs.542749	1	13	0,00091	-13,13
GCCCCTGCGC	UNQ2446	MRCC2446	Hs.435464	3	38	4,7E-09	-12,79
TTACTTATAC	NI	Transcribed locus	Hs.476965	16	200	6,8E-21	-12,62
CCTGTGTTGG	CPS1	Carbamoyl-phosphate synthetase 1- mitochondrial	Hs.149252	18	218	6,8E-21	-12,23

**Apêndice 2**

*continuação*

AAACCCAAT	IGLC2	Immunoglobulin lambda joining 3	Hs.567242	4	48	5,6E-11	-12,12
TGAGAAGAAG	MAP7	Microtubule-associated protein 7	Hs.486548	3	36	1,6E-08	-12,12
GGTATGTTGT	ND	ND	ND	0	12	0,00023	-12,12
AAAATTATTA	NI	Transcribed locus- weakly similar to NP_008188.1 cytochrome c oxidase subunit I [Pan troglodytes]	Hs.557598	0	12	0,00023	-12,12
TTAGCTTGTT	ND	ND	ND	4	47	1E-10	-11,87
AGCTGTCCCC	NI	Transcribed locus	Hs.563993	20	231	6,8E-21	-11,67
CTCACCTGAA	IGJ	Immunoglobulin J polypeptide- linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	Hs.381568	0	11	0,00046	-11,11
CCTCAGGATA	TGFA	Transforming growth factor- alpha	Hs.170009	24	256	6,8E-21	-10,77
AGCTGGAGTC	ND	ND	ND	7	71	7,7E-15	-10,24
AAAGAACAGA	C21orf96	Chromosome 21 open reading frame 96	Hs.549202	2	20	6E-05	-10,10
GTGGCACACG	EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3- subunit 2 beta- 36kDa	Hs.530096	0	10	0,00092	-10,10
GCGGAGGTGG	MGC27165	Hypothetical protein MGC27165	Hs.549044	0	10	0,00092	-10,10
GATTTCAAGG	MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	Hs.187199	0	10	0,00092	-10,10
GCCATCCCCA	ND	ND	ND	0	10	0,00092	-10,10
CTCATAGGGA	ND	ND	ND	0	10	0,00092	-10,10
GCTTTTTCAA	NI	Similar to asparagine synthetase; glutamine-dependent asparagine synthetase; TS11 cell cycle control protein	Hs.386230	0	10	0,00092	-10,10
CAACGAAACC	UBB	Ubiquitin B	Hs.356190	0	10	0,00092	-10,10
TGCCTAGACC	NI	Transcribed locus	Hs.555116	6	57	7E-12	-9,59
ATTGTGAGGG	ND	ND	ND	4	34	2,9E-07	-8,58
AAGGGAGCAC	IGLC2	Immunoglobulin lambda joining 3	Hs.567242	7	57	3,3E-11	-8,22
CCTATCATAT	MGP	Matrix Gla protein	Hs.365706	2	16	0,00068	-8,08
CTAAGGCGAG	ND	ND	ND	2	16	0,00068	-8,08

**Apêndice 2**



*continuação*

AAACATCCAA	NAV3	Ribosomal protein S16 family protein	Hs.306322	2	16	0,00068	-8,08
ATCACGCCCT	NI	Transcribed locus	Hs.563993	22	172	6,8E-21	-7,90
ATGGCAGGAG	RCL1	RNA terminal phosphate cyclase-like 1	Hs.194121	9	67	1,8E-12	-7,52
GGGAAGCAGA	F11R	F11 receptor Transcribed locus- moderately similar to XP_497531.1 PREDICTED: similar to NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain 1 - western lowland gorilla mitochondrion [Homo sapiens]	Hs.517293	27	197	6,8E-21	-7,37
TGGTGTATGC	NI		Hs.508682	9	65	5,8E-12	-7,29
GATGACCCCC	ND	ND	ND	4	28	9,6E-06	-7,07
AGGTGGCAAA	ND	ND	ND	3	21	0,00014	-7,07
CGGAGATGTT	ND	ND	ND	3	20	0,00025	-6,73
GGTTGGCTT	GPRASP2	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	Hs.348493	10	66	1,3E-11	-6,67
CTTACAAGCA	ND	ND	ND	3	19	0,00045	-6,40
TTTATTTCTA	SCARB2	Scavenger receptor class B- member 2	Hs.349656	6	38	4,6E-07	-6,40
ACATTGGGTG	FABP1	Fatty acid binding protein 1- liver	Hs.380135	8	50	7,3E-09	-6,31
TACTGCTCGG	ND	ND	ND	4	22	0,00028	-5,55
TTTCCTCTCA	SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	2E-07	-5,55
CATTTGTAAT	ND	ND	ND	63	335	6,8E-21	-5,37
AGACCCACAA	ND	ND	ND	29	152	6,8E-21	-5,29
TGTAATCTTA	C6orf70	Chromosome 6 open reading frame 70	Hs.47546	9	47	1,2E-07	-5,27
CTCATAAGGA	SLC25A10	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter)- member 10	Hs.548187	337	1698	6,8E-21	-5,09
GCTAGGCCGG	ND	ND	ND	4	20	0,00084	-5,05
ATTTGAGAAG	RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Hs.521640	69	344	6,8E-21	-5,04

ND: não descrito; NI: não identificado

**Apêndice 2**

## Principais transcritos normoexpressos observados na biblioteca de células epiteliais neoplásicas

Tag	Símbolo	Descrição	N°Unigene	SAGE CC	SAGE CN	P valor	Diferença de expressão
AAAAATTCT	NAPB	N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein- beta	Hs.269471	364	705	6,8E-21	-2
TAAAAA	RPS14	Ribosomal protein S14	Hs.381126	27	51	0,00573	-1,9
ACACAGCAAG	EMID2	EMI domain containing 2	Hs.131603	210	395	1,4E-14	-1,9
GAAGTCGGAA	ND	ND	ND	53	99	0,00014	-1,9
GAGAAACCCC	CNAP1	Chromosome condensation-related SMC-associated protein 1	Hs.5719	17	31	0,04085	-1,8
TGATTTCACT	CPA6	Carboxypeptidase A6	Hs.133085	319	579	6,7E-19	-1,8
CACCTAATTG	NI	Similar to large low complexity protein with proline/alanine-rich repeat	Hs.461412	589	1030	6,8E-21	-1,8
ACGCAGGGAG	MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	Hs.187199	23	38	0,05108	-1,7
GCAAAACCCC	TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily- member 14	Hs.129708	24	39	0,05475	-1,6
GAAAAA	SMAD3	SMAD- mothers against DPP homolog 3 (Drosophila)	Hs.36915	18	29	0,10389	-1,6
GTGAAACCCC	PAFAH2	Platelet-activating factor acetylhydrolase 2- 40kDa	Hs.477083	139	223	6,1E-06	-1,6
GCGAAACCCC	FLJ13448	Hypothetical protein FLJ13448	Hs.288945	20	32	0,09124	-1,6
TACATACACC	ND	ND	ND	17	27	0,12667	-1,6
ACAAAACTA	ELOVL7	ELOVL family member 7- elongation of long chain fatty acids (yeast)	Hs.274256	84	132	0,00083	-1,6
GTAATCCTGC	SLCO5A1	Solute carrier organic anion transporter family- member 5A1	Hs.443609	60	91	0,0098	-1,5
CTAAGACTTC	NI	Transcribed locus- weakly similar to XP_520877.1 PREDICTED: similar to testin [Pan troglodytes]	Hs.550023	501	718	1,5E-10	-1,5
CTCGCGCTGG	CLDN3	Claudin 3	Hs.25640	30	43	0,11969	-1,5
ATTTTCTAAA	AGR2	Anterior gradient 2 homolog (Xenopus laevis)	Hs.530009	18	25	0,2764	-1,4

### Apêndice 3

*continuação*

AAAAATAAAG	ATP5A1	ATP synthase- H+ transporting- mitochondrial F1 complex- alpha subunit- isoform 1- cardiac muscle	Hs.298280	16	22	0,32138	-1,4
AACGAGGAAT	ND	ND	ND	21	28	0,30535	-1,4
TGCACGTTTT	KIAA1068	NudC domain containing 3	Hs.488171	50	66	0,12501	-1,3
CTAACTAGTT	MGC87315	Hypothetical LOC441250	Hs.520917	16	21	0,40027	-1,3
AAAAAAAAAA	ND	ND	ND	71	93	0,0754	-1,3
GGAAACAGA	LGALS4	Lectin- galactoside-binding- soluble- 4 (galectin 4)	Hs.5302	50	65	0,14788	-1,3
GCAGGGCCTC	FXD3	FXD domain containing ion transport regulator 3	Hs.301350	26	33	0,34622	-1,3
CAATAACTG	SUI1	Eukaryotic translation initiation factor 1	Hs.150580	16	19	0,5968	-1,2
GCTTTATTTG	ACTB	Actin- beta	Hs.520640	18	21	0,61351	-1,2
CAATGTGTTA	NDUFA1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex- 1- 7.5kDa	Hs.534168	20	23	0,62796	-1,2
CACTTGCCCT	NDUFB9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex- 9- 22kDa	Hs.541269	16	18	0,71374	-1,1
TAGTTGTCT	TPT1	Tumor protein- translationally-controlled 1	Hs.374596	142	155	0,4017	-1,1
GGAAAAAAAA	ATP5E	ATP synthase- H+ transporting- mitochondrial F1 complex- epsilon subunit	Hs.177530	25	27	0,75614	-1,1
GGGCTGGGGT	SLC35F1	Solute carrier family 35- member F1	Hs.558697	76	81	0,64552	-1,1
ATTATTTTTC	RPL7	Ribosomal protein L7	Hs.421257	19	20	0,84984	-1,1
TGTGCTAAAT	RPL34	Ribosomal protein L34	Hs.558386	23	23	0,97275	0,99
TACCCTAGAA	ELMOD2	ELMO domain containing 2	Hs.450105	22	22	0,97333	0,99
AACTAAAAAA	RPS27A	Ribosomal protein S27a	Hs.311640	21	21	0,97392	0,99
GCCGTGTCCG	RPS6	Ribosomal protein S6	Hs.408073	19	19	0,97515	0,99

**Apêndice 3**

*continuação*

CCTTTGTAAG	JUN	V-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	Hs.525704	18	18	0,97579	0,99
TACCCTAAAA	ATRN	Attractin	Hs.276252	39	38	0,94483	1,02
CTAGCCTCAC	ACTG1	Actin- gamma 1	Hs.514581	15	14	0,87706	1,06
GTGCTGAATG	MYL6	Myosin- light polypeptide 6- alkali- smooth muscle and non-muscle	Hs.505705	15	14	0,87706	1,06
CCCCAGCCAG	RPS3	Ribosomal protein S3	Hs.546286	24	22	0,79711	1,08
CCCGTCCGGA	RPL13	Ribosomal protein L13	Hs.410817	19	17	0,76588	1,11
TGGAATGCTG	NDUFV1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1- 51kDa	Hs.7744	18	16	0,75824	1,11
AAATAAAAGC	VIL2	Villin 2 (ezrin)	Hs.487027	25	22	0,69072	1,13
GCAAAAAAAA	PDXK	Pyridoxal (pyridoxine- vitamin B6) kinase	Hs.284491	30	26	0,62295	1,14
GGCTGGGGGC	PFN1	Profilin 1	Hs.494691	22	19	0,6673	1,15
GCGACGAGGC	RPL38	Ribosomal protein L38	Hs.380953	20	17	0,64906	1,16
GGCAAGCCCC	RPL10A	Ribosomal protein L10a	Hs.546269	38	32	0,50301	1,18
TAAGGAGCTG	RPS26	Ribosomal protein S26	Hs.558391	87	70	0,19681	1,23
GGTGAGACAC	SLC25A6	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator)- member 6	Hs.350927	20	16	0,53107	1,24
TACCTCTGAT	S100P	S100 calcium binding protein P	Hs.2962	19	15	0,51848	1,25
ACTCCAAAAA	TIMELESS	Timeless homolog (Drosophila)	Hs.118631	28	22	0,42128	1,26
GCCGTTCTTA	TRIO	Triple functional domain (PTPRF interacting)	Hs.130031	28	21	0,33972	1,32
TAAGTGAAT	FLJ10826	Hypothetical protein FLJ10826	Hs.231883	16	12	0,47471	1,32
ATTCTCCAGT	RPL23	Ribosomal protein L23	Hs.406300	67	50	0,13035	1,33
GTGACCACGG	ND	ND	ND	51	38	0,18538	1,33

**Apêndice 3**

*continuação*

AGAGGTGTAG	SLCO5A1	Solute carrier organic anion transporter family- member 5A1	Hs.443609	60	44	0,13043	1,35
CCCATCGTCC	NI	Transcribed locus	Hs.563993	886	626	7,6E-11	1,4
TAACCAATCA	RAB5C	RAB5C- member RAS oncogene family	Hs.127764	17	12	0,37614	1,4
GGTCAGTCGG	GBF1	Golgi-specific brefeldin A resistance factor 1	Hs.290243	32	22	0,18911	1,44
GGATTTGGCC	RPLP2	Ribosomal protein- large- P2	Hs.437594	128	87	0,00644	1,46
TTGGCAGCCC	KIAA2002	KIAA2002 protein	Hs.9587	15	10	0,33965	1,49
CTGTACTIONTGT	FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Hs.75678	20	13	0,24092	1,52
GAAGCAGGAC	CFL1	Cofilin 1 (non-muscle)	Hs.170622	97	61	0,00505	1,57
CGCTGGTTCC	RPL11	Ribosomal protein L11	Hs.388664	38	24	0,08372	1,57
GGAATGTACG	ATP5G3	ATP synthase- H+ transporting- mitochondrial F0 complex- subunit c (subunit 9) isoform 3	Hs.429	27	17	0,14407	1,57
GCATTTAAAT	EEF1B2	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Hs.558322	56	35	0,03159	1,58
TAAACTGTTT	ZNF606	Zinc finger protein 606	Hs.287629	16	10	0,25854	1,58
GCATAATAGG	RPL21	Ribosomal protein L21	Hs.381123	106	66	0,0028	1,59
TGTGATCAGA	ATP5L	ATP synthase- H+ transporting- mitochondrial F0 complex- subunit g	Hs.558453	41	25	0,05471	1,62
TAACAGCCAG	NFKBIA	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor- alpha	Hs.81328	18	11	0,21024	1,62
GAAATACAGT	NT5C	5'- 3'-nucleotidase- cytosolic	Hs.67201	43	26	0,0457	1,64
AATATGTGGG	COX6C	Cytochrome c oxidase subunit VIc	Hs.351875	15	9	0,23932	1,65
GTCTGGGGCT	TAGLN2	Transgelin 2	Hs.517168	32	19	0,07612	1,67
TAATGGTAAC	COX5A	Cytochrome c oxidase subunit Va	Hs.401903	27	16	0,1029	1,67
CCTCCAGCTA	KRT8	Keratin 8	Hs.567588	131	77	0,00023	1,68

**Apêndice 3**

*continuação*

TCAGATCTTT	RPS4X	Ribosomal protein S4- X-linked	Hs.446628	115	67	0,00046	1,7
GCGCAGAGGT	NI	CDNA clone IMAGE:6726542	Hs.356799	31	18	0,07016	1,71
ATAATTCTTT	RPS29	Ribosomal protein S29	Hs.156367	204	117	1,7E-06	1,73
CCAGGGGAGA	IFI27	Interferon- alpha-inducible protein 27	Hs.532634	23	13	0,10519	1,75
TTCAGTGTGA	LGALS3	Lectin- galactoside-binding- soluble- 3 (galectin 3)	Hs.531081	87	49	0,00134	1,76
ATTAAGAGGG	ANKHD1	Ankyrin repeat and KH domain containing 1	Hs.434219	16	9	0,17662	1,76
TCAAAAGACC	FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Hs.25647	18	10	0,14321	1,78
TTCAATAAAA	RPLP1	Ribosomal protein- large- P1	Hs.356502	140	77	2,4E-05	1,8
TTGGGGTTTC	FTH1	Ferritin- heavy polypeptide 1	Hs.558804	123	67	6E-05	1,82
TAAAACAAGA	DAF	Decay accelerating factor for complement (CD55- Cromer blood group system)	Hs.527653	15	8	0,15866	1,86
AGTTTGTTAG	TACSTD1	Tumor-associated calcium signal transducer 1	Hs.692	15	8	0,15866	1,86
GCCTGCTGGG	GPX4	Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	Hs.433951	17	9	0,12843	1,87
TAAATAATTT	HSPE1	Heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10)	Hs.558338	17	9	0,12843	1,87
TGGTGTTGAG	RPS18	Ribosomal protein S18	Hs.546290	38	20	0,0203	1,88
CTCAGGAAAT	HSPC051	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 kD)	Hs.284292	19	10	0,10441	1,88
GCCTTCCAAT	DDX5	RNA-binding protein 45 (RBP45)- putative	Hs.279806	44	23	0,01161	1,89
AAGACAGTGG	RPL37A	Ribosomal protein L37a	Hs.433701	73	37	0,00069	1,95
AGGAAAGCTG	RPL36	Ribosomal protein L36	Hs.408018	86	43	0,00018	1,98
GGATATGTGG	EGR1	Early growth response 1	Hs.326035	28	14	0,03419	1,98
ATTGTTTATG	HMG2	High-mobility group nucleosomal binding domain 2	Hs.181163	28	14	0,03419	1,98

**Apêndice 3**

*continuação*

---

GACAAAAAA	TWIST2	Twist homolog 2 (Drosophila)	Hs.422585	16	8	0,11329	1,98
GACCAGAAAA	COX6A1	Cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	Hs.558313	14	7	0,13995	1,98
GAGGGAGTTT	RPL27A	Ribosomal protein L27a	Hs.448646	170	84	8,4E-08	2

---

ND: não descrito; NI: não identificado

**Apêndice 3**

**Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos, pelo SAGE, em células epiteliais neoplásicas do cólon, de acordo com as categorias de processos biológicos a eles relacionadas**

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>Nº Unigene</b>	<b>SAGE CC</b>	<b>SAGE CN</b>	<b>Diferença de expressão</b>
<b>Desenvolvimento da estrutura anatômica</b>					
ANXA2	Annexin A2	Hs.511605	18	3	6
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	11	1	11
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
KRT17	Keratin 17	Hs.2785	24	4	6
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,4
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,3
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	Hs.369574	63	335	-5,3
<b>Comportamento</b>					
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
<b>Adesão celular</b>					
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
SCARB2	Scavenger receptor class B, member 2	Hs.349656	6	38	-6,4

**Apêndice 4**



*continuação*

**Comunicação celular**

ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	Hs.111554	11	1	11
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	11	1	11
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Hs.23582	11	1	11
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
LY6E	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	Hs.521903	18	1	18
CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	Hs.466814	20	1	20
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29	Hs.483238	92	1	92
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	Hs.352642	22	1	22
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
GIPC1	GIPC PDZ domain containing family, member 1	Hs.631639	16	2	8
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	Hs.5662	18	2	9
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
TMEPAI	Transmembrane, prostate androgen induced RNA	Hs.517155	19	3	6,333
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	6
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5

**Apêndice 4**

*continuação*

SAV1	Salvador homolog 1 (Drosophila)	Hs.642842	1	13	-13
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,25
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
TGFA	Transforming growth factor, alpha	Hs.170009	24	256	-10,7
<b>Diferenciação celular</b>					
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
<b>Crescimento celular</b>					
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
<b>Processos fisiológicos celulares</b>					
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	Hs.111554	11	1	11
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	Hs.405590	11	1	11
KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	1	11
PARP12	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	Hs.12646	11	1	11
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Hs.23582	11	1	11
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13

**Apêndice 4**

*continuação*

STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
MF12	Antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	Hs.184727	14	1	14
PDCD6	Programmed cell death 6	Hs.553786	14	1	14
SPINT2	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	Hs.31439	14	1	14
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
PSMB7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	Hs.213470	23	1	23
DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	27	1	27
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	1	59
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
RPS5	Ribosomal protein S5	Hs.378103	26	1	26
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
UQCR	Ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit	Hs.8372	16	2	8
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	Hs.78771	17	2	8,5
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
PSMA7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	Hs.233952	27	2	13,5
LDHA	Lactate dehydrogenase A	Hs.2795	22	3	7,333
PCBP2	Poly(rC) binding protein 2	Hs.546271	25	3	8,333

**Apêndice 4**

*continuação*

RPS20	Ribosomal protein S20	Hs.8102	30	3	10
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Hs.515210	26	4	6,5
RPL18	Ribosomal protein L18	Hs.515517	26	4	6,5
LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24p3)	Hs.204238	47	4	11,75
FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	32	5	6,4
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Hs.546285	32	5	6,4
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2
RPS16	Ribosomal protein S16	Hs.397609	53	5	10,6
TMSB10	Thymosin, beta 10	Hs.446574	35	6	5,833
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	6
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	5,286
RPS12	Ribosomal protein S12	Hs.546289	70	7	10
EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
TUBA3	Tubulin, alpha 3	Hs.645519	89	12	7,417
RPS2	Ribosomal protein S2	Hs.506997	72	13	5,538
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14

**Apêndice 4**

*continuação*

RPL31	Ribosomal protein L31	Hs.469473	75	14	5,357
MT2A	Metallothionein 2A	Hs.534330	1	16	-16
RPL18A	Ribosomal protein L18a	Hs.337766	93	16	5,813
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
PLA1A	Phospholipase A1 member A	Hs.437451	3	50	-16,7
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,25
SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
PYGB	Phosphorylase, glycogen; brain	Hs.368157	4	72	-18
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15
ZFX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
TGFA	Transforming growth factor, alpha	Hs.170009	24	256	-10,7
CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	Hs.369574	63	335	-5,32
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Hs.521640	69	344	-4,99
<b>Apoptose</b>					
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
PDCD6	Programmed cell death 6	Hs.553786	14	1	14
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78

**Apêndice 4**

*continuação*

IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
<b>Resposta de defesa</b>					
LY6E	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	Hs.521903	18	1	18
DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	27	1	27
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	89	1	89
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
<b>Crescimento e desenvolvimento</b>					
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
<b>Desenvolvimento embrionológico</b>					
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
<b>Homeostase</b>					
MF12	Antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	Hs.184727	14	1	14
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49

**Apêndice 4**

*continuação*

FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	32	5	6,4
MT2A	Metallothionein 2A	Hs.534330	1	16	-16
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
<b>Ligação a lipídeos</b>					
MFI2	Antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	Hs.184727	14	1	14
LY6E	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	Hs.521903	18	1	18
CEACAM6	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	Hs.466814	20	1	20
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
ANXA2	Annexin A2	Hs.511605	18	3	6
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,25
<b>Localização</b>					
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
MFI2	Antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	Hs.184727	14	1	14
SPINT2	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	Hs.31439	14	1	14
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
UQCR	Ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit	Hs.8372	16	2	8
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
LCN2	Lipocalin 2 (oncogene 24p3)	Hs.204238	47	4	11,75
FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	32	5	6,4

**Apêndice 4**

*continuação*

TUBA3	Tubulin, alpha 3	Hs.645519	89	12	7,417
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,25
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
<b>Locomoção</b>					
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
SPINT2	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	Hs.31439	14	1	14
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
<b>Metabolismo</b>					
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	Hs.111554	11	1	11
EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	Hs.405590	11	1	11
KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	1	11
PARP12	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	Hs.12646	11	1	11
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
PSMB7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	Hs.213470	23	1	23
DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	27	1	27
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	1	59

**Apêndice 4**



*continuação*

LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78
RPS5	Ribosomal protein S5	Hs.378103	26	1	26
UQCR	Ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit	Hs.8372	16	2	8
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	Hs.78771	17	2	8,5
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
PSMA7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	Hs.233952	27	2	13,5
LDHA	Lactate dehydrogenase A	Hs.2795	22	3	7,333
PCBP2	Poly(rC) binding protein 2	Hs.546271	25	3	8,333
RPS20	Ribosomal protein S20	Hs.8102	30	3	10
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Hs.515210	26	4	6,5
RPL18	Ribosomal protein L18	Hs.515517	26	4	6,5
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Hs.546285	32	5	6,4
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2
RPS16	Ribosomal protein S16	Hs.397609	53	5	10,6
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	6
RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	5,286
RPS12	Ribosomal protein S12	Hs.546289	70	7	10

**Apêndice 4**

*continuação*

EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
TUBA3	Tubulin, alpha 3	Hs.645519	89	12	7,417
RPS2	Ribosomal protein S2	Hs.506997	72	13	5,538
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
RPL31	Ribosomal protein L31	Hs.469473	75	14	5,357
RPL18A	Ribosomal protein L18a	Hs.337766	93	16	5,813
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22
PLA1A	Phospholipase A1 member A	Hs.437451	3	50	-16,7
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,25
PYGB	Phosphorylase, glycogen; brain	Hs.368157	4	72	-18
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Hs.521640	69	344	-4,99

**Regulação negativa de processos biológicos**

KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	1	11
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	1	59
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49

**Apêndice 4**

*continuação*

NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
ZFX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109

**Processos fisiológicos do organismo**

CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	11	1	11
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Hs.23582	11	1	11
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	Hs.352642	22	1	22
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	89	1	89
IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	Hs.374650	21	2	10,5
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	Hs.77961	38	2	19

**Apêndice 4**

*continuação*

ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
IGJ	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	Hs.643431	1	11	-11
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	Hs.510635	7	321	-45,9
<b>Especificação padrão</b>					
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
<b>Resposta fisiológica a estímulos</b>					
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Hs.23582	11	1	11
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	27	1	27
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	Hs.352642	22	1	22
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	89	1	89
IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	Hs.374650	21	2	10,5
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33

**Apêndice 4**

*continuação*

IGJ	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	Hs.643431	1	11	-11
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	Hs.510635	7	321	-45,9
<b>Regulação positiva de processos biológicos</b>					
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
PDCD6	Programmed cell death 6	Hs.553786	14	1	14
GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	Hs.5662	18	2	9
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
<b>Regulação da atividade catalítica</b>					
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	Hs.5662	18	2	9
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
<b>Regulação dos processos celulares</b>					
KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	1	11
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13

**Apêndice 4**

*continuação*

PDCD6	Programmed cell death 6	Hs.553786	14	1	14
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	1	59
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	5,286
EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5

**Apêndice 4**

*continuação*

SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
TGFA	Transforming growth factor, alpha	Hs.170009	24	256	-10,7
<b>Regulação do desenvolvimento</b>					
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
<b>Regulação do crescimento</b>					
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
<b>Regulação dos processos fisiológicos</b>					
KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	1	11
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
PDCD6	Programmed cell death 6	Hs.553786	14	1	14
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	1	59
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33

**Apêndice 4**

*continuação*

S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	5,286
EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,353
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
TGFA	Transforming growth factor, alpha	Hs.170009	24	256	-10,7
<b>Regulação do ciclo de vida viral</b>					
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
<b>Resposta a estímulos bióticos</b>					
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	27	1	27
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78

**Apêndice 4**



*continuação*

IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	Hs.374650	21	2	10,5
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Hs.515210	26	4	6,5
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
<b>Resposta a estímulos químicos</b>					
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
DEFA1	Defensin, alpha 1	Hs.380781	27	1	27
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Hs.515210	26	4	6,5
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
<b>Resposta a estímulos endógenos</b>					
SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Hs.521640	69	344	-4,99
<b>Resposta a estímulos externos</b>					
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	89	1	89
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5

**Apêndice 4**

*continuação*

ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
<b>Resposta ao stress</b>					
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	89	1	89
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,33
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Hs.515210	26	4	6,5
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22
SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Hs.521640	69	344	-4,99
<b>Ciclo infeccioso viral</b>					
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16

**Apêndice 4**



**Distribuição dos transcritos diferencialmente expressos, pelo SAGE, em células epiteliais neoplásicas do cólon, de acordo com as categorias de funções moleculares a eles relacionadas**

<b>Símbolo</b>	<b>Descrição</b>	<b>N° Unigene</b>	<b>CC</b>	<b>CN</b>	<b>Diferença de expressão</b>
<b>Ativação de enzimas</b>					
ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29	Hs.483238	92	1	92
<b>Ativação da transcrição</b>					
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
<b>Atividade helicase</b>					
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
<b>Atividade hidrolase</b>					
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	Hs.111554	11	1	11
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
KLK10	Kallikrein 10	Hs.275464	11	1	11
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
LYZ	Lysozyme (renal amyloidosis)	Hs.645509	78	1	78
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
PLA1A	Phospholipase A1 member A	Hs.437451	3	50	-16,7
PSMA7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	Hs.233952	27	2	13,5
PSMB7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7	Hs.213470	23	1	23
TUBA3	Tubulin, alpha 3	Hs.645519	89	12	7,42
<b>Atividade isomerase</b>					
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	6

**Apêndice 5**

*continuação*

<b>Atividade oxidoreductase</b>						
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22	
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	Hs.272499	59	1	59	
LDHA	Lactate dehydrogenase A	Hs.2795	22	3	7,33	
NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	Hs.50098	33	6	5,5	
UQCR	Ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit	Hs.8372	16	2	8	
<b>Atividade peroxidase</b>						
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22	
<b>Atividade transferase</b>						
CHPT1	Choline phosphotransferase 1	Hs.293077	22	1	22	
CKB	Creatine kinase, brain	Hs.173724	1	19	-19	
F11R	F11 receptor	Hs.517293	27	197	-7,3	
MMAB	Methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type	Hs.12106	1	15	-15	
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10	
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	Hs.78771	17	2	8,5	
PYGB	Phosphorylase, glycogen; brain	Hs.368157	4	72	-18	
PARP12	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	Hs.12646	11	1	11	
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	6	
<b>Cofator de transcrição</b>						
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14	
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2	
<b>Constituinte estrutural do citoesqueleto</b>						
KRT17	Keratin 17	Hs.2785	24	4	6	
<b>Constituinte estrutural dos ribossomos</b>						
RPL18	Ribosomal protein L18	Hs.515517	26	4	6,5	

**Apêndice 5**

*continuação*

RPL18A	Ribosomal protein L18a	Hs.337766	93	16	5,81
RPL31	Ribosomal protein L31	Hs.469473	75	14	5,36
RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	5,29
RPS12	Ribosomal protein S12	Hs.546289	70	7	10
RPS16	Ribosomal protein S16	Hs.397609	53	5	10,6
RPS2	Ribosomal protein S2	Hs.506997	72	13	5,54
RPS20	Ribosomal protein S20	Hs.8102	30	3	10
RPS5	Ribosomal protein S5	Hs.378103	26	1	26
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Hs.546285	32	5	6,4
<b>Fator de tradução, ligação a ácidos nucleicos</b>					
EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	Hs.405590	11	1	11
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
<b>Fator de transcrição</b>					
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15
<b>Fator de transcrição RNA polimerase II</b>					
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
<b>Inibição de enzimas</b>					
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,3
ANXA2	Annexin A2	Hs.511605	18	3	6

**Apêndice 5**

*continuação*

SPINT2	Serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2	Hs.31439	14	1	14
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
<b>Ligação a ácidos nucléicos</b>					
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	Hs.405590	11	1	11
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
PARP12	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	Hs.12646	11	1	11
PCBP2	Poly(rC) binding protein 2	Hs.546271	25	3	8,33
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
RPL18	Ribosomal protein L18	Hs.515517	26	4	6,5
RPL18A	Ribosomal protein L18a	Hs.337766	93	16	5,81
RPL6	Ribosomal protein L6	Hs.528668	37	7	5,29
RPS12	Ribosomal protein S12	Hs.546289	70	7	10
RPS2	Ribosomal protein S2	Hs.506997	72	13	5,54
RPS5	Ribosomal protein S5	Hs.378103	26	1	26
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Hs.546285	32	5	6,4
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15

**Apêndice 5**

*continuação*

<b>Ligação a antígenos</b>						
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	Hs.510635	7	321	-45,9	
IGJ	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	Hs.643431	1	11	-11	
<b>Ligação a carboidratos</b>						
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14	
LGALS1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	Hs.445351	13	1	13	
<b>Ligação a cofator</b>						
PYGB	Phosphorylase, glycogen; brain	Hs.368157	4	72	-18	
<b>Ligação à cromatina</b>						
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14	
<b>Ligação a íons</b>						
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,3	
ANXA2	Annexin A2	Hs.511605	18	3	6	
MFI2	Antigen p97 (melanoma associated) identified by monoclonal antibodies 133.2 and 96.5	Hs.184727	14	1	14	
CAT	Catalase	Hs.502302	1	22	-22	
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14	
FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	32	5	6,4	
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12	
MT2A	Metallothionein 2A	Hs.534330	1	16	-16	
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10	
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5	
PARP12	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12	Hs.12646	11	1	11	
PDCD6	Programmed cell death 6	Hs.553786	14	1	14	
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75	
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5	

**Apêndice 5**



*continuação*

S100A8	S100 calcium binding protein A8	Hs.416073	89	1	89
S100A9	S100 calcium binding protein A9	Hs.112405	33	1	33
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	11	1	11
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
ZNF277	Zinc finger protein 277	Hs.489722	6	90	-15
<b>Ligação a nucleotídeos</b>					
ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	Hs.111554	11	1	11
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	Hs.463456	20	2	10
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	Hs.78771	17	2	8,5
TUBA3	Tubulin, alpha 3	Hs.645519	89	12	7,42
<b>Ligação a proteínas</b>					
ANXA1	Annexin A1	Hs.494173	52	3	17,3
ANXA2	Annexin A2	Hs.511605	18	3	6
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	Hs.436568	142	17	8,35
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
CKLF	Chemokine-like factor	Hs.15159	11	1	11
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3	Hs.191616	1	14	-14
DNAJB1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Hs.515210	26	4	6,5
EIF3S2	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Hs.530096	1	10	-10
EIF3S6	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	Hs.405590	11	1	11
EIF4A2	Eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	Hs.518475	33	5	6,6
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	Hs.352642	22	1	22

**Apêndice 5**

*continuação*

FTL	Ferritin, light polypeptide	Hs.433670	32	5	6,4
GPRASP2	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	Hs.522729	10	66	-6,6
GIPC1	GIPC PDZ domain containing family, member 1	Hs.631639	16	2	8
GNB2L1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	Hs.5662	18	2	9
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
IGHG1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)	Hs.510635	7	321	-45,9
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	Hs.523847	49	1	49
IL8	Interleukin 8	Hs.624	16	1	16
KLK6	Kallikrein 6 (neurosin, zyme)	Hs.79361	28	1	28
KRT17	Keratin 17	Hs.2785	24	4	6
LDHA	Lactate dehydrogenase A	Hs.2795	22	3	7,33
MIF	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	Hs.407995	25	2	12,5
MAL2	Mal, T-cell differentiation protein 2	Hs.201083	27	1	27
NFYC	Nuclear transcription factor Y, gamma	Hs.233458	1	14	-14
PCBP2	Poly(rC) binding protein 2	Hs.546271	25	3	8,33
PBX3	Pre-B-cell leukemia transcription factor 3	Hs.428027	1	14	-14
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2
PTGES3	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	Hs.50425	36	6	6
RPS20	Ribosomal protein S20	Hs.8102	30	3	10
RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	Hs.546285	32	5	6,4
S100A11	S100 calcium binding protein A11	Hs.417004	23	4	5,75
S100A6	S100 calcium binding protein A6	Hs.275243	63	6	10,5
SAV1	Salvador homolog 1 (Drosophila)	Hs.642842	1	13	-13
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	Hs.111779	11	1	11
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1	Hs.525557	20	1	20

**Apêndice 5**

*continuação*

STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13
SPDYA	Speedy homolog A (Drosophila)	Hs.511956	3	52	-17,3
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5
TMSB10	Thymosin, beta 10	Hs.446574	35	6	5,83
TGFA	Transforming growth factor, alpha	Hs.170009	24	256	-10,7
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	Hs.369397	15	1	15
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109
<b>Ligação a vitaminas</b>					
PYGB	Phosphorylase, glycogen; brain	Hs.368157	4	72	-18
<b>Ligação ao DNA simples-fita</b>					
RAD23B	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	Hs.521640	69	344	-4,99
<b>Ligação ao oxigênio</b>					
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
<b>Ligação ao selênio</b>					
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
<b>Ligação padrão</b>					
CCL15	Chemokine (C-C motif) ligand 15	Hs.272493	4	56	-14
<b>Ligação tetrapirrólica</b>					
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12
<b>Recepção</b>					
FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	Hs.352642	22	1	22
HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B	Hs.77961	38	2	19
NR2F6	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 6	Hs.466148	17	2	8,5
SCARB2	Scavenger receptor class B, member 2	Hs.349656	6	38	-6,33
TACSTD2	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Hs.23582	11	1	11

**Apêndice 5**

*continuação*

<b>Receptor de proteínas sinalizadoras</b>						
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	Hs.470943	13	1	13	
<b>Regulação de fosfatases</b>						
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109	
<b>Regulação de quinases</b>						
SFN	Stratifin	Hs.523718	8	44	-5,5	
<b>Regulador de GTPase</b>						
ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29	Hs.483238	92	1	92	
<b>Repressor de transcrição</b>						
PFDN5	Prefoldin subunit 5	Hs.288856	36	5	7,2	
ZFHX1B	Zinc finger homeobox 1b	Hs.34871	1	109	-109	
<b>Transporte de íons</b>						
UQCR	Ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit	Hs.8372	16	2	8	
<b>Transporte de lipídeos</b>						
FABP1	Fatty acid binding protein 1, liver	Hs.380135	8	50	-6,25	
<b>Transporte de oxigênio</b>						
HBB	Hemoglobin, beta	Hs.523443	12	1	12	

**Apêndice 5**

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)