

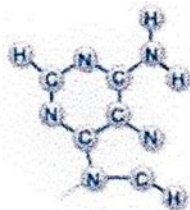
Marcos Roberto Higinio Estécio

**Análise da Metilação do DNA em
Tumores de Cabeça e Pescoço**



1910001164

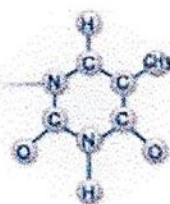




Adenina A

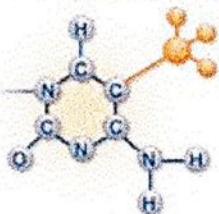
Marcos Roberto Higino Estécio

ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO

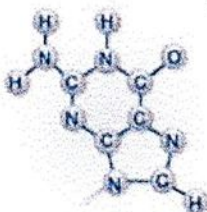


Timina T

Metil-Citosina 5mC

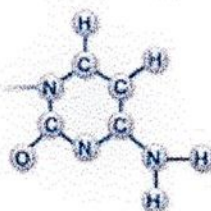


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética.



Guanina G

Citosina C



São José do Rio Preto, São Paulo

2003



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de São José do Rio Preto

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

CEP 15054-000 - Rua Cristóvão Colombo, 2265 - J. Nazareth - PABX - (17) 221.2200

ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

Marcos Roberto Higino Estécio

ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: *Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva*

São José do Rio Preto, São Paulo

2003



t.1.164/03



616.006.6
5586a

40101045

Estécio, Marcos Roberto Higino.

Análise da metilação do DNA em tumores de cabeça e pescoço /

Marcos Roberto Higino Estécio. – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003

106 f. ; 30 cm.

Orientador: Eloiza Helena Tajara da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências.
Letras e Ciências Exatas

1. Câncer. 2. Cabeça - Câncer. 3. Pescoço - Câncer. 4.
Marcadores moleculares. 5. Metilação do DNA. I. Silva,
Eloiza Helena Tajara da. II. Universidade Estadual Paulista.
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III.
Título.

CDU – 616-006.6

MARCOS ROBERTO HIGINO ESTÉCIO

**ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA EM TUMORES
DE CABEÇA E PESCOÇO**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São José do Rio Preto, ____/____/____.



Este trabalho foi realizado no laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual Paulista, campus de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil, e no *Translational Research Laboratory, University of Houston M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA*, com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brasil), processos 99/09368-1 e 00/12361-8.



Para minha mãe, Teresa.

Para minha irmã, Tânia.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

...à Profa. Dra. Eloiza Helena Tajara, minha orientadora no Doutorado, por sua dedicada orientação e seus bons conselhos.

...ao Prof. Dr. Jean-Pierre J. Issa, meu supervisor na *University of Texas M. D. Anderson Cancer Center*, por me abrir suas portas.

...ao Prof. Dr. Emile M. Youssef, companheiro de laboratório na *University of Texas M. D. Anderson Cancer Center*.

...à Profa. Dra. Paula Rahal, uma boa amiga e minha grande referência de profissionalismo.

...aos Profs. Drs. Emmanuel Dias Neto, Sandro R. Valentini, Ana Elizabete Silva e Dorotéia Rossi da Silva Souza, membros da banca examinadora.

...a Alessandra B. Trovó, Flávia Cristina Carvalho Rodrigues e Mariângela Torreglossa Ruiz, minhas queridas amigas.

...a Maria da Graça Cabreira-Hansen e Sérgio Luís Ramos Martins, pelas boas conversas em *Houston*.

...à FAPESP, financiadora deste trabalho.

...a Teresa Higino Estécio e Tânia Cristina Higino Estécio, minha família, meu porto seguro.

...a Deus, por me fazer quem sou.

*“Minha vida é andar por esse país
Pra ver se um dia descanso feliz
Guardando as recordações
Das terras onde passei
Andando pelos sertões
E dos amigos que lá deixei”*

Gonzaguinha



“Às vezes, quando considero as imensas conseqüências que resultam das pequenas coisas – uma palavra casual, um tapa no ombro ou uma moeda na caixa do jornal – sinto-me tentado a pensar... não existem detalhes.”

Ralph Waldo Emerson



SUMÁRIO

	<i>Página</i>
Capítulo I. <i>Alterações Epigenéticas em Câncer</i>	08
OBJETIVOS	32
Capítulo II. <i>Identificação de um Novo Marcador em Tumores de Cabeça e Pescoço Utilizando o Método de PCR Sensível à Metilação</i>	33
Capítulo III. <i>Hipometilação do Elemento Transponível Line-1 em Tumores de Cabeça e Pescoço e de Cólon</i>	71
Capítulo IV. <i>Discussão</i>	87
Capítulo IV. <i>Conclusões</i>	96
Referências Bibliográficas	98
Resumo	103
Abstract	104
Anexo 1	105
Anexo 2	106

Capítulo I

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM CÂNCER

Revisão bibliográfica utilizando os dados identificados em pesquisa no *Current Contents* e no *PubMed* com os termos de pesquisa: “*biomarkers*”, “*cancer*”, “*colon cancer*”, “*chromation organization*”, “*epigenetics*”, “*head and neck cancer*”, “*histone*”, “*lung cancer*”, “*methylation*”, “*tumor supressor gene*”. Somente os artigos publicados em Inglês entre os anos 1992 e 2002 foram selecionados.



1. INTRODUÇÃO

A inativação epigenética de genes relacionados com o controle normal do crescimento celular é um evento freqüente em câncer e é considerada tão importante quanto a inativação por mutação (Esteller *et al.*, 2002). Os mecanismos envolvidos em tal silenciamento resultam da interação entre metilação do DNA, modificação das histonas e de outros componentes ultraestruturais da cromatina.

A repressão transcricional epigenética tem sido demonstrada em uma ampla variedade de tipos tumorais e ocorre em genes de reparo do DNA, supressores de tumor, reguladores do ciclo celular e naqueles envolvidos nos processos de invasão e metástase (Garinis *et al.*, 2002). Para muitos desses genes, tem sido provado que a sua re-expressão em células tumorais pode levar à supressão do crescimento celular ou à alteração da sensibilidade das células neoplásicas a terapias anticâncer. Recentemente, algumas drogas que reverterem a inativação epigenética estão sendo utilizadas em protocolos clínicos para tratamento de pacientes com câncer. Muitos desses compostos são pequenas moléculas, cujas propriedades farmacológicas permitem seu rápido transporte aos tecidos tumorais (Bovenzi e Monparler., 2001). Esse tipo de terapia é fruto da análise das alterações da cromatina, como metilação do DNA e acetilação das histonas, que abriu possibilidades não apenas para o desenvolvimento de drogas, mas também para a definição dos padrões de inativação epigenética e para a identificação de novos marcadores moleculares em câncer.

Nesta revisão, discutiremos os mecanismos de silenciamento gênico causado por eventos epigenéticos, seu papel na tumorigênese e seu potencial como biomarcador na progressão do câncer. Também discutiremos as estratégias na prevenção e na reversão desses eventos e os métodos empregados no estudo da metilação do DNA.



2. DEFININDO SILENCIAMENTO GÊNICO E EPIGENÉTICA

Uma definição simples de silenciamento gênico é a conversão de um alelo ativamente expresso para um estado em que ele não é mais expresso. Nas células de mamíferos, o silenciamento gênico é freqüentemente associado à hipermetilação da região promotora e a uma conformação fechada da cromatina (revisão em Verma e Srivastava, 2002).

A definição de epigenética varia entre os investigadores. Alguns descrevem-na como mudanças mitoticamente herdáveis na expressão gênica que não são causadas por alterações na sequência do DNA (Lengauer e Issa, 1998). Outros atribuem à epigenética a herança de informação baseada na expressão gênica diferencial e, à genética, as informações herdadas por meio da sequência gênica (Jones e Laird, 1999). Entretanto, qualquer que seja a definição usada, a diferença mais importante entre os mecanismos epigenético e genético é o fato dos primeiros levarem a mudanças passíveis de reversão por agentes químicos.

A epigenética tem um papel importante na pesquisa biológica e afeta áreas de estudo bastante diferentes incluindo a biologia do câncer, a latência viral, a atividade de elementos móveis, o *imprinting* genômico, as anormalidades do desenvolvimento, a terapia gênica somática, a clonagem e a tecnologia de transgênicos (revisão em Verma e Srivastava, 2002).

3. REPRESSÃO EPIGENÉTICA TRANSCRICIONAL

Os dois principais mecanismos da regulação epigenética relacionada à expressão gênica são (1) metilação da região promotora dos genes e (2) modificação das histonas causando mudança na estrutura da cromatina.



A metilação do DNA é um processo complexo pelo qual uma DNA metiltransferase (DNMTs) catalisa a adição de um grupo metil do doador universal S-adenosil-L-metionina (SAM) para a posição carbono-5 das citosinas (Figura 1). Essa modificação, que ocorre predominantemente em dinucleotídeos CpG (nucleotídeos citosinas e guanina adjacentes no DNA), é a mais prevalente alteração epigenética no genoma mamífero (Hendrich e Bird, 2000). Atualmente, são conhecidas três DNMTs cataliticamente ativas, DNMT1, 3a e 3b. Cada uma delas aparentemente desempenha um papel distinto e crítico na vida celular (Bestor, 2000).

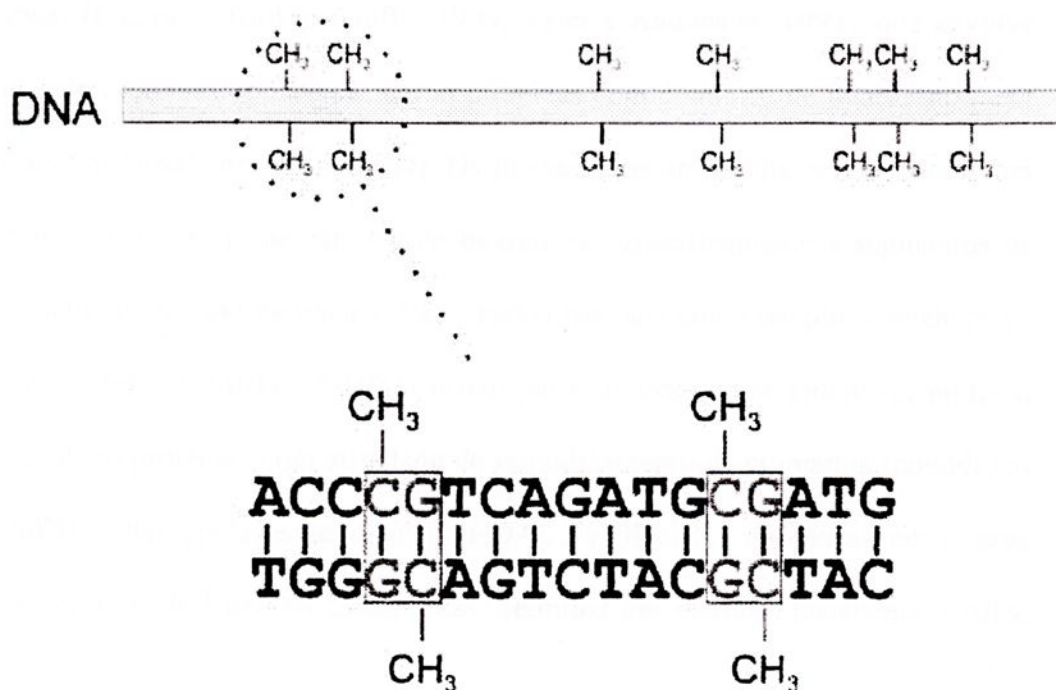
A primeira DNMT identificada foi a DNMT1, que acredita-se ter como função primária a manutenção do padrão de metilação no DNA recém-sintetizado, pois exibe atividade elevada no DNA hemi-metilado em comparação ao não-metilado. As outras duas enzimas, DNMT3a e 3b não mostram preferência por DNA hemi-metilado e, com base na inativação dos genes homólogos em camundongos, parecem atuar principalmente como metiltransferases *de novo*.

A metilação dos dinucleotídeos CpG influencia profundamente muitos processos incluindo a regulação transcricional, a modulação da estrutura da cromatina, a inativação do cromossomo X e o silenciamento de elementos parasitas do DNA (Baylin *et al.*, 2001; Jones e Laird, 1999; Robertson, 2001). Esses processos aparentemente diversos possuem em comum sua atividade na manutenção da integridade genômica e na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento.

Inicialmente, foi sugerido que a metilação de citosinas inibia a ligação de fatores de transcrição ao DNA, levando à supressão da expressão gênica. Realmente, diversos fatores de transcrição importantes são sensíveis à metilação de CpGs em seus sítios de reconhecimento (Tate e Bird, 1993). Entretanto, nos últimos anos, foi proposto um



A



B

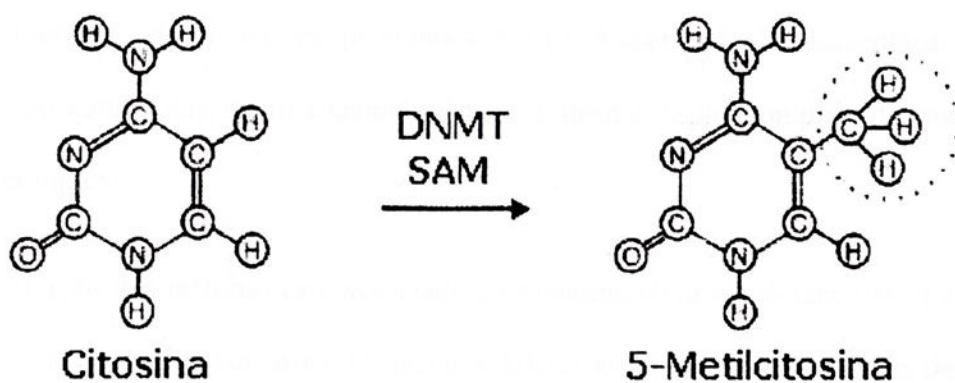


Figura 1. (A) O genoma humano possui grupamentos metil (CH_3), que ocorrem quase exclusivamente nos resíduos de citosina presentes em dinucleotídeos CpG. (B) A adição pós-duplicação dos grupamentos metil às citosinas é catalizada pela enzima DNA metiltransferase (DNMT) que utiliza S-adenosil-L-metionina (SAM) como substrato (adaptado de Worm e Guldberg, 2002).

mecanismo mais geral pelo qual a metilação do DNA pode levar à repressão transcricional (Figura 2; Bird e Wolffe, 1999; Tyler e Kadonaga, 1999), que envolve uma família de proteínas conhecidas como proteínas com domínios de ligação ao metil (*methyl-binding domain proteins*, MBD). Os membros dessa família compartilham um MBD comum, o que as torna capazes de ligarem-se especificamente a segmentos de DNA contendo sítios CpG metilados. Pelo menos três dos cinco membros conhecidos dessa família (MeCP2, MBD2, MBD3) fazem parte de um grande complexo protéico contendo também proteínas com atividade de remodelamento da cromatina (complexos Sin3a e NuRD) e desacetilases de histonas (HDAC1 e HDAC2), que restauram a carga positiva de resíduos de lisina na cauda amino-terminal das histonas (Jenuwein e Allis, 2001).

A conformação da cromatina é controlada, em grande parte, por modificações nos resíduos de lisina das histonas. Tais modificações incluem acetilação/desacetilação e metilação/desmetilação das lisinas nas posições 4, 9 e 14. A acetilação, a desacetilação e a metilação são catalisadas enzimaticamente, mas a desmetilação compreende um processo mais complexo.

Em geral, a acetilação das histonas está associada à cromatina ativa e a desacetilação a uma estrutura condensada da cromatina. O fato das MBDs atraírem as desacetilases de histonas aparentemente explica a relação entre metilação do DNA e repressão gênica (Bird e Wolffe, 1999; Wade, 2001). Acredita-se que esse fenômeno, juntamente com a atuação das demais proteínas com atividade de remodelamento da cromatina, resulta na formação de cromatina compactada resistente à transcrição (Bird e Wolffe, 1999; Tyler e Kadonaga, 1999).

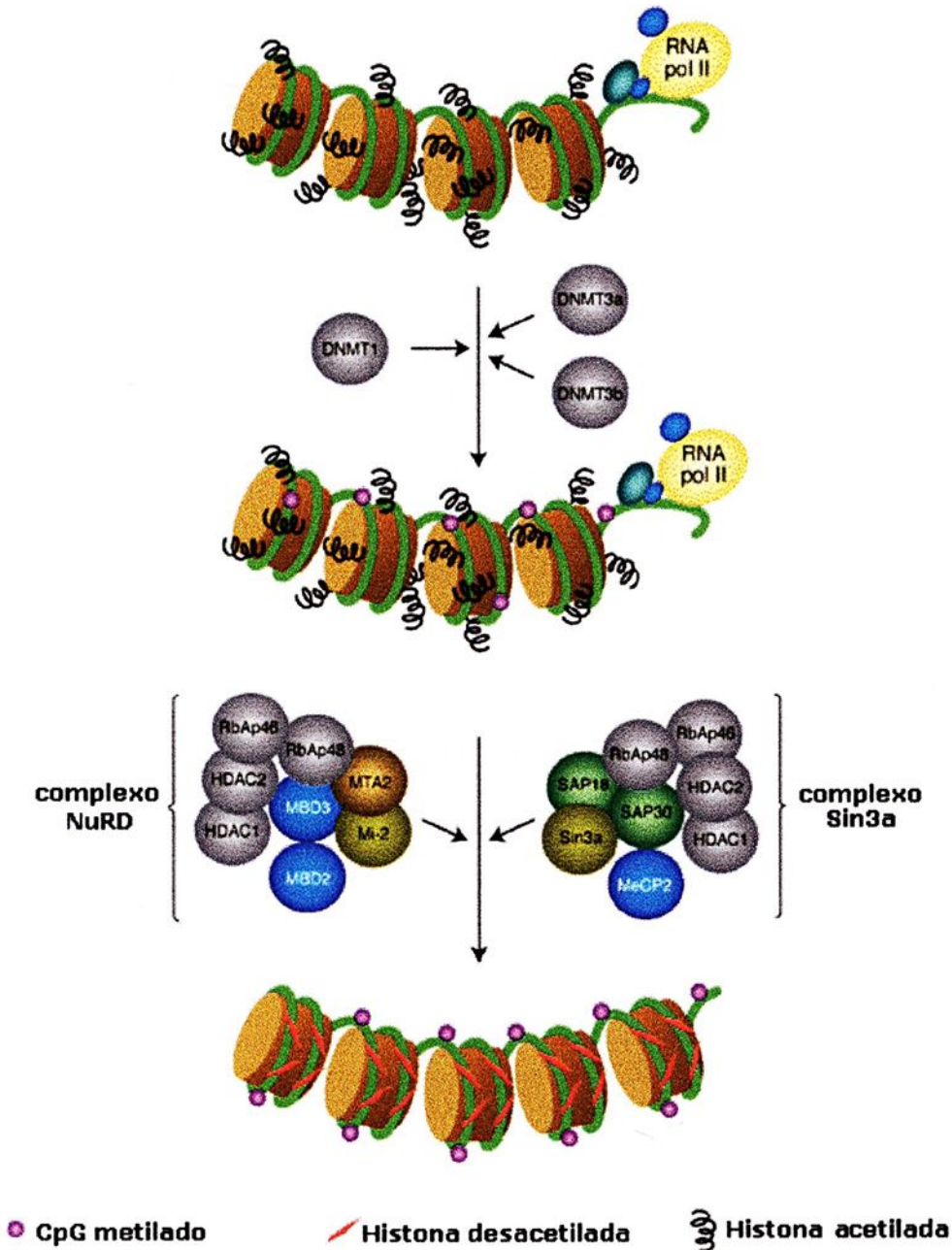


Figura 2. Modelo do silenciamento gênico dependente da metilação do DNA. O elemento estrutural da cromatina é o core nucleossômico, que consiste de uma sequência de DNA com 146 pares de base empacotada em torno de um grupo de histonas. A acetilação das histonas causa uma configuração aberta da cromatina, que está associada a atividade transcricional. As citosinas metiladas são reconhecidas por proteínas com domínios de ligação ao metil (MBDs) que, por sua vez, recrutam as desacetilases de histonas (HDACs) para o sítio metilado, convertendo a cromatina em uma estrutura fechada não acessível à maquinaria transcricional (adaptado de Brown e Strathdee, 2002).

Recentemente, tem sido também proposto que a metilação do DNA pode levar ao silenciamento gênico em virtude das proteínas MBDs recrutarem metilases de histonas (HMTs). A repressão gênica ocorreria pela metilação de resíduos de lisina 9 das histonas H3 e do subsequente recrutamento do silenciador de cromatina HP1, uma família de moléculas ligantes à heterocromatina implicadas tanto no silenciamento gênico quanto na estrutura supra-nucleossomal da cromatina (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). Embora essas observações argumentem em favor da metilação do DNA como um sinal chave levando a modificações de histonas, remodelação da cromatina e silenciamento gênico, essa sinalização também pode operar no sentido oposto. Por exemplo, a interrupção da metilação das histonas em *Neurospora crassa* resulta na eliminação de metilação do DNA (Tamaru e Selker, 2001). Essa interrupção pode ser induzida por mutações no gene *dim-5*, que codifica uma proteína homóloga à proteína associada à cromatina, Suv39h, encontrada em células de mamíferos. Da mesma forma, o aumento na acetilação das histonas em células tratadas com inibidores de HDAC também parece levar à desmetilação do DNA (Cervoni e Szyf, 2001).

Outra conexão entre metilação do DNA e modificação de histonas tem sido estabelecida por achados sobre a associação da DNMT1 com HDAC1 em um complexo contendo o produto do gene supressor de tumor retinoblastoma (*RBI*) e o fator de transcrição E2F. Tem sido sugerido que a perda da função da proteína pRb, um evento freqüente em diversos tipos tumorais, resulta na desregulação desse complexo, na localização inapropriada da DNMT1 e na produção de padrões aberrantes de metilação. Uma importante implicação desse modelo é que, se mudanças nas histonas influenciam a metilação do DNA, então é possível que a metilação de genes observada em tumores seja mais o resultado de silenciamento transcricional dependente de modificações das



histonas ou de remodelamento da cromatina do que da atividade das DNMTs *per se*. A relação entre metilação de histonas e expressão gênica é ainda controversa e possivelmente mais complexa dado que a metilação da lisina 4 está associada a um estado ativo da cromatina enquanto a metilação da lisina 9 está associada a um estado inativo (Jenuwein e Allis, 2001).

O termo “código de histonas” (Jenuwein e Allis, 2001) tem sido usado para descrever as várias possibilidades combinatórias das modificações das histonas. Uma vez que diferentes combinações podem existir, é possível que o nível de expressão gênica para um determinado alelo varie de muito alto até não detectável. É também possível que modificações específicas de histonas próximas ao promotor de um dado alelo determinem a probabilidade de ligação do promotor a fatores de transcrição, bem como a extensão e a duração dessa interação.

Um importante componente para o processo de silenciamento gênico é o evento iniciador, que ainda não foi definido (Baylin e Herman, 2000). Muitos estudos mostram que os promotores metilados são inativados de modo estável e não exibem expressão em níveis detectáveis. Esse fato deve ser presumivelmente decorrente da ligação de proteínas a sítios CpG metilados e à atração de complexos de repressão (Bird e Wolfé, 1999; Rountree *et al.*, 2001; Wade, 2001) que, por sua vez, devem dificultar a ligação dos fatores de transcrição ao DNA. Se a metilação do DNA inicia o silenciamento gênico em células de mamíferos por recrutar complexos repressores, esse processo deve ser rápido e relativamente estável, uma vez ocorrido. Entretanto, em material tumoral (Melki *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2001) e em células cultivadas (Wong *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2000), a presença de alelos silenciados com um padrão variegado de metilação sugere que o silenciamento é um processo gradual e tardio na tumorigênese.

4. METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

A metilação não está distribuída aleatoriamente no genoma. Ao contrário, regiões discretas, incluindo a maioria dos elementos repetitivos e parasitas do DNA, são hipermetilados, enquanto outras regiões são hipometiladas. Muitos dinucleotídeos CpGs foram eliminados do genoma eucarioto ao longo da evolução por desaminação espontânea, sendo então convertidos em TpGs (Yoder *et al.*, 1997). Muitos sítios CpGs remanescentes apresentam uma alta frequência de metilação, facilitando mudanças na estrutura da cromatina que bloqueiam a expressão de determinados genes por dificultar o acesso da maquinaria celular de transcrição ao promotor. Entretanto, existem no genoma seqüências curtas de DNA ricas em CpGs, conhecidas como ilhas CpG, que não exibem metilação e estão geralmente localizadas nos promotores de genes essenciais para a função celular. A ausência de metilação na região promotora pode ser um pré-requisito para a atividade transcricional desses genes. Somente duas exceções a essa regra foram descritas: as ilhas CpG completamente metiladas do alelo silencioso no caso de genes que sofrem *imprinting* e aquelas em genes do cromossomo X inativo nas fêmeas de mamíferos.

O padrão de metilação do DNA muda dramaticamente durante o desenvolvimento embrionário. Uma onda de desmetilação generalizada ocorre na fertilização e é seguida por ondas de metilação *de novo* durante a implantação do embrião. Entretanto, nem todas as seqüências do genoma são desmetiladas no momento da fertilização e também nem todas são metiladas *de novo* após a implantação. Tais exceções enfatizam a especificidade regional do padrão de metilação do DNA (Reik *et al.*, 2001). Como evidência da importância crucial de tal padrão, podem ser citadas as mutações em genes envolvidos no controle da metilação do DNA, que resultam nas síndromes de Rett, da imunodeficiência do tipo ICF (*immunodeficiency, centromere*

instability and facial anomalies) e da alfa talassemia ATRX (*alpha-thalassemia/mental retardation*) (Robertson e Wolffe, 2000).

A disrupção do padrão normal de metilação é um dos achados mais comuns em células transformadas e vários estudos têm revelado que tais alterações são eventos precoces no processo tumorigênico e contribuem diretamente para a transformação maligna. Nas células tumorais, a regulação normal da maquinaria de metilação do DNA está severamente comprometida (Figura 3), de tal forma que a especificidade regional dos padrões de metilação é revertido, resultando em metilação *de novo* das ilhas CpG e hipometilação do DNA repetitivo (Baylin *et al.*, 2001; Jones e Laird, 1999; Robertson, 2001).

Em diferentes tipos de câncer, já foram identificados muitos genes mostrando alterações epigenéticas (Tabela 1). Entre eles estão genes envolvidos na regulação da divisão, na diferenciação e na proliferação celular (Tabela 2). Muitos são supressores de tumor cujos promotores apresentam-se hipermetilados nas células tumorais mas estão desmetilados nas células normais. Alguns exemplos de genes com padrões epigenéticos aberrantes são *RASSF1*, *RARβ2*, *DAPK*, *p16^{INK4a}*, *p15^{INK4b}*, *MGMT* e *GSTP1* no câncer de pulmão, *p16^{INK4a}*, *CALCA*, *MGMT* e *TIMP3* no câncer de esôfago, *p14* na colite ulcerativa, *GSTP1* no câncer de próstata e *HIC1* e *TP53* no câncer de mama (revisão em Esteller e Herman, 2002).

Ao contrário do que ocorre com os genes supressores de tumor, os protooncogenes exibem um nível baixo de metilação em células tumorais. Por exemplo, a hipometilação dos genes *Raf*, *c-Myc*, *c-Fos*, *c-H-Ras* e *c-K-Ras* foi descrita em câncer de fígado em animais modelo (revisão em Verma e Srivastava, 2002). Outros exemplos incluem a hipometilação do gene *RAS* em cânceres humanos (Fang *et al.*, 1996) e a



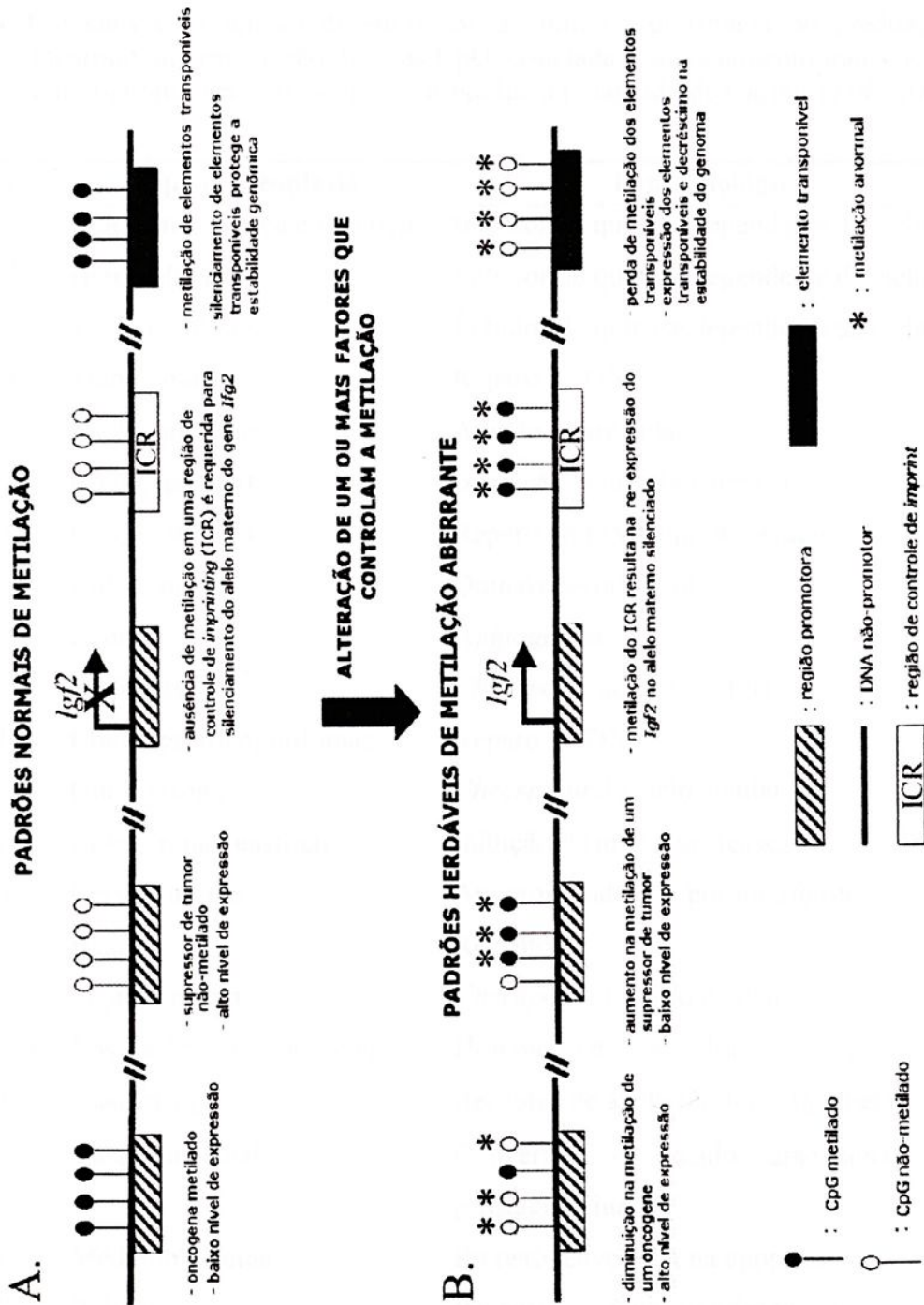


Figura 3. Representação do padrão normal de metilação (A) e de quatro possíveis alterações nesse padrão envolvidas na tumorigênese: (B) decréscimo de metilação na região promotora de um oncogene levando ao aumento de sua expressão; aumento de metilação na região promotora de um gene supressor de tumor resultando na sua inativação; perda de metilação de um alelo que sofre *imprinting* resultando na sua re-expressão; decréscimo de metilação de elementos transponíveis que contribuem para a instabilidade genética (adaptado de Goodman e Watson, 2002).

Tabela 1. Genes com função de supressor de tumor, confirmada ou predita, que mostram hipermetilação de ilhas CpG associada a silenciamento transcricional em diferentes tipos de neoplasia esporádica (adaptado de Garinis *et al.*, 2002).

Gene	Tipo de neoplasia	Papel biológico
<i>p14^{ARF}</i>	Colorretal, cabeça e pescoço	Inibidor de quinase dependente de ciclina
<i>p15^{INK4b}</i>	Hematológica	Inibidor de quinase dependente de ciclina
<i>p16^{INK4a}</i>	Tecidos sólidos	Inibidor de quinase dependente de ciclina
<i>BRCA-1</i>	Mama, ovário	Reparo de DNA
<i>CDH1</i>	Mama, gástrico	Adesão intercelular
<i>APC</i>	Cólon, gástrico	Interação com beta-catenina
<i>hMLH1</i>	Cólon, gástrico	Reparo do DNA tipo <i>mismatch</i>
<i>STK11</i>	Cólon, mama	Quinase serina-treonina
<i>VHL</i>	Renal	Angiogênese
<i>p73</i>	Linfomas	<i>Checkpoint</i> do ciclo celular
<i>MGMT</i>	Cólon, gástrico, linfomas	Reparo do DNA
<i>RB1</i>	Glioblastoma	<i>Checkpoint</i> do ciclo celular
<i>TIMP3</i>	Cólon, renal, gástrico	Inibição de metaloproteases
<i>DAPK1</i>	Cervix uterino	Apoptose induzida por interferon
<i>ESR1</i>	Bexiga	Receptor
<i>TP53</i>	Fígado, mama	<i>Checkpoint</i> do ciclo celular
<i>RASSF1A</i>	Nasofaringe, ovário, renal	Homólogo do efetor Ras
<i>RARβ2</i>	Nasofaringe	Receptor de ácido retinóico tipo beta
<i>COX2</i>	Gastrointestinal	Conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas
<i>CASP8</i>	Meduloblastoma	Protease envolvida na apoptose
<i>HTR1B</i>	Pulmão	Receptor de 5-hidroxitriptamina
<i>EDN1</i>	Pulmão	Potente vasoconstritor

Tabela 2. Genes frequentemente hipermetilados e epigeneticamente silenciados em tumores humanos, classificados de acordo com sua função biológica (adaptado de Esteller e Herman, 2002).

Papel biológico	Gene
Ciclo celular	<i>RB1</i>
	<i>p16^{INK4a}</i>
	<i>p15^{INK4b}</i>
	<i>14-3-3sigma</i>
	<i>p14^{Arf}</i>
Transdução de sinal	<i>RASSF1A</i>
	<i>LKB STK11</i>
	<i>APC</i>
Apoptose	<i>DAPK</i>
	<i>CASP8</i>
Reparo do DNA	<i>MGMT</i>
	<i>MLH1</i>
	<i>BRCA1</i>
Metabolismo de carcinógenos	<i>GSTP1</i>
Resposta hormonal	<i>ESR1</i>
	<i>RARβ2</i>
Senescência	<i>TERT</i>
	<i>TERC</i>
Invasão e metastase	<i>TIMP-3</i>
	<i>CDH1</i>
	<i>VHL</i>

correlação inversa entre metilação e grau de expressão do gene *BCL-2* em leucemia linfocítica aguda de células B (Hanada *et al.*, 1993).

5. GENES EPIGENETICAMENTE REGULADOS EM CÂNCER

As alterações epigenéticas têm sido descritas em vários tipos de câncer, mas nem todas têm sido bem caracterizadas como biomarcadores do processo maligno. A seguir serão citados alguns exemplos observados em tumores de cabeça e pescoço e de pulmão, em função da semelhança dos fatores etiológicos dessas doenças. As alterações descritas em câncer colorretal serão primeiramente apresentadas em vista do excelente modelo que essa neoplasia representa.

5.1. Câncer Colorretal

O câncer colorretal é um excelente modelo para o estudo da carcinogênese pois apresenta alterações genéticas bastante distintas em cada um dos seus estágios. Os estudos do seu padrão epigenético também têm fornecido informações adicionais sobre a patogênese da doença (Neibergs *et al.*, 2002). A metilação progressiva do DNA e o subsequente silenciamento de genes específicos ocorrem ao longo do processo maligno e são especialmente importantes em um subconjunto de tumores colorretais com fenótipo *CpG island methylator* (CIMP). Os casos CIMP-positivos incluem a maioria dos tumores com deficiência esporádica de reparo do tipo *mismatch* causada por hipermetilação do promotor do gene *hMLH1* e também aqueles com mutações do gene *Ki-RAS* (Issa, 2000). Nesse grupo, tanto as alterações epigenéticas como genéticas são importantes para a progressão da neoplasia. Os tumores CIMP-negativos, por sua vez, evoluem com um padrão clássico de instabilidade genética, com altas taxas de mutação no gene *TP53* e de rearranjos cromossômicos. Existem evidências de que esses tumores,



em função de sua instabilidade, podem ter um prognóstico pior que os CIMP-positivos (Issa, 2000). Esses últimos parecem ser especialmente sensíveis à terapia e podem ser bons candidatos à quimioterapia por inibição da metilação.

5.2. Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é uma das causas de morte por câncer mais comum nos Estados Unidos e mata mais de 156.000 pessoas por ano. Um progresso significativo foi obtido nos últimos 20 anos sobre a patogênese celular e molecular dessa doença graças aos estudos de alterações genéticas e epigenéticas em oncogenes e genes supressores de tumor, do papel da angiogênese no seu desenvolvimento e do perfil molecular de lesões pré-invasivas do trato respiratório.

Virmani e colaboradores (2002) desenvolveram um painel de marcadores de metilação aberrante que detecta o câncer de pulmão em estágios precoces. Tal painel inclui os genes *RARβ2*, *DAPK*, *GSTP1*, *FHIT*, *RASSF1*, *MGMT*, *CDH1*, *APC* e *p16^{INK4a}*. Esses pesquisadores observaram que o gene *RARβ2* e o supressor de tumor *RASSF1A*, localizados respectivamente nas regiões cromossômicas 3p24 e 3p21.3, estão freqüentemente deletados nos casos precoces e, no subtipo classificado como de pequenas células, esses genes e o *APC* estão hipermetilados.

5.3. Câncer de Cabeça e Pescoço

Os tumores de cabeça e pescoço são responsáveis por cerca de 2-3% dos casos novos de câncer diagnosticados nos Estados Unidos. O tipo histológico mais freqüente é o carcinoma de células escamosas (HNSCC), presente em mais de 90% dos casos (Casiglia e Woo, 2001; Reichart, 2001). A busca de marcadores moleculares para esse grupo é bastante desejada, dado que o aumento na taxa de sobrevivência dos pacientes

depende muito da detecção precoce da lesão. Um padrão aberrante de metilação é freqüentemente observado e pode ser explorado tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico da doença. Entre os genes comumente hipermetilados estão o *p16^{INK4a}*, o *DAPK*, o *CDH1*, o *RASSF1A* e o *RARβ2* (Rosas *et al.*, 2001; Hasegawa *et al.*, 2002; Kwong *et al.*, 2002). A semelhança desses tumores com os de pulmão em relação ao padrão de metilação pode ser explicada pelos fatores etiológicos comuns, que incluem o consumo de fumo.

A recorrência de HNSCC parece ser mais freqüente quando há inativação do gene *p16^{INK4a}* (Kresty *et al.*, 2002) enquanto a invasão óssea está associada à hipermetilação do gene *DCC* (Ogi *et al.*, 2002). Tais resultados abrem a possibilidade de utilização de painéis de genes hipermetilados para a determinação do prognóstico desses pacientes.

6. POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

As alterações epigenéticas podem ser empregadas como marcadores no monitoramento da gênese e da progressão do câncer e constituem alvos terapêuticos potenciais em função de sua reversibilidade (Figura 4).

Tratamentos com inibidores da metilação do DNA restauram a atividade de genes silenciados e diminuem a taxa de crescimento de células tumorais de modo herdável. Por exemplo, a capacidade das células em reparar o DNA danificado pode ser restaurada pela ativação do gene *hMLH1*. A reversão parcial do fenótipo tumoral pelo uso de inibidores da metilação é, portanto, possível (Brown e Strathdee, 2002; Christman, 2002; Worm e Guldberg, 2002). Alguns experimentos já realizados com camundongos *Min* também têm sugerido que esse tratamento suprime o desenvolvimento tumoral e pode ser aplicado como uma estratégia de prevenção.

Os análogos da citosina, como a 5-aza-2'-desoxicitidina, estão sendo utilizados no tratamento de síndromes pré-neoplásicas em protocolos clínicos. Os mecanismos envolvidos, entretanto, ainda não estão completamente elucidados. As doses de 5-aza-2'-desoxicitidina atualmente utilizadas são tóxicas, possivelmente devido a efeitos não diretamente relacionados com suas atividades desmetilantes. Observações recentes referem que o uso de doses baixas de 5-aza-2'-desoxicitidina parece facilitar a reativação de genes hipermetilados e sua administração associada a inibidores de desacetilases de histonas tem despertado grande interesse (Bovenzi e Monparler, 2001). Alguns protocolos também têm empregado oligonucleotídeos antissense para DNA metiltransferases e seus resultados mostram decréscimo na carcinogênese (Reid *et al.*, 2002).

Embora esses estudos sejam promissores, a relação definitiva entre eficiência de tratamento e desmetilação de genes-alvo ainda não foi estabelecida. Os dados disponíveis indicam que a cooperação entre diferentes mecanismos de regulação epigenética (metilação do DNA, metilação e acetilação de histonas, remodelamento da cromatina) é essencial para o controle apropriado da transcrição gênica. Os diferentes níveis epigenéticos envolvidos nessa complexa cooperação indicam que as estratégias de desenvolvimento de drogas devem considerar ambos os eventos, metilação do DNA e modificação das histonas. Realmente, até o presente, inibidores de DNMT, tal como a 5-aza-2'-desoxicitidina, são aparentemente os compostos mais ativos para induzir a expressão de genes silenciados epigeneticamente em células tumorais modelos. Entretanto, inibidores das HDAC podem aumentar os níveis de expressão gênica e existem evidências de que trabalham junto com inibidores de DNMT nesse processo (Cameron *et al.* 1999).



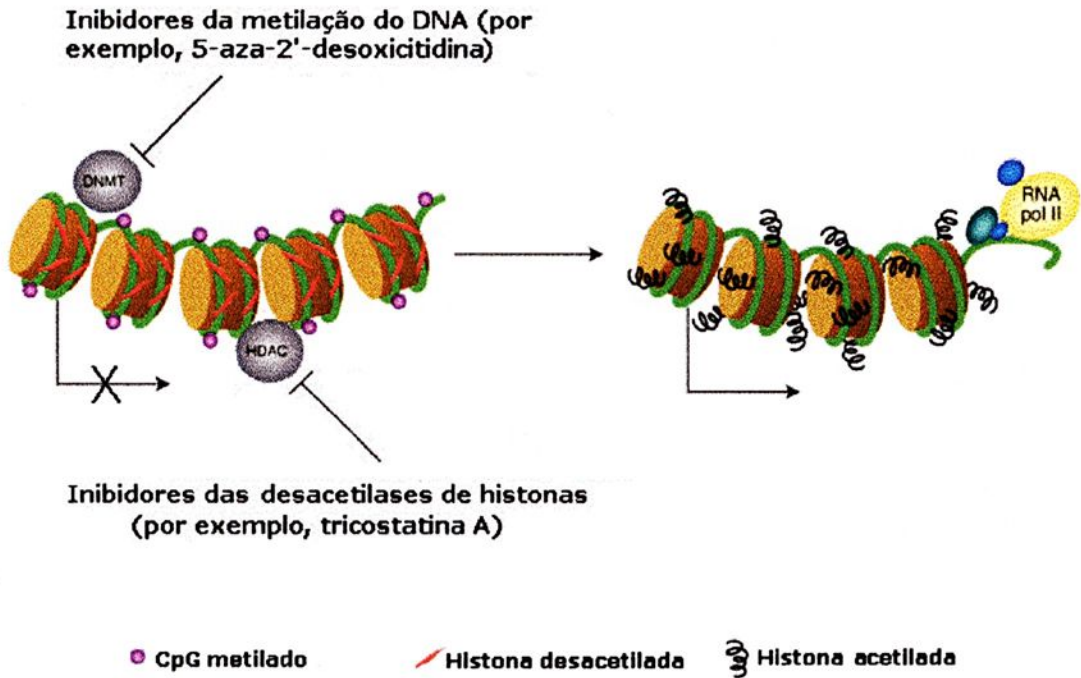


Figura 4. O estado transcricionalmente repressivo da cromatina mediado por metilação do promotor gênico pode ser revertido pela ação de inibidores da metilação do DNA ou das desacetilases de histonas. Análogos da citosina, como a 5-aza-2'-desoxicitidina, são incorporados ao DNA e atuam como inibidores covalentes das DNA metiltransferases (DNMT). A inibição das desacetilases de histonas (HDAC) favorece a acetilação das histonas. Como resultado, a cromatina retorna ao estado descondensado e a transcrição é restaurada (adaptado de Brown e Strathdee, 2002).

7. MÉTODOS DE DETECÇÃO DA METILAÇÃO DO DNA

A detecção de citosinas metiladas no DNA não é simples pois a assinatura de metilação é perdida durante os procedimentos usuais de amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O método de *Southern* utilizando DNA digerido com enzimas de restrição sensíveis à metilação foi uma ferramenta bastante importante há alguns anos, mas tem sido substituído por métodos de PCR que exploram o tratamento prévio do DNA com bissulfito de sódio (Figura 5). Esse composto provoca a desaminação hidrolítica das citosinas não metiladas levando à sua substituição por uracila e, posteriormente, por timina, mas não afeta as citosinas metiladas, que são resistentes à sulfonação (Clark *et al.*, 1994). Dessa forma, o DNA tratado por bissulfito pode ser usado como molde em reações de PCR utilizando iniciadores específicos para o gene de interesse e o seqüenciamento dos produtos resultar em um mapeamento acurado das citosinas metiladas. Como esse procedimento não é tecnicamente simples, outras abordagens têm sido desenvolvidas para estudo da metilação. Entre essas destacam-se as técnicas de PCR metilação-específica (*MSP - methylation-specific PCR*) e de *COBRA (COmbined Bisulfite Restriction Analysis)*, descritas respectivamente por Herman *et al.* (1996) e Xiong e Laird (1997). Ambos podem ser aplicados na análise de amostras clínicas, pois não exigem grandes quantidades de DNA para serem realizados, ao contrário do método de *Southern*.

O método mais comumente empregado é o *MSP*, que utiliza iniciadores específicos para o DNA modificado por bissulfito, desenhados de tal modo que discriminam o alelo metilado e o não-metilado de um mesmo gene. São realizadas duas reações de PCR, uma com iniciadores específicos para o estado metilado e outra com iniciadores para o estado não-metilado. A presença ou ausência de produto indica o

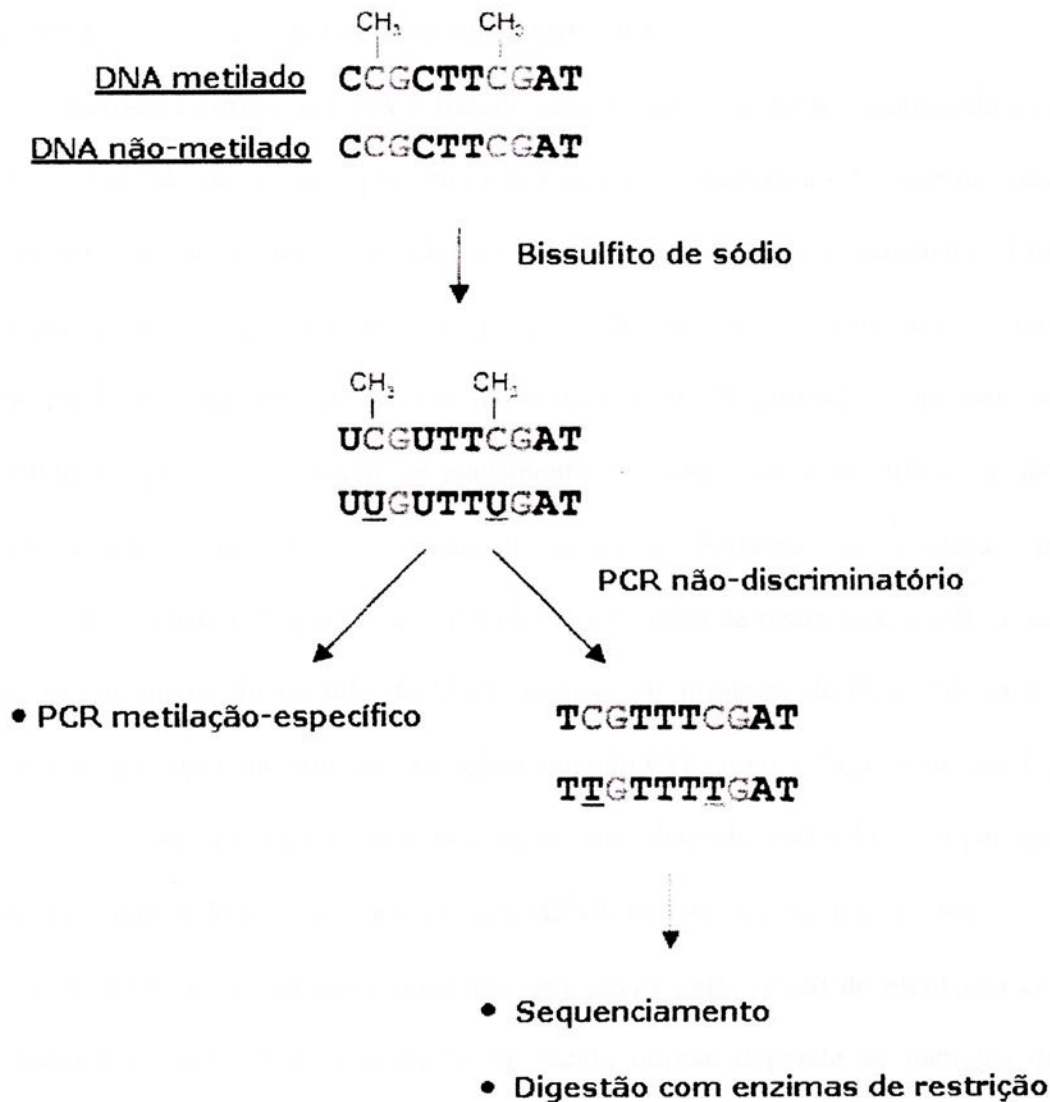


Figura 5. Métodos utilizando PCR para a detecção de citosinas metiladas. Anteriormente ao PCR, o DNA é tratado com bissulfito de sódio, o que resulta na conversão das citosinas não-metiladas em uracila. Esse DNA pode ser amplificado e sequenciado ou utilizado em PCR metilação-específica (MSP) e em reações de digestão com enzimas de restrição (método COBRA) (Adaptado de Worm e Guldberg, 2002).

estado de metilação do DNA molde. Esse método é extremamente sensível ($<0,1\%$) mas não permite a determinação da fração de alelos metilados.

No método *COBRA*, o DNA é tratado com bissulfito e então amplificado por PCR. A combinação desses dois procedimentos resulta na conversão de citosinas não metiladas em timinas e na conversão de citosinas metiladas em citosinas. Tais substituições podem levar à manutenção ou à perda de sítios de restrição para enzimas como a *TaqI* (TCGA). Os iniciadores da reação de PCR utilizados não contêm dinucleotídeos CpG na sua região de anelamento de modo que a amplificação não discrimina DNA molde pelo seu estado de metilação. Portanto, na população de produtos amplificados, as frações que retêm ou perdem sítios de restrição são reflexo da porcentagem de metilação no sítio do DNA original. Os produtos de PCR são, então, digeridos por enzimas com sítios de restrição contendo CG, como a *TaqI*, e submetidos a eletroforese. A relação entre a quantidade de produto digerido e não-digerido permite a análise quantitativa do estado de metilação do DNA alvo na amostra investigada.

A identificação de novos fragmentos genômicos cujo estado de metilação em tecido tumoral é diferente do observado em tecido normal depende de métodos de rastreamento não-direcionais, como é o MS/AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR*). Esse método foi desenvolvido por Gonzalgo et al. (1997) e explora a presença de seqüências de reconhecimento pela enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* internamente aos fragmentos gerados em PCR com iniciadores aleatórios (Figura 6). As bandas diferencialmente metiladas são então isoladas do gel de eletroforese, clonadas e seqüenciadas, permitindo a identificação desses fragmentos por comparação com as seqüências depositadas em bancos de dados do genoma.

MS/AP-PCR

CpG metilado



CpG não-metilado

Enzima de restrição *Hpa*IIPCR com iniciadores
arbitrários

Eletroforese

T

N

sem diferença →

hipermetilação →

hipometilação →

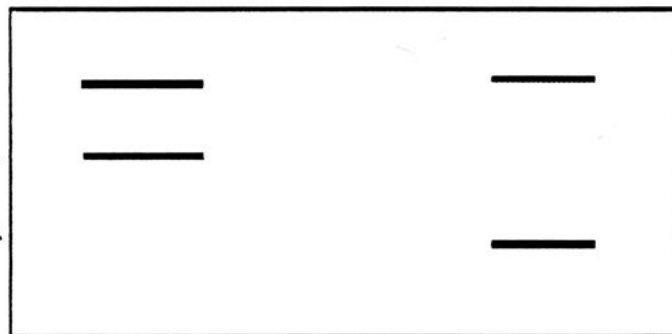


Figura 6. Esquema das etapas do MS/AP-PCR (*Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR*). A digestão do DNA com uma enzima de restrição sensível à metilação, por exemplo a *Hpa*II, impossibilita a amplificação de DNA hipometilado em uma reação de PCR com iniciadores aleatórios quando ocorre presença do sítio de reconhecimento da enzima internamente ao fragmento de amplificação possível. (Adaptado Gonzalgo et al., 2002).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A definição de como a hipermetilação das regiões promotoras participa do silenciamento gênico e como a perda de metilação altera a estrutura cromossômica é um objetivo de difícil alcance. Apesar disso, as evidências sobre a metilação aberrante do DNA em câncer têm tido aplicação clínica. Por exemplo, as mudanças na metilação de diferentes regiões promotoras fornecem um sinal positivo da presença de células tumorais. Nos próximos anos, após a validação dos dados em um grande número de amostras e a correlação com parâmetros clínicos dos pacientes, poderá ser desenvolvido um painel de marcadores que forneça índices para detecção precoce e monitoramento do risco da doença. Tais informações poderão ser aplicadas no desenvolvimento de estratégias para a prevenção do câncer e para o desenvolvimento de drogas.



OBJETIVOS

Em função do papel relevante da metilação do DNA na carcinogênese e da importância e da necessidade de identificação de marcadores moleculares precoces em tumores de cabeça e pescoço, o presente projeto teve por objetivos:

- a) Detectar a presença de regiões de DNA com padrões alterados de metilação em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, utilizando a técnica de AP-PCR associada a digestão prévia do DNA por enzimas de restrição sensíveis à metilação (MS/AP-PCR).
- b) Determinar o valor das regiões diferencialmente metiladas identificadas por MS/AP-PCR como marcadores tumorais no câncer de cabeça e pescoço.
- c) Comparar o padrão de metilação dos marcadores identificados no DNA tumoral com aquele do DNA circulante dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço.

Capítulo II

IDENTIFICAÇÃO DE UM NOVO MARCADOR EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO UTILIZANDO O MÉTODO DE PCR SENSÍVEL À METILAÇÃO.

Artigo original para submissão ao periódico *Cancer Research*

RESUMO

Os tumores de cabeça e pescoço permanecem como uma doença freqüentemente fatal. Até o presente, poucos marcadores moleculares eficientes foram identificados para esse tipo de câncer. Um padrão anormal de metilação do DNA ocorre em genes específicos em quase todas as neoplasias, sugerindo que essa alteração pode ser utilizada como um marcador molecular do câncer.

O método de PCR arbitrário após digestão pela enzima de restrição *HpaII*, que é sensível à metilação, foi utilizado no presente trabalho para isolar seqüências diferencialmente metiladas em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (HNSCC, do inglês *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*). Comparando os resultados obtidos em tecidos tumorais com aqueles de tecidos normais, foram detectados dois fragmentos hipermetilados e 8 fragmentos hipometilados em tumor mas não em mucosa oral normal.

A análise da seqüência dos fragmentos hipometilados revelou identidade com repetições do tipo LINE-1 e com regiões dos cromossomos humanos 2, 6, 7, 9, 11, 15, 20 e X. O fragmento mais freqüentemente hipermetilado, que recebeu a denominação de DiMe-6, revelou ter 269 pares de base e estar mapeado próximo a uma ilha CpG, na região cromossômica 9q33.2. Utilizando o método COBRA, esse fragmento foi encontrado hipermetilado em 12 de 13 (92,3%) das linhagens celulares de cabeça e pescoço estudadas e em 21 de 32 (65,6%) tumores primários, enquanto pouca ou nenhuma metilação foi observada em 10 amostras de mucosa oral normal de indivíduos saudáveis. As margens cirúrgicas aparentemente normais obtidas de pacientes com HNSCC apresentaram menor densidade de metilação que a amostra de tumor correspondente. A metilação aberrante do fragmento DiMe-6 em DNA plasmático foi

sempre concordante com a metilação encontrada no tumor. Nenhuma amostra controle de DNA plasmático apresentou metilação aberrante.

Esse fragmento também foi analisado em linhagens celulares de diferentes tecidos e sua hipermetilação foi observada naquelas derivadas de tumores de cólon (RKO, DLD-1, SW837, HT-29), mama (BT-474), pulmão (NCI-H249) e de leucemia aguda pró-mielocítica (HL-60). Estudando um painel composto por 14 tumores primários de cólon pareados com seu tecido normal, um alto grau de metilação foi detectado em 12 amostras tumorais mas não na amostra normal. Esses achados são sugestivos de que a hipermetilação do fragmento DiMe-6 pode representar um marcador tumoral em câncer de cabeça e pescoço bem como em outros tipos de neoplasias e confirma a importância de alterações epigenéticas em câncer.



Identification of a New Methylation Marker in Head and Neck Cancer by using Methylation-Sensitive Arbitrarily Primed PCR¹

Marcos R.H. Estécio², Emile M. Youssef, Paula Rahal, Érica E. Fukuyama, José F. Góis Filho, José V. Maniglia, Jean-Pierre J. Issa, Eloiza H. Tajara

Department of Biology, IBILCE-UNESP, 2260 Cristovão Colombo, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil [M.R.H.E., P.H., E.H.T.], Department of Head & Neck and Skull Base Surgery, Arnaldo Vieira de Carvalho Hospital, São Paulo, Brazil [E.E.F., J.F.G. F.], Department of Surgery, Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil [J.V.M.], Department of Leukemia, UT M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030 [M.R.H.E., E.M.Y., J-P.J.I.],

Running Title: A New Methylated Marker in Head and Neck Cancer

Keywords: head and neck cancer; methylation; MS/AP-PCR; tumor marker; plasma DNA

Footnotes:

¹This work was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) Grants 99/09368-1 and 00/12361-8

²Corresponding author, Department of Leukemia, UT M. D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Boulevard, Box 428, Houston, TX, 77030. Tel: 713-745-3931. Fax: 713-796-0318. E-mail: mestecio@mdanderson.org.

ABSTRACT

Head and neck cancer remains a morbid and often fatal disease and at the present time few effective molecular markers have been identified. An abnormal pattern of DNA methylation occurs at specific genes in almost all neoplasms, suggesting that this alteration can be used as a molecular marker in cancer. We have applied the arbitrarily primed PCR method using DNAs digested with *HpaII*, a methylation-sensitive enzyme, to isolate sequences differentially methylated in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Comparing cancer tissue to normal mucosa, we found 2 bands hypermethylated in tumor but not in normal mucosa and 8 bands were hypomethylated. Sequence analysis revealed these hypomethylated fragments contained Line-1 repeats and had significant matches with sequences on human chromosomes 2, 6, 7, 9, 11, 15, 20 and X. The most frequently hypermethylated fragment, that we have called DiMe-6, was 269 bp in length and maps close to a CpG island on chromosome 9q33.2. By using COBRA analysis, methylation of this fragment was detected in 12 of 13 (92.3%) head and neck cell lines studied and 21 of 32 (65.6%) primary tumors, while little or no methylation was seen in 10 normal oral mucosa samples. Matched normal tissue from HNSCC patients presented lower methylation than tumor sample. Aberrant methylation of DiMe-6 in plasma DNA was all accompanied with methylation in the corresponding tumor samples. None of the control plasma showed aberrant methylation. We extended the investigation of the methylation status of this fragment to other cancer cell lines and methylation was found in those derived from colon (RKO, DLD-1, SW837, HT-29), breast (BT-474), acute promyelocytic leukemia (HL-60) and lung (NCI-H249). Studying a panel composed of 14 primary colon tumors matched with their normal tissue, a high degree of methylation was detected in 12 tumor specimens but not in the normal samples. These findings suggest that DiMe-6 hypermethylation

can represent a cancer marker in head and neck cancer as well as in other kinds of neoplasias and confirm the importance of searching for epigenetic dysregulation as molecular markers in tumor diagnosis.

INTRODUCTION

Head and neck (HN) cancer is a morbid and often fatal disease, being responsible for 2-3% of all new cancer cases diagnosed in the United States, and tobacco and alcohol consumption remain the primary factors involved in its etiology (1, 2). The most frequent histological type of these tumors is squamous cell carcinomas (SCC), accounting for more than 90% of the cases (3). Detection of HNSCC in early stages is strongly desired since the overall 5 years survival remains around 50% since the last two decades (4). Several genetic alterations have been described in HNSCC, including p53 mutations and cyclin D1 overexpression (5), loss of heterozygosity (6) and gene promoter methylation (7). This last one became very important as a tumor marker because of its high frequency of occurrence, its relative ease of detection and the fact that it is a putative therapeutic target that can be reversed by drug treatment.

Cytosine guanine dinucleotide (CpG) island methylation is a known mechanism of epigenetic inheritance in postmeiotic cells. DNA methylation is the enzymatic addition of a methyl group on cytosines present in the 5' position relative to a guanine (CpG dinucleotides). Methylated cytosines are absent in the promoter region of genes in normal physiological conditions but appear in cancer, leading to gene inactivation by mediating chromatin remodeling and condensation. An abnormal pattern of DNA methylation occurs at specific genes in almost all neoplasms, suggesting that this alteration can be used as a molecular marker in cancer (8, 9). The identification of new molecular markers based on DNA methylation has been done by several different

methods, such as RLGS (10), MCA/RDA (11) and MS/AP-PCR (12) and all of them explore the ability of exclusive digestion of non-methylated CpG dinucleotides by selected restriction enzymes.

Here, we have carried out an investigation of new methylation-based molecular markers in HNSCC by using the MS/AP-PCR method. We were able to corroborate putative cancer markers previously described by other authors, as the Line-1 retrotransposon hypomethylation, and we describe DiMe-6, a new frequently hypermethylated CpG island at 9q33.2.

MATERIALS AND METHODS

Specimens and Cell Lines

Thirty-two tumor specimens and apparently normal tissue adjacent to tumor were obtained from patients diagnosed with HNSCC between 1999 and 2000 at the Department of Surgery, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil and Department of Head & Neck and Skull Base Surgery, Arnaldo Vieira de Carvalho Hospital, São Paulo, Brazil. Tumor staging was done using the TNM classification (13). Normal oral mucosa tissue was obtained by oral swab from ten healthy individuals. Peripheral blood was collected from cancer and normal individuals and plasma was separated by centrifugation at 5.000 g for 10 minutes. Fourteen matched pairs of normal and tumor colon specimens were obtained from patients treated at the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center (Houston, TX). All patients gave written informed consent for sample collection according to institutional guidelines. Cancer cell lines from head and neck 1483, UMSCC10A, UMSCC10B, UMSCC11B, UMSCC14B, UMSCC17A, UMSCC17B, UMSCC22A, UMSCC22B,

UMSCC35 and UMSCC38 were provided by Dr. Thomas Carey (University of Michigan, Ann Arbor, MI), cell line TR146 was provided by Dr. Alfonse Balm (University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands) and the cell lines SqCC/Y1 was provided by Dr. Michael Reiss (Yale University, New Haven, CT). Details about these cell lines, including their karyotyping, were described previously (Krause *et al.*, 1981; Bradford *et al.*, 1991; Buchhagen *et al.*, 1996). Cancer cell lines from colon (RKO, DLD-I, SW837, HT-29), breast (BT-474), lung (NCI-H249, Hut64), leukemia (CEM, HL-60), and liver (HepG2) were obtained from the American Type Culture Collection. All of these cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO₂ in a monolayer culture consisting of a 1:1 (v/v) mixture of Dulbecco's modified Eagles's medium, 10% regular fetal bovine serum, antibiotics, and either Ham's F-12 nutrient mixture or RPMI 1640 medium. DNA from all specimens and cell lines were obtained by treatment with proteinase K and phenol-chloroform extraction.

MS/AP-PCR Conditions

The methylation-sensitive arbitrarily primed (AP-) PCR was conducted according to Gonzalgo *et al.* (12), with modifications. Briefly, 2 µg each of six normal oral mucosa and six tumor tissue DNA from healthy donors and HNSCC patients, respectively, were digested with 20 units of *RsaI*, a combination of *RsaI* and *HpaII* or *RsaI* and *MspI* (GibcoBRL) at 37°C for 16 hours. The equivalent of 100 ng of restriction-digested DNA was amplified using AP-PCR with the primers MLG2 and MGC0 + MGF2. PCR reactions were performed in a total volume of 10 µl under the following conditions: 10 mM Tris-HCL (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 200 µM of each dNTP, 25 pmol of primer and 1 unit of Taq polymerase. The reactions were



carried out in a thermal cycler (automated Perkin-Elmer model 9600 thermocycler) for 5 cycles under low stringency (95°C for 60 s, 50°C for 60 s and 72°C for 90 s) followed by 30 cycles under high stringency (95°C for 15 s, 55°C for 15 s and 72°C for 45 s). The amplicons were resolved in a 7.5% polyacrylamide gel and staining was made using silver nitrate.

Isolation and Sequencing of AP-PCR Fragments

Candidate differentially methylated bands were cut out from dried polyacrylamide gels and incubated in 50 µl of sterile water at 80°C for 10 minutes. Five microliters of the eluate was reamplified in a PCR reaction with the same primer(s) as that used for AP-PCR. PCR reaction was carried out as described for 35 cycles (95°C for 60 s, 55°C for 30 s and 72°C for 60 s). The amplification products were isolated from agarose gels and cloned in a TA vector (TOPO TA cloning kit, Invitrogen). Ten independent clones were submitted to automated sequencing (Applied Biosystems). Sequence identities were obtained using the BLAST program of the National Cancer Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Methylation Analysis

Methylation of the DiMe-6 CpG island was confirmed by the COBRA assay (14), which explores bisulfite-induced restriction fragment length polymorphisms where only methylated bands are digested by restriction enzymes. Bisulfite treatment was performed as reported by Toyota *et al.* (11). Briefly, 2 µg of genomic DNA was denatured in 0.2 N NaOH at 37 °C for 10 minutes and incubated with 3 M sodium bisulfite at 50 °C for 16 hours. After this incubation, DNA was purified with the Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI) and desulfonated in 0.3 N NaOH at 25



°C for 5 minutes. Desulfonated DNA was then precipitated with ammonium acetate and ethanol, washed with 70% ethanol, and resuspended in 20 µL of H₂O. Two microliters of this solution was used as a template for PCRs. We used the primers D6F 5'-TTTTTTGGTTTTTGAGGGG-3' and D6R 5'-TACCAAAATCCCCACCTCA-3' to amplify a fragment of 160 bp, which was cleaved into fragments of 129 and 31 bp by digestion with *TaqI* restriction enzyme. Digested PCR products were separated by electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. Gels were stained with ethidium bromide, imaged, and quantitated in a Bio-Rad Geldoc 2000 imager (Bio-Rad, Hercules, CA). The methylation density for each sample was computed as a ratio of the density of the digested band to the density of all bands in a given lane.

To study presence or absence of DiMe-6 hypermethylation in plasma DNA samples we used the sensitive method MSP (Methylation-specific PCR). Primers was designed to amplify methylated targets (131 bp length; D6-MSP-M/F 5'-GTTTAAACGTTGCGTTATTTTC-3' and D6-MSP-M/R 5'-CTCATACCCTATAAAATTTC-3') or unmethylated (118 bp; D6-MSP-U/F 5'-TGGGTTTTAATGTTGTGTTATTTT-3' and D6-MSP-U/R 5'-TTTCCAACAAATCACTCACCA-3') from bisulfite-treated DNA. The amplification products were resolved in 6% polyacrylamide gels and stained with ethidium bromide. The methylation status was inferred by the presence or absence of bands.

Reverse Transcription (RT)-PCR

For expression analysis, two head and neck cancer cell lines (FaDu and SCC-15), three colon cancer cell lines (RKO, SW480, LoVo), one lung cancer cell line (NCI-H460) and three prostate cancer cell lines (LNCap, PC-3, DU 145) were used. Four replicas for each cell line were grown according to ATCC protocols. Two replicas was

treated with 1 μ M of the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA) for 3 days, one with the histone deacetylase inhibitor trichostin A (TSA) for 1 day and one of the AZA treated cell cultures also received TSA treatment. Total RNA from cancer cell lines was prepared using Trizol (Invitrogen). cDNA from normal lung and trachea was synthesized from Premium RNATM (CLONTECH). Reverse transcription was carried out using M-MuLV reverse transcriptase (New England Biolabs Inc). One microgram of total RNA was transcribed in a 30 μ l volume according to standard procedures and 2 μ l of synthesized cDNA was used for PCR reactions. RT-PCR amplification was performed using primer sets LHX6RT/F 5'-CGGCAACGCCTACCACCTG-3' and LHX6RT/R 5'-GCACTGCCCCCTCCAACG-3' for *LHX6* and D6RT/F 5'-CTTGAAGGCTTTAGATCCTGTG-3' and D6RT/R 5'-AACCTCTTAATTGCTGGTTCTG-3' for DiMe-6 downstream EST using 35 cycles (95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s). GAPDH was used to control the amount and integrity of cDNA generated from each sample. All reactions were performed using reverse transcriptase (-) controls where the reverse transcriptase enzyme was omitted.

RESULTS

Detection of Differentially Methylated Fragments in HNSCC

To identify novel differentially methylated CpG islands in HNSCC, we used MS/AP-PCR, a technique developed by Gonzalgo *et al.* (12) to discriminate genomic fragments with differences in methylation by comparing tumor and normal samples from the same tissue. Approximately 80 bands were visualized in the PAGE gels after silver staining and 10 of these showed differences in methylation status (example in Fig.

1, summarized in Table 1). Eight hypomethylated fragments were identified as more than 99% similar to genomic DNA mapped on 2p25, 6p25, 7q22, 11q23, 15q15, 20q13 and Xq26. Gonzalgo *et al.* (12) previously described the fragment mapped on 2p25 (Genbank accession number Y10091) which is similar to Alu repeats. None of these fragments meets the criteria for CpG islands. These findings probably reflect general DNA hypomethylation that occurs at non-CpG regions in tumor cells (15). Although some of the recovered fragments are near to specific genes, for example the interleukin 10 alpha receptor (*IL10RA*) at 11q23 and the nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 (*NFATC2*) at 20q13, no direct effect on expression regulation is expected since no promoter regions are involved. One hypomethylated repetitive element was found in our experiment that is similar to Line-1 retrotransposons. Hypomethylation of repetitive elements has previously been found in cancer and our results corroborate these studies.

Two hypermethylated fragments were identified in HNSCC and they mapped to 20q13 and 9q33.2 (DiMe-5 and DiMe-6, respectively). A high content of C+G and CpG dinucleotides were found in these fragments, and both of them are located close to CpG islands. DiMe-6 was the most frequently hypermethylated fragment (Fig. 1) and maps in intron 4 of the gene *LHX6* and upstream of a predicted gene (Fig. 2). One EST (GenBank accession no. AW629363) likely represents the last exon of the predicted gene since it has a polyadenylation site and a poly A tail.

Characterization of the Methylation Status of DiMe-6 in a Panel of Tumor Cell Lines

To determine whether these identified fragments can be used as molecular markers, we used COBRA to investigate hypermethylation of the DiMe-6 fragment in

thirteen head and neck cancer cell lines. The PCR product was cleaved with *TaqI* restriction enzyme that discriminates methylated from unmethylated DNA (Fig. 3A). Partial hypermethylation (density 33% to 89%) was observed in all the tested HNSCC cell lines (Fig. 3B) except Sqcc/Y1. We extended this investigation to other cancer cell lines (Fig. 3B) and a high degree of hypermethylation was found in 4/4 colon cancer cell lines (RKO, DLD-I, SW837, HT-29), 1/1 breast cancer cell line (BT-474), 1/1 acute myelogenous leukemia cell line (HL-60), 1/2 lung cancer cell lines (NCI-H249), 0/1 acute lymphoblastic leukemia cell line (CEM) and 0/1 liver cancer cell line (HepG2). These results indicate that DiMe-6 hypermethylation has potential as a biomarker, particularly in solid tumors.

DiMe-6 Hypermethylation Analysis in HNSCC and Colon Samples

We next examined the level of methylation of DiMe-6 in uncultured tumors obtained from 32 head and neck cancer patients. Normal oral mucosa from healthy individual was used as negative control for hypermethylation. By using COBRA analysis, hypermethylation of this fragment was detected in 21 of 32 (65.6%) primary tumors, and no or little methylation was seen in 10 normal oral mucosa samples (Fig. 4A). Methylation density of DiMe-6 in all normal oral mucosa and tumor tissue is presented in the Fig. 4B. Methylation density was clearly higher in tumor samples (mean 23.5 ± 23.3) compared to normal oral mucosa (3.3 ± 2.36) and the T test revealed a significant difference ($P = 0.009$). Additionally, we investigated 13 apparently normal tissues adjacent to tumor and most of them presented lower methylation than the matched tumor (Fig. 4C). In HNSCC, the methylation increased in an age-dependant pattern (Fig. 4D and 4E), both in tumor ($r = 0.39$, $P = 0.026$) and normal tissue ($r = 0.67$, $P = 0.011$) according linear regression analysis. No significant correlation between

DiMe-6 hypermethylation and sex, tumor site, tumor stage and alcohol or tobacco was found (Table 2).

To confirm that DiMe-6 hypermethylation is not restricted to HNSCC, we studied a panel of 14 primary colon tumors matched with their normal tissue. A high degree of methylation was detected in 12 tumor specimens (85.7%) but not in the normal samples (Fig. 5A). An age-dependent increase in methylation density was too observed in these tumor samples (Fig. 5B), reinforcing that DiMe-6 hypermethylation comes with aging.

We next explored the application of DiMe-6 methylation as a non-invasive marker in plasmatic DNA from HNSCC. Because of the small amount of tumor DNA expected to be released in plasma, a more sensitive technique is required to such analysis so the MSP analysis was used for this. The presence of DiMe-6 hypermethylation was observed in the same samples that are positive in the COBRA analysis, and no methylation was found in that plasma DNA from free-cancer controls (Fig. 6).

Epigenetic Control of *LHX6* Gene and DiMe-6

Using RT-PCR, we examined the expression of the nearest potential transcribed targets to DiMe-6, the *LHX6* gene and the EST AW629363 in a panel of tumor cell lines prior and after treatment with demethylating (AZA) and histone deacetylase inhibitors (TSA) as well as a combination of these drugs (Fig. 7A). *LHX6* expression was lost or strongly diminished in colon (RKO), prostate cancer (LNCap), head and neck (FaDu) and lung (NCI-H460) cancer cell lines and was re-expressed when AZA and TSA was combined in all cases except to the lung cancer cell line (Fig. 7B). The DiMe-6 downstream associated EST was downregulated in colon (SW480), prostate (LNCap)

and head and neck (FaDu). Both genes were detected in normal samples from trachea and/or lung. The remarkable lack of correlation between *LHX6* and DiMe-6 associated EST expression in SW480 suggest independent mechanisms of regulation for them. Since the DiMe-6 CpG island is localized in the intron 4 of *LHX6*, no effect on regulation is expected. The most affordable hypothesis is the importance of DiMe-6 methylation on regulation of the predict gene whose comprises the investigated EST. Additionally, the data suggest that *LHX6* could be an important epigenetic silenced gene in solid tumors and so far we know, it is the first report of lost of expression of this coding gene for a LIM homeobox protein in cancer cell lines.

DISCUSSION

Using MS/AP-PCR, we isolated two hypermethylated and eight hypomethylated fragments in HNSCC compared with normal oral mucosa. The results of the methylation-sensitive AP-PCR method conducted here was in general lines similar to those reported by Gonzalgo *et al.* (12). A higher frequency of hypomethylated fragments was found compared with the number of hypermethylated sites. LINE-1 methylation may be important to suppress retrotransposition and such hypomethylation could have important consequences (16). Line-1 retrotransposon was found hypomethylated in our analysis and similar data were previously reported (17, 18) suggesting that it can represent a good indicator of global hypomethylation in cancer.

The methylation status of the hypermethylated fragment DiMe-6 was investigated in a panel of different types of cancer cell lines. As expect from the MS/AP-PCR results, a high frequency of hypermethylation was found in HNSCC cell lines. Other types of tumors also have hypermethylation of DiMe-6, for example colon and breast. In primary tumors, hypermethylation of DiMe-6 was observed in 65.6% of



HNSCC and 85.7% of colon tumors investigated. Such results support the inclusion of DiMe-6 in a panel of methylated genes for early cancer diagnosis, including for investigation of tumor DNA in plasma samples (19, 20). To confirm this statement we investigated the presence of hypermethylation of DiMe-6 in a subset of plasma DNA samples from HNSCC patients and healthy individuals. The MSP analysis could identify hypermethylation of DiMe-6 in the same positive samples according COBRA analysis. No methylation was found in the free-cancer patients. This approach would be valuable for individuals at high risk of developing head and neck cancer such as smokers and to follow-up after cancer treatment as well as in other cancer types.

Additionally, DiMe-6 hypermethylation clearly increases in an age-dependent fashion. A low-level methylation is present in normal oral mucosa but increases in both tumor and normal tissue from older cancer patients (> 50 years old). The same was observed in older colon cancer patients. Issa *et al.* (21) first reported the positive correlation between *ESR1* gene methylation and aging and further reports increase the list of genes with age-dependent methylation (22, 23). Although these evidences of age-related methylation had been well described in colon cancer, we believe that the same mechanism can be true to head and neck cancer. Finally, we were able to prove that the genes around the DiMe-6 fragment are subject to epigenetic silencing. DiMe-6 fragment is closely mapped to a CpG island internal to the intron 4 of *LHX6* gene. This gene encodes one LIM-homeodomain protein involved in embryogenesis, more specifically on mammalian head development (24). Salem *et al.* (25) described the analysis of other embryonic gene, *PAX6*, that they found hypermethylation of exon 5 using MS/AP-PCR. As expected, these authors didn't found correlation between exon 5 methylation and expression of *PAX6* but prove for the first time expression of this gene in cancer cell

lines. In our analysis we report for the first time *LHX6* expression in normal adult tissues from lung and trachea and lack of expression in colon, head and neck and prostate cancer cell lines that could be restored by a combination of AZA and TSA. *LHX6* was not expressed neither reactivated in the lung cell line NCI-H249. A potential participation of this LIM/homeodomain transcription factor in carcinogenesis must be further investigated. Since regulation of *LHX6* for the DiMe-6 CpG island was not expected to happen, we investigated the expression of the downstream EST AW629363. Again, we found downregulation of this EST in the cancer cell lines that was reversed by drug treatment. Young *et al.* (26) reported the identification of a new gene by MS/AP-PCR and Ogi *et al.* (27) correlates the expression of a closely EST to MINT1 CpG island methylation. Strategies to gene identification should be done to clarify whether DiMe-6 CpG has a gene in its vicinity.

In conclusion, our results support the investigation for methylated molecular markers in cancer. The involvement of both hypomethylation and hypermethylation are common events and both apparently can be used to cancer diagnosis. Indeed, we identified a new frequent cancer-associated hypermethylated CpG island in head and neck and colon tumors. The inclusion of this new marker in a panel of hypermethylated genes in cancer potentially increases the sensibility and specific of tumor detection.

REFERENCES

1. Casiglia, J., Woo, S. B. A comprehensive review of oral cancer. *Gen. Dent.*, 49: 72-82, 2001.
2. Reichart, P. A. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin. Oral Investig.*, 5: 207-213, 2001.



3. Wong, D. T., Todd, R., Tsuji, T., Donoff, R. B. Molecular biology of human oral cancer. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 7: 319-328, 1996.
4. Macluskey, M., Ogden, G. R. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 2. Markers of value in tumour diagnosis. *Dent. Update*, 27: 148-152, 2000.
5. Xu, J., Gimenez-Conti, I. B., Cunningham, J. E., Collet, A. M., Luna, M. A., Lanfranchi, H. E., Spitz, M. R., Conti, C. J. Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. *Cancer*, 83: 204-212, 1998.
6. Grati, F. R., Sirchia, S. M., Garagiola, I., Sironi, E., Galioto, S., Rossella, F., Serafini, P., Dulcetti, F., Bozzetti, A., Brusati, R., Simoni, G. Losses of heterozygosity in oral and oropharyngeal epithelial carcinomas. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 118: 57-61, 2000.
7. Shintani, S., Nakahara, Y., Mihara, M., Ueyama, Y., Matsumura, T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.*, 37: 498-504, 2001.
8. Jones, P. A., Buckley, J. D. The role of DNA methylation in cancer. *Adv. Cancer Res.*, 54: 1-23, 1990.
9. Issa, J. P. Aging, DNA methylation and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 32: 31-43, 1999.
10. Kawai, J., Hirotune, S., Hirose, K., Fushiki, S., Watanabe, S., Hayashizaki, Y. Methylation profiles of genomic DNA of mouse developmental brain detected by restriction landmark genomic scanning (RLGS) method. *Nucleic Acids Res.*, 21: 5604-5608, 1993.
11. Toyota, M., Ho, C., Ahuja, N., Jair, K. W., Li, Q., Ohe-Toyota, M., Baylin, S. B., Issa, J. P. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res.*, 59: 2307-2312, 1999.

12. Gonzalgo, M. L., Liang, G., Spruck, C. H., 3rd, Zingg, J. M., Rideout, W. M., 3rd, Jones, P. A. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res.*, 57: 594-599, 1997.
13. International Union Against Cancer. UICC TNM atlas: illustrated guide to the TNM/pTNM classification of malignant tumours. 3rd ed, 2nd revision, pp. 50-55. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
14. Xiong, Z., Laird, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, 25: 2532-2534. 1997
15. Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., Jaenisch, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395: 89-93, 1998.
16. Yoder, J. A., Walsh, C. P., Bestor, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, 13: 335-340, 1997.
17. Alves, G., Tatro, A., Fanning, T. Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. *Gene*, 176: 39-44, 1996.
18. Florl, A. R., Lower, R., Schmitz-Drager, B. J., Schulz, W. A. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br. J. Cancer*, 80: 1312-1321, 1999.
19. Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S. B., Herman, J. G. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.*, 59: 67-70, 1999.
20. Wong, I. H., Lo, Y. M., Zhang, J., Liew, C. T., Ng, M. H., Wong, N., Lai, P. B., Lau, W. Y., Hjelm, N. M., Johnson, P. J. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.*, 59: 71-73, 1999.

21. Issa, J. P., Ottaviano, Y. L., Celano, P., Hamilton, S. R., Davidson, N. E., Baylin, S. B. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.*, 7: 536-540, 1994.
22. Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B., Issa, J. P. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res.*, 58: 5489-5494, 1998.
23. Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., Issa, J. P. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96: 8681-8686, 1999.
24. Grigoriou, M., Tucker, A. S., Sharpe, P. T., Pachnis, V. Expression and regulation of *LHX6* and *Lhx7*, a novel subfamily of LIM homeodomain encoding genes, suggests a role in mammalian head development. *Development*, 125: 2063-2074, 1998.
25. Salem, C. E., Markl, I. D., Bender, C. M., Gonzales, F. A., Jones, P. A., Liang, G. *PAX6* methylation and ectopic expression in human tumor cells. *Int. J. Cancer*, 87: 179-185, 2000.
26. Young, J., Biden, K. G., Simms, L. A., Huggard, P., Karamatic, R., Eyre, H. J., Sutherland, G. R., Herath, N., Barker, M., Anderson, G. J., Fitzpatrick, D. R., Ramm, G. A., Jass, J. R., Leggett, B. A. *HPPI*: a transmembrane protein-encoding gene commonly methylated in colorectal polyps and cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98: 265-270, 2001.
27. Ogi, K., Toyota, M., Ohe-Toyota, M., Tanaka, N., Noguchi, M., Sonoda, T., Kohama, G., Tokino, T. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 3164-3171, 2002.

Table 1. Summary of the 10 differentially methylated (DiMe) clones identified by MS/AP-PCR.

Fragment	Methylation status	Size (bp)	CpG island ^a	Blast identity	Chromosome map
DiMe 5	hypermethylated	146	Yes ^b	C20orf149	20q13.3
DiMe 6	hypermethylated	269	Yes	<i>LHX6</i>	9q33.2
DiMe 12	hypomethylated	209	No	<i>POLR2J2</i>	7q22.1
DiMe 13	hypomethylated	309	No	<i>NFATC2</i>	20q13.2
DiMe 14	hypomethylated	170	No	Human genomic DNA	6p25.3
DiMe 15	hypomethylated	213	No	Human genomic DNA	2p25.3
DiMe 16	hypomethylated	321	No	Human genomic DNA	15q15.1
DiMe 17	hypomethylated	340	No	LINE1	ND ^c
DiMe 18	hypomethylated	175	No	<i>IL10RA</i>	11q23.3
DiMe 19	hypomethylated	234	No	Human genomic DNA	Xq26.3

^aThe presence of CpG island was determined based on criteria: minimum lenght, 200 bp; CG content, >50%; CpG/GpC, >0.5.

^bmapped near a CpG island

^cND, not determined



Table 2. DiMe-6 hypermethylation and clinical and demographic characteristics of 32 head and neck squamous cell carcinoma patients.

Variable	<i>n</i>	DiMe-6 hypermethylation		<i>P</i> value ^{<i>a</i>}
		U (%)	M (%)	
Sex				
Male	28	11 (39.3)	17 (60.7)	0.166
Female	4	0 (0.0)	4 (100.0)	
Age				
≤ 50	10	7 (70.0)	3 (30.0)	0.013 ^{<i>b</i>}
> 50	22	4 (18.2)	18 (81.8)	
Tumor site				
Oral Cavity	12	3 (25.0)	9 (75.0)	0.722
Oropharynx	6	4 (66.7)	2 (33.3)	0.188
Larynx	14	4 (28.6)	10 (71.4)	1.000
All sites	32	11 (53.1)	21 (65.6)	
T-category				
T1 + T2	9	2 (22.2)	7 (77.8)	0.440
T3 + T4	23	9 (39.1)	14 (60.9)	
Tobacco use				
Yes	30	11 (36.7)	19 (63.3)	0.534
No	2	0 (0.0)	2 (100.0)	
Alcohol abuse				
Yes	25	10 (40.0)	15 (60.0)	0.374
No	7	1 (14.3)	6 (85.7)	

^aFisher exact test, two tailed^bsignificant difference, $P < 0.05$.

Figure legends

Figure 1. Methylation-sensitive fingerprints of HNSCC and normal oral mucosa samples using primer MLG2 in the MS/AP-PCR reactions after DNA digestion with the combination of *RsaI* + *HpaII* restriction enzymes. The DiMe-6 hypermethylated fragmented is indicated on right.

Figure 2. Representative map of chromosome region 9q33.2 showing the position of DiMe-6 fragment. The image was obtained using the program BLAT (BLAST-like Alignment Tool, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). A predicted gene and a EST are mapped near to DiMe-6.

Figure 3. Hypermethylation of DiMe-6 in human cancer cell lines. A, Map of Dime-6 fragment (top) and CpG sites on flanking regions (middle). M (methylated) and U (unmethylated) represents respectively the digested and non-digested PCR products by the restriction enzyme *TaqI* (bottom). B, DiMe-6 methylation in head and neck (UMSCC 17B, 22A, 22B and 14B), colon (RKO, DLD-1, SW837, HT-29), breast (BT-474), leukemia (HL-60, CEM), lung (NCI-H249, Hut64) and liver (HepG2) cancer cell lines.

Figure 4. Cobra analysis of DiMe-6 in primary head and neck tumors and normal oral mucosa. A, Hypermethylation of DiMe-6 was detected in most of the head and neck cancer regardless the anatomical site involved but not in the normal oral mucosa from healthy individuals. B, Graphic representation of methylation density of DiMe-6 in all studied samples. Methylation density above 10% was used as cut-off to determine

positive cases based on methylation degree in normal oral mucosa. C, Graphic comparison of DiMe-6 methylation in matched tumor and normal tissue from the same individual. D, DiMe-6 methylation increases progressively with age in head and neck tumors. E, Scatterplot representative of age-related methylation in head and neck cancer. A positive correlation between methylation density and age is clearly observed in the graphic.

Figure 5. Cobra analysis of DiMe-6 in matched primary colon tumors (T) and normal adjacent mucosa (N). A, Hypermethylation of DiMe-6 was frequent in tumor but almost absent in the correspondent normal tissue reinforcing the methylation specificity. B, Age-dependent methylation was observed in colon cancer samples.

Figure 6. Representative gel electrophoresis pictures demonstrating methylation density of DiMe-6 for plasma DNA for head and neck (HNSCC) patients and free-cancer healthy individuals (OM). M = methylated; U = unmethylated.

Figure 7. Expression analysis of nearby transcribed sequences to DiMe-6. A, Diagramatic representation of drug treatment of the cancer cell lines studied. B, Both *LHX6* and DiMe-6 associated EST are downregulated in cancer and could be re-expressed by the drug combination. The lung cancer cell line NCI-H249 cannot re-express *LHX6* under the condition used in this experiment. All reactions were controlled by RT(-) samples (data not shown).

Figure 1

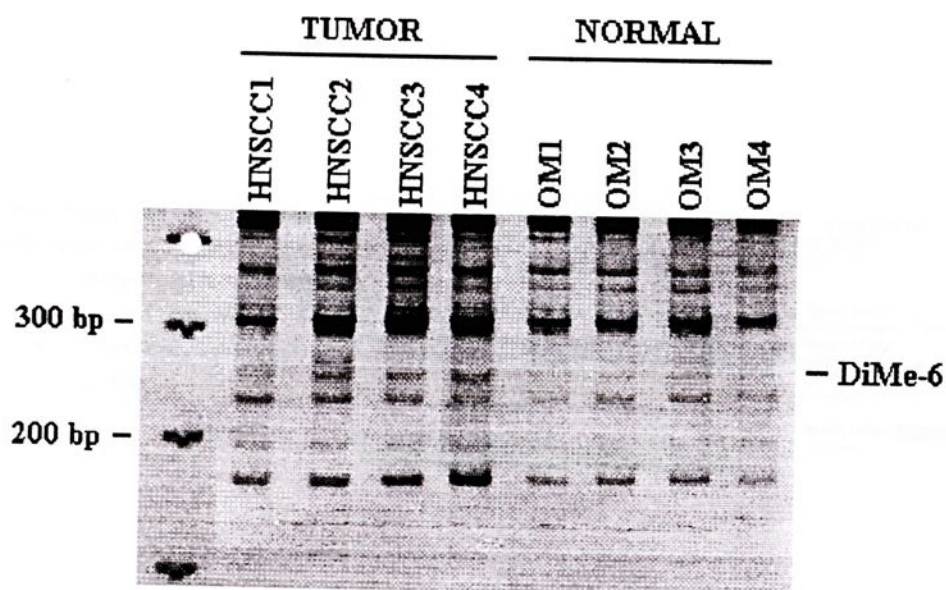


Figure 2

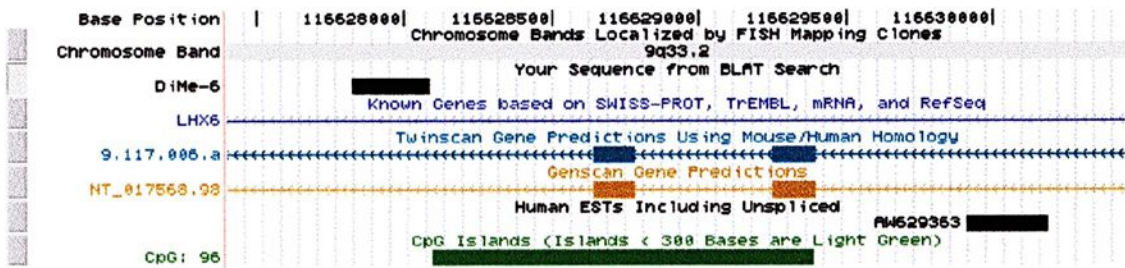


Figure 3A



Figure 3B

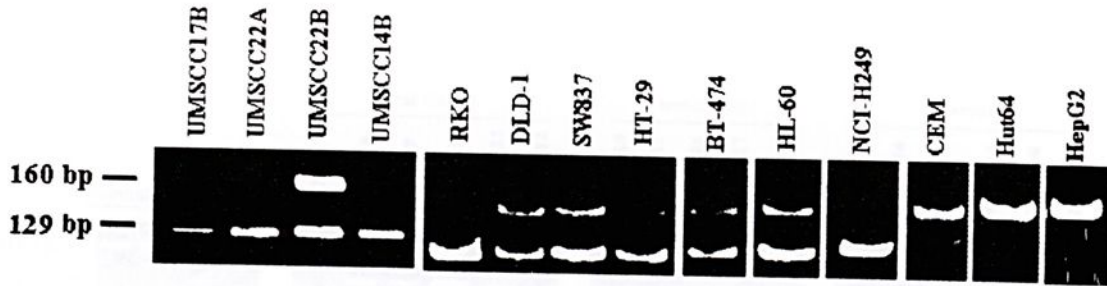


Figure 4A

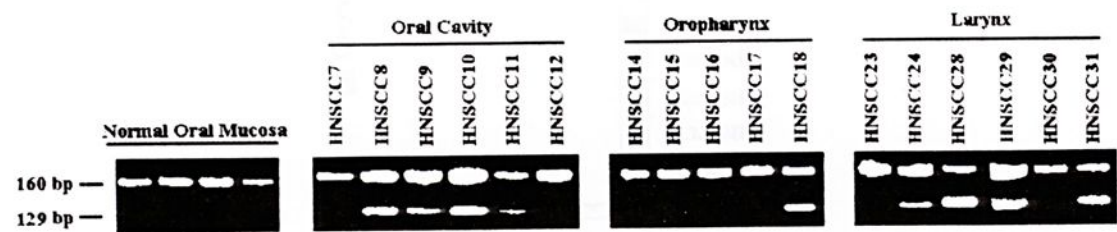


Figure 4B

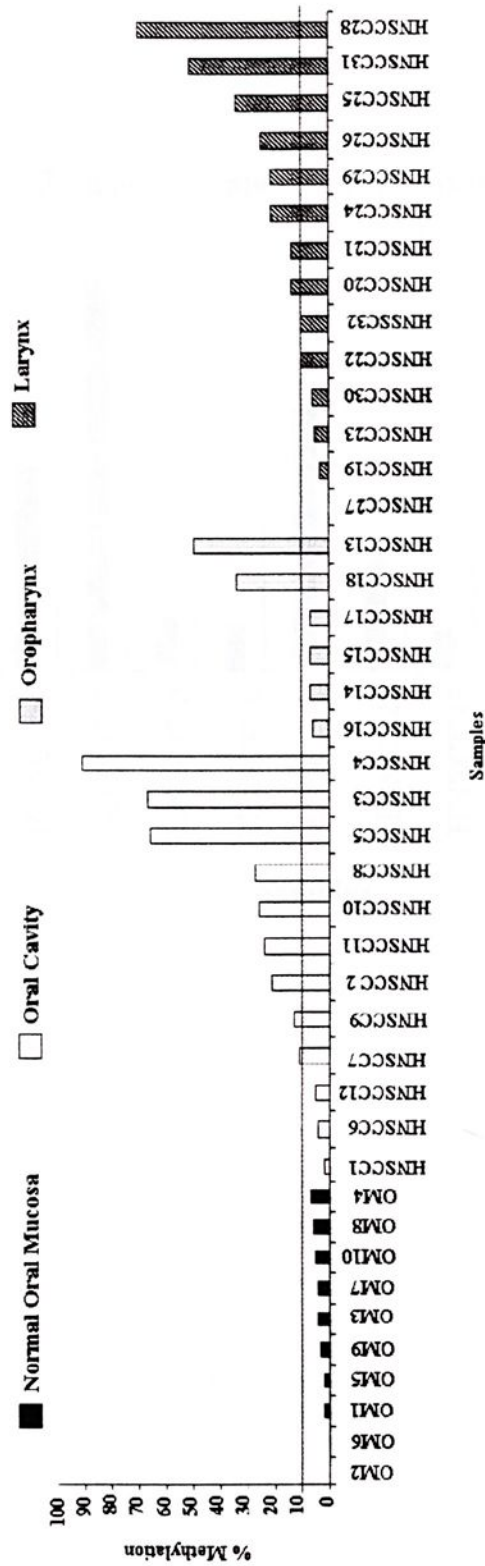


Figure 4C

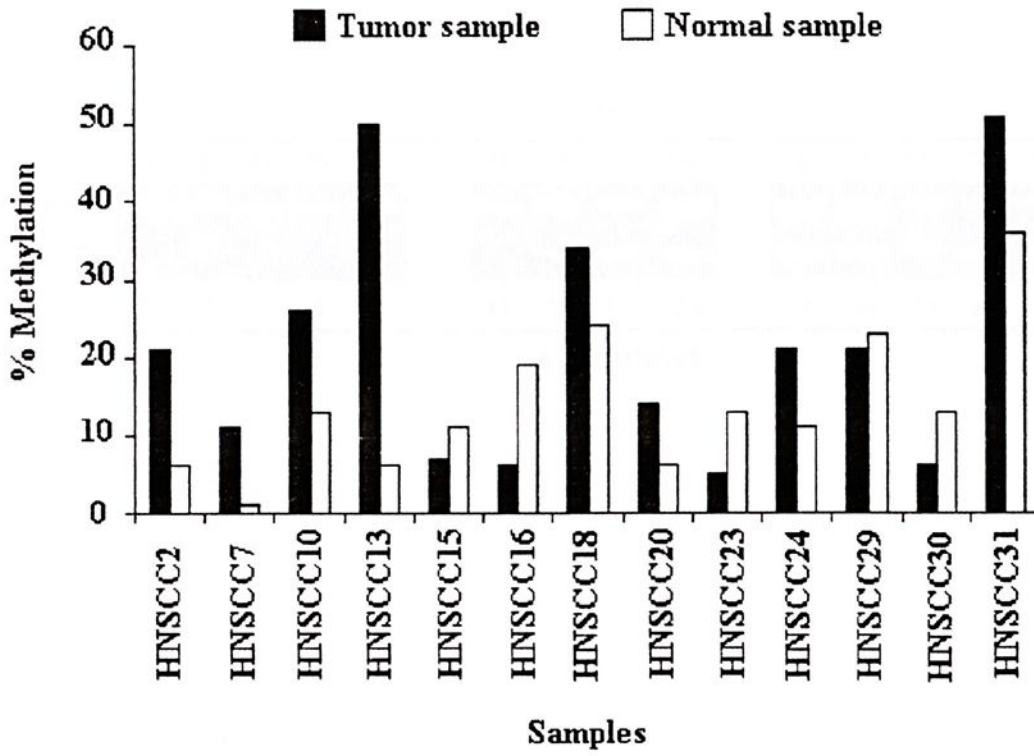


Figure 4D

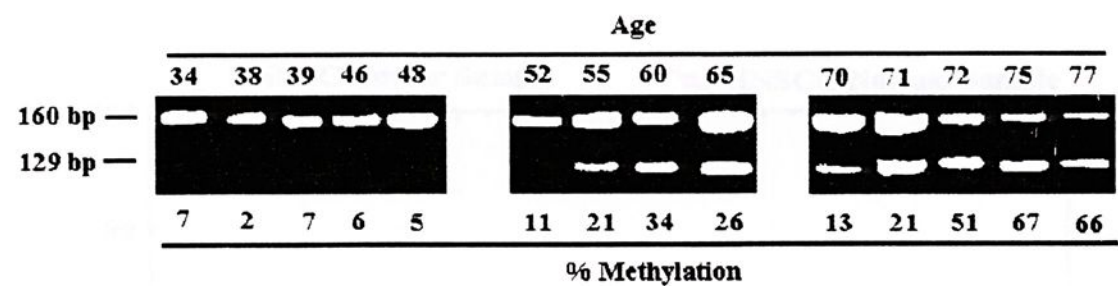


Figure 4E

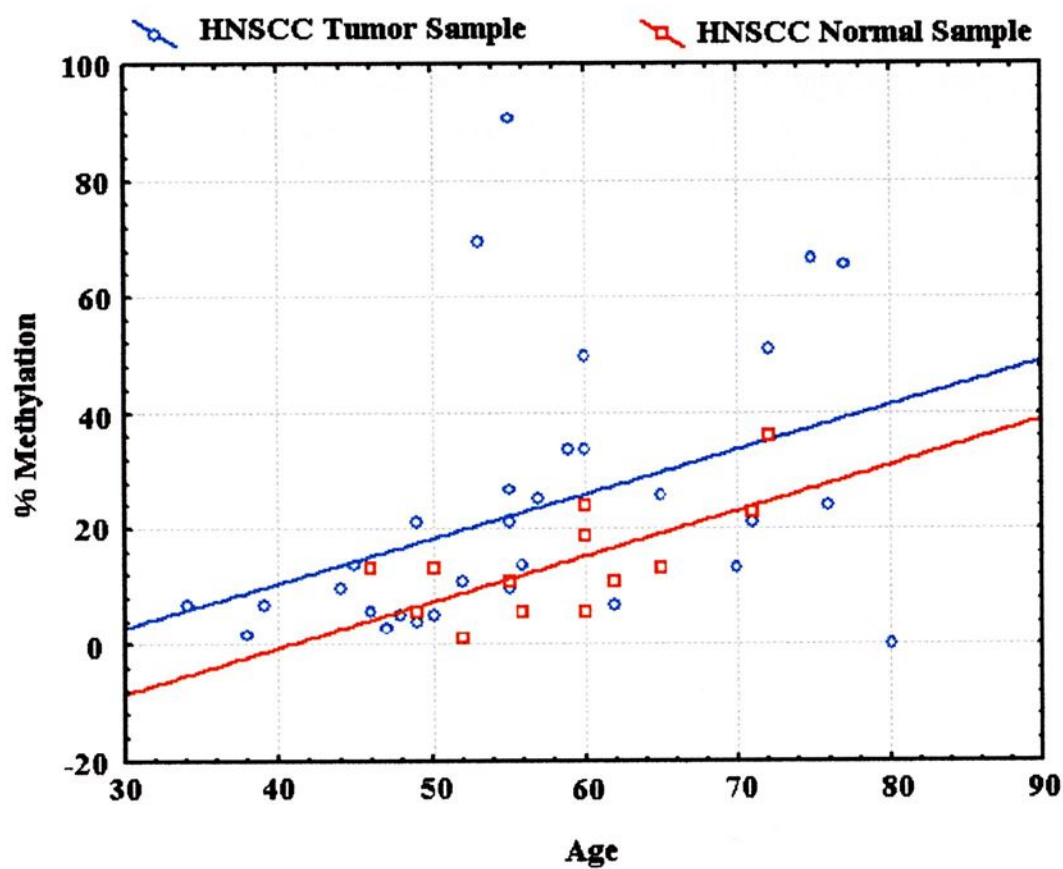


Figure 5A

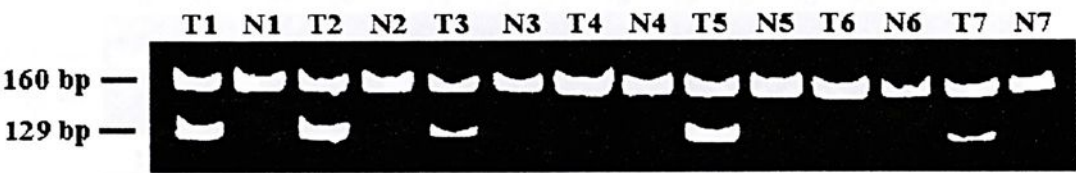


Figure 5B

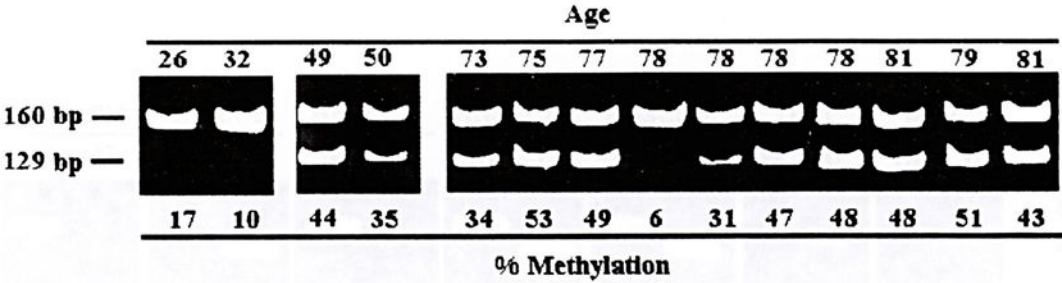


Figure 6

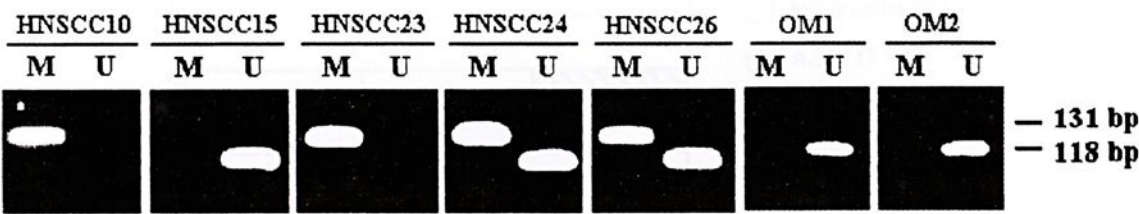


Figure 7A

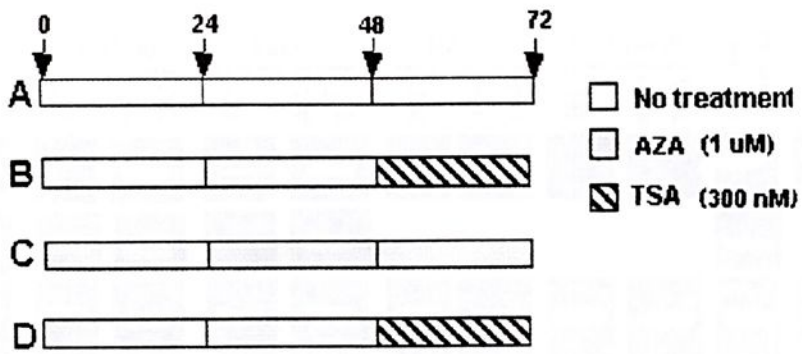
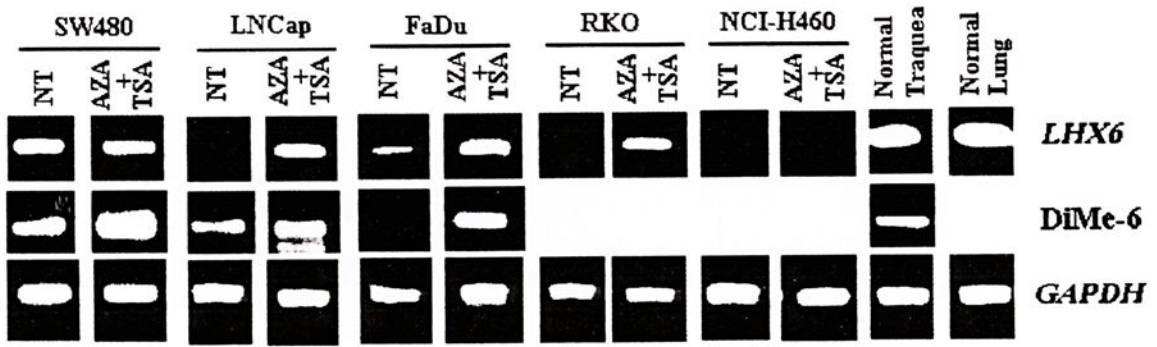


Figure 7B



Capítulo III

HIPOMETILAÇÃO DO ELEMENTO TRANSPONÍVEL LINE-1 EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO E DE CÓLON

“Short Report” para submissão ao periódico Oncogene



RESUMO

Alterações na metilação do DNA têm sido demonstradas em quase todas as neoplasias humanas e representam um bom biomarcador. No presente trabalho, foram detectados, pelo método MS/AP-PCR, vários fragmentos hipometilados em tumores de cabeça e pescoço, tendo um deles apresentado similaridade com o elemento transponível LINE-1.

Os elementos LINE-1 estão hipermetilados em tecidos normais, o que reprime sua expressão e conseqüente transposição no genoma hospedeiro. Por outro lado, vários estudos utilizando o método de *Southern blot* descreveram hipometilação do LINE-1 em tumores renais, de próstata, de mama e de bexiga. Apesar do método de *Southern* ser bastante sensível, suas limitações impedem análises de grandes número de casos e de espécimens pequenos, dos quais limitadas quantias de DNA são obtidas. Com a finalidade de superar essas dificuldades, foi desenvolvido um protocolo prático que discrimina retrotransposons LINE-1 hipometilados de forma semi-quantitativa por explorar a combinação de tratamento do DNA com bisulfito de sódio, amplificação por PCR e digestão com enzimas de restrição (método COBRA). Utilizando um painel de linhagens celulares tumorais, tumores primários de cabeça e pescoço e tumores primários de cólon, foi observado que a hipometilação do LINE-1 é uma alteração comum em câncer, presente em mais de 90% dos casos. Além disso, pelo menos para os tumores de cólon, a hipometilação do LINE-1 esteve presente no tecido normal do mesmo paciente, e pode representar um evento desencadeado pelo processo de envelhecimento ou da transformação pré-maligna.



LINE-1 hypomethylation in head and neck and colon tumors

Marcos R.H. Estécio^{1, 2, *}, Emile M. Youssef², Cláudia M. A. Carareto¹, Paula Rahal¹,
Érica E. Fukuyama³, José F. Góis Filho³, José V. Maniglia⁴,
Jean-Pierre J. Issa², Eloiza H. Tajara¹

1. Department of Biology, IBILCE-UNESP, 2260 Cristovão Colombo, São José do Rio Preto, Brazil 15060-170, 2. Department of Leukemia, UT M.D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas 77030, 3. Department of Head & Neck and Skull Base Surgery, Arnaldo Vieira de Carvalho Hospital, São Paulo, Brazil, 4. Department of Surgery, Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

Running title: L1 hypomethylation in cancer

Keywords: LINE-1, hypomethylation, head and neck cancer, colon cancer, molecular marker

* To whom correspondence should be addressed: Marcos R. H. Estécio, Department of Leukemia, UT M.D. Anderson Cancer Center, 1515 Holcombe Boulevard, Box 428, Houston, TX, 77030. Tel: 713-745-3931. Fax: 713-796-0318. E-mail: mestecio@mdanderson.org.



ABSTRACT

Alterations on DNA methylation have been demonstrated in almost all human neoplasias and represents a useful biomarker. We have used the MS/AP-PCR method to investigate methylation in head and neck tumors and several hypomethylated fragments were found, including a LINE-1 retrotransposon elements. LINE-1 elements are hypermethylated in normal cells and this methylation repress its expression and consequent transposition in the host genome. Studies using Southern blot analysis found LINE-1 hypomethylated in renal, bladder and breast tumors. A PCR-based method is desired to allow such analysis be undertaken in large casuistic composed by uncultured tumors. We present here a useful protocol that discriminate hypomethylated LINE-1 retrotransposon in a semi-quantitative way by exploring the combination of bisulfite treatment, PCR amplification and restriction analysis (COBRA method). Using a panel of cancer cell lines, primary head and neck and colon tumors as a model, we found that hypomethylation of LINE-1 is a very common dysregulation in cancer, representing more than 90% of the cases. Additionally, at least for colon cancer, the hypomethylation was presented in normal tissue prior to malignant transformation and could be the result of aging process and/or pre-malignant transformation.

TEXT

In vertebrates, a modified cytosine base contained a methyl group (5-methylcytosine) that is added by enzymatic reaction occurs on CpG dinucleotides (cytosines and guanines adjacents in the same DNA strand). This DNA methylation plays an important role in X chromosome inactivation and genomic imprinting. It has been proved that this process also regulates tissue-specific gene expression and immobilizes mammalian transposable elements (Hendrich and Bird, 1998). An abnormal DNA methylation pattern is observed in cancer cells and can be useful to tumor diagnostic and patient prognostic (Jones, 1996).

We had applied the MS/AP-PCR method (Gonzalzo *et al.*, 1997) in a group of tumor and normal tissue samples to identify abnormally methylated sequences in head and neck cancer. Among several hypomethylated fragments, we had identified one that was similar to LINE-1 (L1) human retrotransposon. The human genome contains around 100,000 – 500,000 copies of L1 elements (Fanning and Singer, 1997; Ostertag *et al.*, 2002) and it was supposed that global demethylation in tumor cells affects L1 elements (Yoder *et al.*, 1997). The promotor responsible for the full-length L1 transcript has been shown to be located within the 5' end of the element and downstream from the transcriptional start site (Becker *et al.*, 1993). Since more than 90% of all 5-methylcytosine lies within the transposons, including Alu, SINE and LINE, methylation content in these elements can be good indicators of global hypomethylation dysregulation that occurs in cancer cells. Previous studies about L1 methylation in cancer had described hypomethylation in cancer cell lines from breast and brain (Alves *et al.*, 1996) and primary tumors from kidney (Florl *et al.*, 1999), liver (Takai *et al.*, 2000) and prostate (Santourlidis *et al.* 1999; Schulz *et al.*, 2002). These investigations



were performed using Southern blot analysis that is incompatible with clinical samples because of the limited amount of DNA obtained from small tumors pieces or biopsies.

To confirm and extend our MS/AP-PCR results, we were interested in developing a PCR-based method to determine the degree of L1 hypomethylation in solid tumors using head and neck and colon cancer as a model.

We applied the COBRA method (Combined Bisulfite Restriction Analysis) to determine the methylation density in the L1 promotor. The restriction map of the L1 promotor is presented in the Figure 1A. This method relies on bisulfite treatment of DNA previously to PCR reactions that are performed with primers whose annealing sites are depleted in CpG. The bisulfite treatment modifies the unmethylated cytosines to thymidines while the methylated cytosines are non-reactive. As result, pools of PCR products containing both methylated and unmethylated DNA are obtained and can be discriminated using restriction enzymes. Woodcock *et al.* (1997) investigated the L1 promotor using bisulfite treatment and subsequent DNA sequencing analysis to determine individual CpG sites methylation. According their observation, L1 promotor elements are heavily methylated and demethylating agents increases the L1 expression in cultivated cells. Although efficient, the sequence analysis as well as Southern blot methods are time consuming and relatively expensive to be applied to large casuistic. Under this viewpoint, the COBRA method is affordable to clinical application of L1 hypomethylation as a tumor marker. The Figure 1B shows a representative image of the gel electrophoresis for L1 methylation analysis using COBRA.

L1 elements had been reported as hypomethylated in several different tumors (Florl *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2000; Santourlidis *et al.* 1999; Schulz *et al.*, 2002). The absence of demethylation of L1 in normal tissues and its high frequency of hypomethylation in tumor samples suggest that such alteration can be applied as a

cancer marker. So far, Southern blot analysis had been used to determine L1 hypomethylation and its had limited the application of this investigation. Since we had developed a PCR-based method to access the methylation density of the L1 promotor, we were able to conduct such analysis in a faster and less expensive way. The COBRA analysis of L1 promotor methylation revealed that HNSCC samples are less methylated than normal oral mucosa (T test, $P < 0.0001$). Santourlidis *et al.* (1999) studied L1 methylation in prostate adenocarcinoma and found by Southern blot analysis hypomethylation in 53% of the cases. The maximum relative demethylation found was 30% and these authors suggest that L1 hypomethylation is associated with progressive tumors. In our investigation we found up to 59% in demethylation of L1 in head and neck tumors compared with normal oral mucosa. The methylation degree of L1 methylation was less than 70% in 18 of 19 HNSCC samples tested (94.7%). Methylation density of L1 promotor in normal oral mucosa and HNSCC is represented in the Figure 2A.

The methylation density in the matched tumor and normal colon samples was significant lower in cancer tissue (T test, $P = 0.015$). As showed in the Figure 2B, these normal tissue was less methylated than normal oral mucosa. Since the L1 methylation is expected to be the same regardless the tissue because of its global repression in the mammalian genome, we understand this observation as result of pre-malignant transformation associated with aging process in colon tissue.

We further confirm the efficiency of COBRA method in to determine the methylation density in L1 promotor by cloning and sequencing PCR products generated from normal and tumor tissues (Figure 3). The bisulfite-sequencing results corroborate the high methylation degree in normal samples and the demethylation of L1 promotor in tumor.



We concluded that the COBRA method is an efficient manner to study L1 hypomethylation in tumor specimens with enormous advantages compared with Southern blot analysis. The high incidence of L1 hypomethylation in head and neck and colon cancer justifies its application as a tumor marker.

Acknowledgment

We thank Dr. Guilherme Garcia-Manero for review this paper. This work was supported by grants from FAPESP (Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) number 99/09368-1 and 00/12361-8.

References

- Alves G, Tatro A, Fanning T. (1996). Gene, **176**, 39-44.
- Becker KG, Swergold GD, Ozato K, Thayer RE. (1993). Hum. Mol. Genet., **2**, 1697-1702.
- Fanning TG, Singer MF. (1987). Biochim. Biophys. Acta, **910**, 203-212.
- Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. (1999). Br. J. Cancer, **80**, 1312-1321.
- Gonzalzo ML, Liang G, Spruck CH 3rd, Zingg JM, Rideout WM 3rd, Jones PA. (1997). Cancer Res., **57**, 594-599.
- Hendrich B, Bird A. (1998). Mol. Cell Biol., **18**: 6538-6347.
- Jones PA. (1996). Cancer Res., **56**, 2463-2467.
- Ostertag EM, DeBerardinis RJ, Goodier JL, Zhang Y, Yang N, Gerton GL, Kazazian HH Jr. (2002). Nat. Genet., **32**: 655-660.
- Schulz WA, Elo JP, Florl AR, Pennanen S, Santourlidis S, Engers R, Buchardt M, Seifert HH, Visakorpi T. (2002). Genes Chromosomes Cancer, **35**, 58-65.
- Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. (2000). Jpn. J. Clin. Oncol., **30**: 306-309.

Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. (1999). *Cancer Res.*, **59**, 2307-2312.

Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**: 7810-7816.

Xiong Z, Laird PW. (1997). *Nucleic Acids Res.*, **25**: 2532-2534.

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. (1997). *Trends Genet.*, **13**: 335-340.

Figure Legends

Figure 1. A, Restriction map of L1 promotor. Methylation of the L1 promotor was investigated by COBRA assay (Xiong and Laird, 1997), which explores bisulfite-induced restriction fragment length polymorphisms where just methylated bands are digested by restriction enzymes. Bisulfite treatment was performed as reported by Toyota *et al.* (1999). We used the primers L1/F 5'-TTGAGTTGTGGTGGGTTTTATTAG-3' and L1/R 5'-TCATCTCACTAAAAAATACCAAACA-3' to amplify fragments of 413 bp, which were cleaved into fragments of 285 bp, 247 bp, 166 bp, 128 bp and 38 bp by digestion with *HinfI* restriction enzyme. Digested PCR products were separated by electrophoresis on 6% polyacrylamide gels. Gels were stained with ethidium bromide, imaged, and quantitated in a Bio-Rad Geldoc 2000 imager (Bio-Rad, Hercules, CA). The methylation density for each sample was computed as a ratio of the density of the digested band to the density of all bands in a given lane. B, Representative image of polyacrylamide gels. The smaller fragment 38 bp in length cannot be visualized under the running conditions utilized. As expected, a lower degree of methylation was observed in HNSCC samples compared with normal oral mucosa. The matched tumor

and normal colon reinforce the hypomethylation in cancer tissue. Nineteen tumor specimens were obtained from patients diagnosed with HNSCC between 1999 and 2000 at the Department of Surgery, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil and Department of Head & Neck and Skull Base Surgery, Arnaldo Vieira de Carvalho Hospital, São Paulo, Brazil. Normal oral mucosa tissue was obtained from six healthy individuals. Nine matched pair of normal and tumor colon specimens were obtained from patients treated at the University of Texas M. D. Anderson Cancer Center (Houston, TX). All patients gave written informed consent under approved protocol according to institutional guidelines. Cancer cell lines from colon (HCT 116, DLD-1, HT-29, LoVo), breast (MDA-MB-435S), lung (NCI-H249, Hut64), liver (HepG2) and leukemia (HL-60) were obtained from the American Type Culture Collection. DNA from all specimens and cell lines were obtained by treatment with proteinase K and phenol-chloroform extraction. OM= oral mucosa; HNSCC = head and neck squamous cell carcinoma; CT= colon tumor; CN= normal colon.

Figure 2. A, Graphic representation of methylation density in normal oral mucosa (OM = oral mucosa), head and neck tumors (HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma) and cancer cell lines from different tissues. The cancer cell lines exhibited more severe demethylation of L1 elements. B, Matched cancer and normal tissue from colon cancer patients. The methylation degree was lower in cancer tissue compared to normal tissue in all cases.

Figure 3. Methylation status of the CpG island in L1 promotor in HNSCC, normal oral mucosa and matched tumor and normal colon tissue. Genomic DNA was modified by sodium bisulfite. Primers L1/F and L1/R were used to amplify a 413 bp region

contained 32 CpG sites (the 3 first sites are not represented). PCR products were cloned in TOPO TA vector (Invitrogen) and five independent clones were sequenced using the L1/F primers. Each circle in the figure represents a single CpG site. Five independent clones were sequenced for each sample. ● = C (cytosine, 100% methylation); ○ = T (thymidine, 0% methylation); ↑ = HinfI restriction site.

Figure 1A

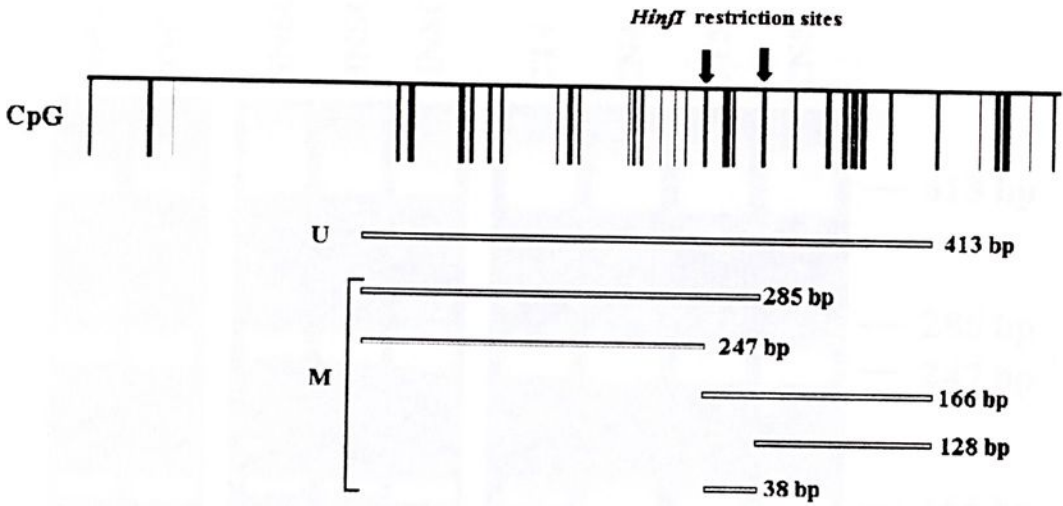


Figure 1B

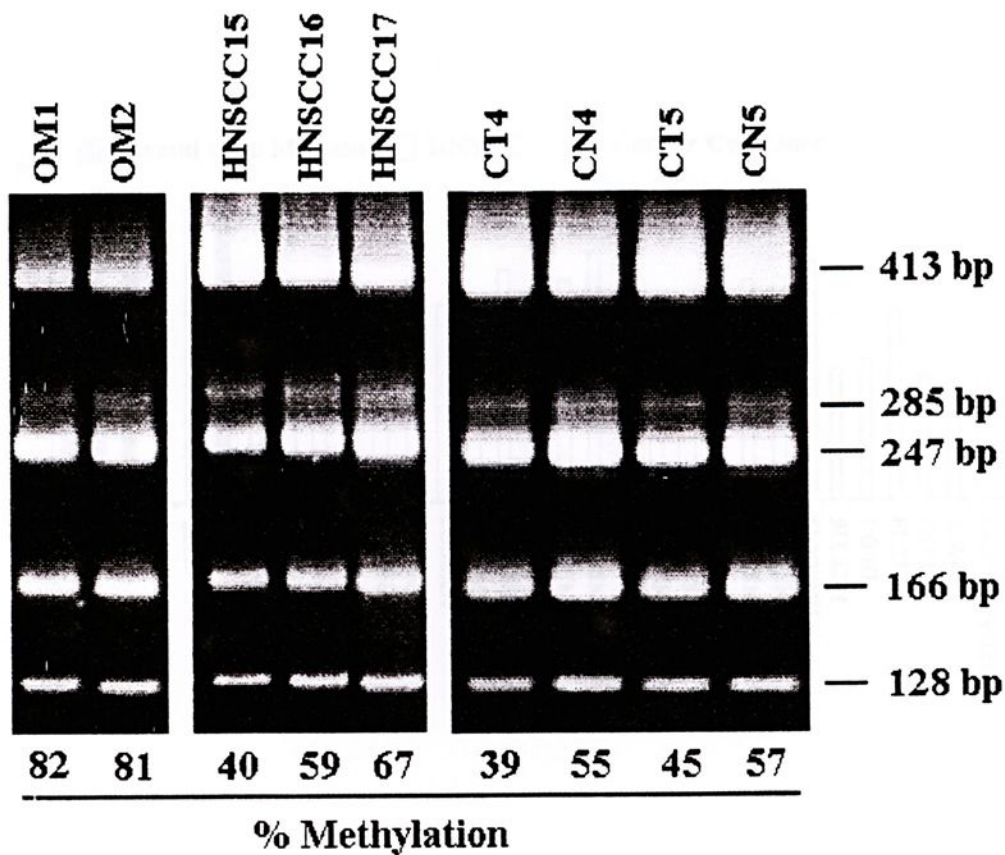


Figure 2A

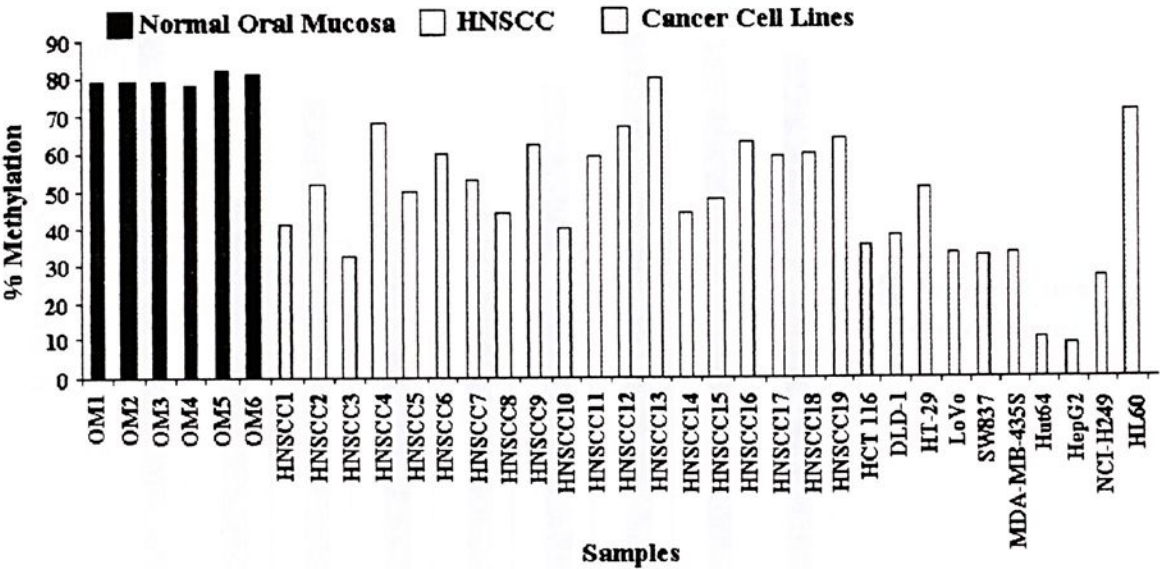


Figure 2B

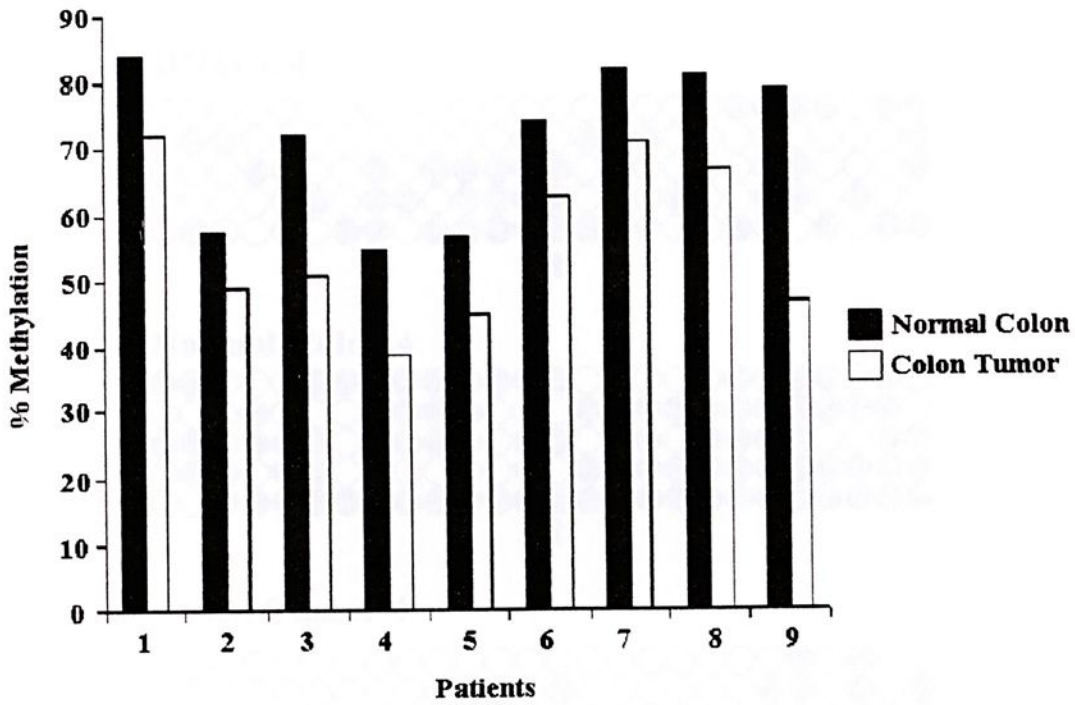
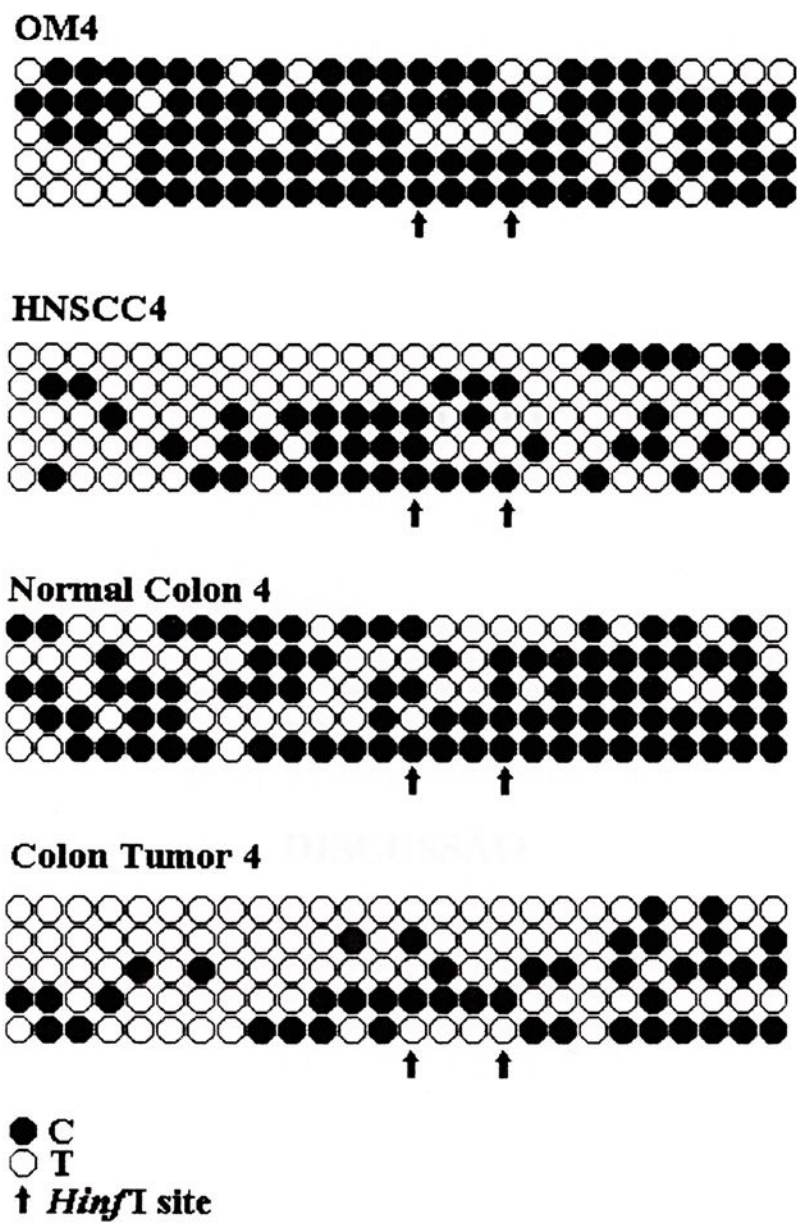


Figure 3



Capítulo IV

DISCUSSÃO



O objetivo geral do presente trabalho foi a identificação de marcadores moleculares de metilação em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (HNSCC). Para alcançar tal objetivo, foi utilizado o método de AP-PCR associado à digestão prévia do DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação (MS/AP-PCR, *methylation-sensitive arbitrarily primed PCR*). Esse método foi introduzido por Gonzalgo *et al.* (1997) com a proposta de gerar *fingerprintings* que identificassem genes sujeitos à metilação diferencial em tecidos normais e neoplásicos. Utilizando os mesmos iniciadores descritos por esses autores, foram detectados dez fragmentos diferencialmente metilados (DiMe, *Differentially Methylated*), dois deles hipermetilados e os demais hipometilados nos HNSCC estudados. A lista completa desses fragmentos DiMe está apresentada no Capítulo II. As seqüências hipermetiladas apresentaram ilhas CpG internas ou no DNA adjacente a elas, enquanto as hipometiladas estavam mapeadas em regiões pobres em CG. Essas características eram esperadas uma vez que a hipermetilação ocorre freqüentemente nas ilhas CpG dos promotores gênicos e a hipometilação, por outro lado, afeta as demais regiões do genoma.

A identidade dos fragmentos DiMe foi determinada utilizando o programa BLAST do *National Cancer Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Com essa análise, os fragmentos hipermetilados foram mapeados em 9q33.2 e 20q13.3 e os hipometilados em 2p25.3, 6p25.3, 7q22.1, 11q23.3, 15q15.1, 20q13.2 e Xq26.3. Entre os hipometilados, foi observado o elemento transponível LINE-1 (L1), cuja localização cromossômica não pôde ser determinada com exatidão em função de sua característica altamente repetitiva, estimada em até 500.000 cópias por genoma humano (Fanning and Singer, 1997; Ostertag *et al.*, 2002). O fragmento mapeado em 2p25 (*H. sapiens differentially methylated fragment, E*) foi anteriormente descrito por Gonzalgo *et al.* (1997) como



hipometilado em experimentos de MS/AP-PCR com tumores de cólon e referido como homólogo a repetições do tipo Alu. Esse achado, somado aos dados do presente trabalho, indica que o silenciamento dos elementos parasitas do genoma, como as inserções SINE e LINE, ocorre em mais de um tipo tumoral (Hagan and Rudin, 2002).

Alguns dos fragmentos presentemente identificados exibem alta similaridade a genes conhecidos, como o *LHX6* em 9q33.2, o *NFATC2* em 20q13.2 e o *IL10RA* em 11q23.3. Entretanto, o papel das alterações de metilação identificadas por MS/AP-PCR na expressão desses genes é incerto, pois mesmo os fragmentos associados a ilhas CpG estão fora da região promotora. Esse assunto foi abordado no Capítulo II e será discutido posteriormente nessa seção.

A utilização dos locos identificados como marcadores tumorais depende de sua validação por métodos gene-específicos como, por exemplo, por *Southern blot* (Gonzalzo *et al.*, 1997; Kohno *et al.*, 1998). Recentemente, metodologias empregando PCR tornaram tal investigação mais sensível e compatível com a análise de amostras clínicas. Esses métodos utilizam DNA modificado por bissulfito de sódio, que altera as citosinas para uracila por desaminação hidrolítica, mas não afeta as citosinas metiladas, que são resistentes à sulfonação (Clark *et al.*, 1994). O DNA tratado é então utilizado em PCR. Entre essas metodologias estão a MSP (*Methylation-Specific PCR*), desenvolvida por Herman *et al.* (1996), e a COBRA (*COmbined Bisulfite Restriction Analysis*), descrita por Xiong e Laird (1997).

No presente trabalho, para confirmação do estado de metilação dos fragmentos hipermetilados em HNSCC, foi selecionado o DiMe-6, dada a sua proximidade à região 5' da ilha CpG mapeada no *intron* 4 do gene *LHX6* e à região 5' de um gene predito com sentido oposto ao *LHX6*. O gene predito foi avaliado pelos programas *Genscan* e *Twinscan* e possui dois *exons*. Próxima ao segundo exon, está descrita uma EST



(número de acesso no *GenBank* AW629363) que contém um sítio de poliadenilação e uma cauda poliA, o que aumenta a confiabilidade na existência de um gene nessa região. Se tal gene for realmente transcrito, a ilha CpG associada ao fragmento DiMe-6 pode ter papel regulatório em sua expressão.

Utilizando iniciadores desenhados para realização do método COBRA, um *amplicon* de 160 pares de base (pb) foi gerado pela PCR, correspondendo à região 5' da ilha CpG associada ao fragmento DiMe-6. Após restrição com a enzima *TaqI*, um fragmento com 129 pb foi visualizado nos casos com hipermetilação.

Inicialmente, foram testados DNAs obtidos de linhagens celulares de HNSCC, que mostraram uma alta densidade de metilação em 12 das 13 linhagens analisadas. Em seguida, foram testados DNAs de mucosa oral normal, que exibiram valores inferiores a 7% de metilação. O valor de 10% foi, por esse motivo, empregado como linha de corte na determinação das amostras positivas.

Em tumores primários de cabeça e pescoço, foi verificada hipermetilação em 21 de 32 (65,6%) casos estudados. As amostras de tecido normal adjacente ao tumor exibiram uma densidade de metilação mais alta que a observada em mucosa oral normal, indicando que a hipermetilação precede a transformação maligna nesse tecido. A densidade de metilação do fragmento DiMe-6 nas amostras testadas está apresentada no Anexo 1, bem como as características clínicas e demográficas dos pacientes portadores de HNSCC.

Os trabalhos sobre metilação do DNA em HNSCC realizadas até o presente têm utilizado painéis de genes escolhidos por sua função biológica e por apresentarem alterações em outros tipos tumorais. Ogi *et al.* (2002), por exemplo, analisaram com o método COBRA o estado de metilação de 12 diferentes *loci* em 96 tumores primários da cavidade oral e encontraram frequências variando de 0% para os genes *CACNA1G*,



HRK e *hMLH1* até 29% para o gene *p16^{INK4a}*. Outros autores têm empregado a técnica de MSP para a investigação de hipermetilação do gene *p16^{INK4a}* em tumores orais e relataram mais de 50% dos pacientes com essa alteração (Shintani *et al.*, 2001; Kresty *et al.*, 2002), porém tais valores são discutíveis devido à alta frequência de resultados falso-positivos observados quando essa técnica é empregada.

Outros genes hipermetilados em 20% a 40% dos tumores de cabeça e pescoço são o *DAP-kinase*, o *CDH1* e o *RASSF1A* (Hasegawa *et al.*, 2002; Hogg *et al.*, 2002; Ogi *et al.*, 2002). A comparação dessas frequências com aquela presentemente observada para o fragmento DiMe-6 (próxima de 66%) confirma a importância deste marcador, que tem potencial para a identificação de portadores de HNSCC mais eficientemente que aqueles atualmente empregados. Da mesma forma, nos tumores aqui estudados, ocorre uma frequência inferior de metilação dos genes *p16^{INK4a}*, *RASSF1A*, *TIG1* e *hMLH1* quando utilizada a técnica MSP que do fragmento DiMe-6 (Anexo 2).

O estado de metilação do fragmento DiMe-6 foi também testado em um painel de linhagens celulares de diferentes tecidos (cólon, mama, leucemia, pulmão, fígado) e mostrou-se hipermetilado em todas as quatro linhagens celulares de cólon e em linhagens de todos os tecidos, exceto de fígado. Para confirmação desses dados em tumores primários que não os de cabeça e pescoço, foram investigadas 14 amostras de neoplasias de cólon pareadas com tecido normal do mesmo paciente. O DiMe-6 exibiu hipermetilação em 12 delas (85,7%) mas em nenhuma das amostras normais. Esses resultados falam fortemente a favor da utilização desse fragmento como um marcador de câncer em geral e indicam que, se incluído em um painel de genes investigados quanto ao estado de metilação, pode elevar a sensibilidade e a especificidade do teste.

Vários trabalhos recentes têm sugerido que o DNA tumoral pode ser encontrado no plasma de pacientes com câncer e servir como evidência da presença da doença

(Esteller *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1999). Em alguns casos, são encontradas alterações moleculares semelhantes àsquelas do tumor (Taback *et al.*, 2001; Sozzi *et al.*, 2001), entre elas mutações de ponto em genes específicos, instabilidade de microssatélites e perda de heterozigose. Como a metilação do DNA é freqüente e relativamente fácil de detectar, sua investigação no plasma circulante pode se tornar um teste diagnóstico importante em função de sua característica não-invasiva.

Por esses motivos, o estado de metilação do fragmento DiMe-6 foi analisado no DNA plásmático pelo método MSP em um subconjunto de pacientes e controles nos quais seu estado de metilação havia sido previamente determinado pelo método COBRA. Como citado anteriormente, o método MSP é altamente sensível, sendo capaz de detectar uma célula metilada entre 10.000. Embora tal sensibilidade possa levar a resultados falso-positivos em amostras de tumores pois revela alelos metilados em freqüência fisiológica irrelevante, em plasma torna-se confiável pela pequena fração de moléculas de DNA derivadas do tecido tumoral presentes nesse tipo amostra.

Nos casos estudados, o estado de metilação do DNA plasmático foi concordante com aquele observado na amostra tumoral do mesmo indivíduo, confirmando a aplicabilidade da análise de hipermetilação desse fragmento em DNA circulante. Tal resultado é excitante pois gera a possibilidade de detecção precoce e acompanhamento de indivíduos em risco de desenvolvimento de HNSCC com um método não-invasivo.

Uma outra observação importante sobre o fragmento DiMe-6 é que a sua densidade de metilação aumenta com a idade do paciente. Esse fenômeno foi descrito inicialmente por Issa *et al.*, (1994) quando da análise de metilação do gene do receptor de estrógeno *ESR1* em tumores de cólon. Posteriormente, Toyota *et al.* (1999) introduziram a definição de metilação câncer-dependente (tipo C) e idade-dependente (tipo A). Segundo essa definição, metilação do tipo C é observada apenas no tecido

tumoral enquanto do tipo A ocorre também no tecido normal de indivíduos idosos e é potencialmente um fator de susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores. Tal conceito aplica-se perfeitamente à mucosa de cólon e também a outros tipos tumorais, sendo bastante aceito que erros de metilação acompanham o processo de envelhecimento (Jones e Laird, 1999) e participam da tumorigênese.

No presente estudo, também foi investigada a expressão dos genes proximais ao fragmento DiMe-6 e sua resposta, em células tumorais cultivadas, ao tratamento com as drogas 5-aza-2'-desoxicitina (AZA), um agente desmetilante, e com tricotina A (TSA), um inibidor da desacetilase de histonas. A perda ou diminuição significativa da expressão foi encontrada tanto para o gene *LHX6* quanto para a EST *downstream* ao fragmento DiMe-6 nas amostras não tratadas. A restauração da transcrição por adição de AZA e TSA confirmou que o silenciamento desses genes é dependente de alterações epigenéticas.

O estado de metilação de um outro fragmento, o DiMe-5, foi também investigado. Grandes inserções Alu estão mapeadas *upstream* a esse fragmento, que está separado de uma ilha CpG *downstream* por 750 pb. O método COBRA foi aplicado para o DiMe-5 e para a ilha CpG *downstream*.

As análises foram realizadas inicialmente em sete linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço e em sete de tumores pulmonares, que apresentaram hipermetilação variando de 4 a 100%. As amostras de tumores primários de cabeça e pescoço estudadas também exibiram altos valores de hipermetilação. Entretanto, o mesmo resultado foi verificado em mucosa oral de indivíduos saudáveis. Esses achados não foram inesperados pois a sequência DiMe-5 esta localizada em uma região considerada *borderline*. Regiões desse tipo ficam próximas tanto de uma ilha CpG quanto de DNA repetitivo, que influenciam de modo instável seu estado de metilação.

Turker (2002) tem sugerido que o DNA repetitivo é um “centro” de metilação por apresentar seus sítios CpG metilados e, a partir deles, a metilação se espalha pelo genoma até encontrar cromatina em estrutura aberta, como são as ilhas CpG em seu estado normal. Nessa “borda”, o estado de metilação é variável. Aparentemente o fragmento DiMe-5 está mapeado em uma região como essa. Realmente, quando investigada a ilha CpG próxima a ele, nenhuma amostra apresentou hipermetilação. Esses dados não permitiram, portanto, sua inclusão como um marcador tumoral.

Dentre as seqüências hipometiladas, foram dedicados esforços na análise do elemento repetitivo LINE-1 (L1). Apesar do método de *Southern* ser empregado por vários autores, suas limitações não permitem análises de grande número de casos e de espécimens pequenos, dos quais volumes reduzidos de DNA são obtidos. Com a finalidade de superar essas dificuldades, foram desenhados experimentos COBRA para esse elemento repetitivo e avaliados DNAs de linhagens celulares tumorais, tecidos normais (mucosa oral e leucócitos) e tumores primários de cólon pareados com seu tecido normal. O produto de PCR obtido apresentou 413 pb e, após tratamento com a enzima de restrição *HinfI*, fragmentos de 285 pb, 247 pb, 166 pb e 128 pb foram indicativos de hipometilação.

Como pode ser observado no Capítulo 3, os valores de metilação do elemento L1 em tecidos normais variaram de 78 a 82%, enquanto, nas linhagens celulares tumorais, a variação foi de 29 a 91%. Esses resultados foram bastante satisfatórios, mostrando que o método COBRA foi eficiente na distinção de tecidos normais, com estados pobremente hipometilados do L1, e de linhagens celulares tumorais, com alta hipometilação. Os tumores primários de HNSCC também estavam hipometilados, sendo que 18 das 19 amostras testadas apresentaram densidade de metilação do L1 abaixo de 70%. Quando investigadas as amostras de tumores primários de cólon e seu tecido



normal correspondente, as diferenças de hipometilação foram significativas, atingindo valores até 59% de hipometilação a mais do que o observado no tecido normal. Tais achados justificam a aplicação da hipometilação do elemento L1 como marcador tumoral.

Em conclusão, os experimentos de AP-PCR sensível à metilação foram eficientes na identificação de seqüências genômicas diferencialmente metiladas em câncer que podem ser utilizadas como marcadores tumorais, cumprindo os objetivos do presente trabalho. Os dados obtidos abriram possibilidades para análises de ilhas CpG e de genes próximos a essas seqüências que devem auxiliar no entendimento da relação entre as modificações de seu estado de metilação e câncer.



Capítulo V

CONCLUSÕES

1. A eficiência do método MS/AP-PCR no rastreamento de alterações de metilação em carcinomas de cabeça e pescoço foi comprovada, tendo permitido a detecção de dez fragmentos diferencialmente metilados.
2. Tanto a hipermetilação quanto a hipometilação de DNA ocorrem em tumores de cabeça e pescoço e ambas as alterações são marcadores moleculares potenciais da tumorigênese.
3. O fragmento DiMe-6 representa um bom marcador tumoral não invasivo em HNSCC por apresentar metilação em DNA plasmático concordante com o DNA tumoral do mesmo paciente.
4. A regulação epigenética dos genes próximos ao fragmento DiMe-6 está alterada em células tumorais, como comprovado pela análise da expressão do gene *LHX6* e de gene desconhecido, mapeados em 9q33.2.
5. Os elementos transponíveis LINE-1 podem ser empregados no diagnóstico tumoral, estando hipometilados em mais de 90% dos tumores de cabeça e pescoço e cólon.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANNISTER, A. J.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J. F.; MISKA, E. A.; THOMAS, J. O.; ALLSHIRE, R. C.; KOUZARIDES, T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, v. 410, p. 120-124, 2001.
- BAYLIN, S. B.; ESTELLER, M.; ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; SCHUEBEL, K.; HERMAN, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation; chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.*, v. 10, p. 687-892, 2001.
- BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.*, v. 16, p. 168-174, 2000.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.*, v. 9, p. 2395-2402, 2000.
- BIRD, A. P.; WOLFFE, A. P. Methylation-induced repression--belts; braces; and chromatin. *Cell*, v. 99, p. 451-454, 1999.
- BOVENZI, V.; MOMPARLER, R. L. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, v. 48, p. 71-76, 2001.
- BROWN, R.; STRATHDEE, G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol. Med.*, v. 8, p. S43-S48, 2002.
- CAMERON, E. E.; BACHMAN, K. E.; MYOHANEN, S.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.*, v. 21, p. 103-107, 1999.
- CASIGLIA, J.; WOO, S. B. A comprehensive review of oral cancer. *Gen. Dent.*, v. 49, p. 72-82, 2001.
- CERVONI, N.; SZYF, M. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 40778-40787, 2001.
- CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, v. 21, p. 5483-5495, 2002.
- CLARK, S. J.; HARRISON, J.; PAUL, C. L.; FROMMER, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.*, v. 22, p. 2990-2997, 1994.
- ESTELLER, M.; SANCHEZ-CEPEDES, M.; ROSELL, R.; SIDRANSKY, D.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.*, v. 59, p. 67-70, 1999.

ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.*, v. 196, p. 1-7, 2002.

FANG, J. Y.; ZHU, S. S.; XIAO, S. D.; JIANG, S. J.; SHI, Y.; CHEN, X. Y.; ZHOU, X. M.; QIAN, L. F. Studies on the hypomethylation of c-myc; c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 11, p. 1079-1082, 1996.

FANNING, T. G.; SINGER, M. F. LINE-1: a mammalian transposable element. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 910, p. 203-212, 1987.

GARINIS, G. A.; PATRINOS, G. P.; SPANAKIS, N. E.; MENOUNOS, P. G. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum. Genet.*, v. 111, p. 115-127, 2002.

GONZALGO, M. L.; LIANG, G.; SPRUCK, C. H. 3RD.; ZINGG, J. M.; RIDEOUT, W. M. 3RD.; JONES, P. A. Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res.*, v. 57, p. 594-599, 1997.

GOODMAN, J. I.; WATSON, R. E. Altered DNA methylation: a secondary mechanism involved in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 42, p. 501-525, 2002.

HAGAN, C. R.; RUDIN, C. M. Mobile genetic element activation and genotoxic cancer therapy: potential clinical implications. *Am. J. Pharmacogenomics*, v. 2, p. 25-35, 2002.

HANADA, M.; DELIA, D.; AIELLO, A.; STADTMAUER, E.; REED, J. C. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, v. 82, p. 1820-1828, 1993.

HASEGAWA, M.; NELSON, H. H.; PETERS, E.; RINGSTROM, E.; POSNER, M.; KELSEY, K. T. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*, v. 21, p. 4231-4236, 2002.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 249, p. 55-74, 2000.

HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; MYOHANEN, S.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

HOGG, R. P.; HONORIO, S.; MARTINEZ, A.; AGATHANGGELOU, A.; DALLOL, A. FULLWOOD, P.; WEICHSELBAUM, R.; KUO, M. J.; MAHER, E. R.; LATIF, F. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the *RASSF1A* tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer*, v. 38, p. 1585-1592, 2002.

ISSA, J. P.; OTTAVIANO, Y. L.; CELANO, P.; HAMILTON, S. R.; DAVIDSON, N. E.; BAYLIN, S. B. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat. Genet.*, v. 7, 536-540, 1994.

ISSA, J. P. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann. N Y Acad. Sci.*, v. 910, p. 140-155, 2000.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. *Science*, v. 293, p. 1074-1080, 2001.

JONES, P. A.; LAIRD, P. W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat. Genet.*, v. 21, p. 163-167, 1999.

KOHNO, T.; KAWANISHI, M.; INAZAWA, J.; YOKOTA, J. Identification of CpG islands hypermethylated in human lung cancer by the arbitrarily primed-PCR method. *Hum. Genet.*, v. 102, p. 258-264, 1998.

KRESTY, L. A.; MALLERY, S. R.; KNOBLOCH, T. J.; SONG, H.; LLOYD, M.; CASTO, B. C.; WEGHORST, C. M. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer. Res.*, v. 62, p. 5295-5300, 2002.

KWONG, J.; LO, K. W.; TO, K. F.; TEO, P. M.; JOHNSON, P. J.; HUANG, D. P. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, v. 8, p. 131-137, 2002.

LACHNER, M.; O'CARROLL, D.; REA, S.; MECHTLER, K.; JENUWEIN, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, v. 410, p. 116-120, 2001.

LENGAUER, C.; ISSA, J. P. The role of epigenetics in cancer. DNA Methylation; Imprinting and the Epigenetics of Cancer--an American Association for Cancer Research Special Conference. Las Croabas; Puerto Rico; 12-16 December 1997. *Mol. Med. Today*, v. 4, p. 102-103, 1998.

LIANG, L.; KANDURI, C.; PILARTZ, M.; SVENSSON, K.; SONG, J. H.; WENTZEL, P.; ERIKSSON, U.; OHLSSON, R. Dynamic readjustment of parental methylation patterns of the 5'-flank of the mouse H19 gene during in vitro organogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 44, p. 785-790, 2000.

MELKI, J. R.; VINCENT, P. C.; BROWN, R. D.; CLARK, S. J. Hypermethylation of E-cadherin in leukemia. *Blood*, v. 95, p. 3208-3213, 2000.

NEIBERGS, H. L.; HEIN, D. W.; SPRATT, J. S. Genetic profiling of colon cancer. *J. Surg. Oncol.*, v. 80, p. 204-213, 2002.

OGI, K.; TOYOTA, M.; OHE-TOYOTA, M.; TANAKA, N.; NOGUCHI, M.; SONODA, T.; KOHAMA, G.; TOKINO, T. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, v. 8, p. 3164-3171, 2002.

OSTERTAG, E. M.; DEBERARDINIS, R. J.; GOODIER, J. L.; ZHANG, Y.; YANG, N.; GERTON, G. L.; KAZAZIAN, H. H. Jr. A mouse model of human L1 retrotransposition. *Nat. Genet.*, v. 32, p. 655-660, 2002.

REICHART, P. A. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin. Oral Investig.*, v. 5, p. 207-213, 2001.

REID, G. K.; BESTERMAN, J. M.; MACLEOD, A. R. Selective inhibition of DNA methyltransferase enzymes as a novel strategy for cancer treatment. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, v. 4, p. 130-137, 2002.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, v. 293, p. 1089-1093, 2001.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation; methyltransferases; and cancer. *Oncogene*, v. 20, p. 3139-3155, 2001.

ROBERTSON, K. D.; WOLFFE, A. P. DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.*, v. 1, p. 11-19, 2000.

ROSAS, S. L.; KOCH, W.; DA COSTA CARVALHO, M. G.; WU, L.; CALIFANO, J.; WESTRA, W.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. Promoter hypermethylation patterns of p16; O6-methylguanine-DNA-methyltransferase; and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.*, v. 61, p. 939-942, 2001.

ROUNTREE, M. R.; BACHMAN, K. E.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B. DNA methylation; chromatin inheritance; and cancer. *Oncogene*, v. 20, p. 3156-3165, 2001.

SHINTANI, S.; NAKAHARA, Y.; MIHARA, M.; UHEYAMA, Y.; MATSUMURA, T. Inactivation of the *p14(ARF)*; *p15(INK4B)* and *p16(INK4A)* genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.*, v. 37, p. 498-504, 2001.

SONG, S. H.; JONG, H. S.; CHOI, H. H.; INOUE, H.; TANABE, T.; KIM, N. K.; BANG, Y. J. Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.*, v. 61, p. 4628-4635, 2001.

SOZZI, G.; CONTE, D.; MARIANI, L.; LO VULLO, S.; ROZ, L.; LOMBARDO, C.; PIEROTTI, M. A.; TAVECCHIO, L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Res.*, v. 61, p. 4675-4678, 2001.

TABACK, B.; FUJIWARA, Y.; WANG, H. J.; FOSHAG, L. J.; MORTON, D. L.; HOON, D. S. Prognostic significance of circulating microsatellite markers in the plasma of melanoma patients. *Cancer Res.*, v. 61, p. 5723-5726, 2001.

- TAMARU, H.; SELKER, E. U. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, v. 414, p. 277-283, 2001.
- TATE, P. H.; BIRD, A. P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 3, p. 226-231, 1993.
- TOYOTA, M.; AHUJA, N.; OHE-TOYOTA, M.; HERMAN, J. G.; BAYLIN, S. B.; ISSA, J. P. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 96, p. 8681-8686, 1999.
- TURKER, M. S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene*, v. 21, p. 5388-5393, 2002.
- TYLER, J. K.; KADONAGA, J. T. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell*, v. 99, p. 443-446, 1999.
- VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol.*, v. 3, p. 755-763, 2002.
- VIRMANI, A. K.; TSOU, J. A.; SIEGMUND, K. D.; SHEN, L. Y.; LONG, T. I.; LAIRD, P. W.; GAZDAR, A. F.; LAIRD-OFFRINGA, I. A. Hierarchical clustering of lung cancer cell lines using DNA methylation markers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, v. 11, p. 291-297, 2002.
- WADE, P. A. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays*, v. 23, p. 1131-1137, 2001.
- WONG, I. H.; LO, Y. M.; ZHANG, J.; LIEW, C. T.; NG, M. H.; WONG, N.; LAI, P. B.; LAU, W. Y.; HJELM, N. M.; JOHNSON, P. J. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.*, v. 59, p. 71-73, 1999.
- WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 31, p. 443-449, 2002.
- XIONG, Z.; LAIRD, P. W. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, p. 2532-2534, 1997.
- YODER, J. A.; WALSH, C. P.; BESTOR, T. H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, v. 13, p. 335-340, 1997.

RESUMO

O tumor de cabeça e pescoço é uma doença frequentemente fatal e, até o presente, poucos marcadores moleculares para essa condição foram identificados. Um padrão anormal de metilação do DNA ocorre em genes específicos em quase todas as neoplasias, sugerindo que essa alteração pode ser utilizada como um biomarcador em câncer. Nós aplicamos o método MS/AP-PCR para isolar seqüências diferencialmente metiladas em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (HNSCC) e, comparando tecido tumoral e normal, detectamos 2 bandas hipermetiladas nos tumores mas não na mucosa normal e 8 bandas hipometiladas. A análise de seqüências revelou que os fragmentos hipometilados incluíam repetições Line-1 e tinham identidade significativa com seqüências dos cromossomos humanos 2, 6, 7, 9, 11, 15, 20 e X. O fragmento mais frequentemente hipermetilado, que nós denominamos DiMe-6, revelou ter 269 pb e estar mapeado próximo a uma ilha CpG, na região cromossômica 9q33.2. Utilizando o método COBRA, esse fragmento foi encontrado hipermetilado em 12 de 13 (92,3%) linhagens celulares de cabeça e pescoço estudadas e em 15 de 32 (65,6%) tumores primários. Os tecidos normais correspondentes, obtidos dos pacientes com HNSCC, apresentaram densidade de metilação inferior à amostra tumoral. A metilação aberrante do DiMe-6 no DNA do plasma acompanhou o padrão observado na amostra neoplásica mas nenhum controle exibiu padrão aberrante. Nós ampliamos a investigação deste fragmento para linhagens celulares de outros tecidos e foi observada hipermetilação naquelas derivadas de tumores de cólon, mama, pulmão e leucemia promielocítica aguda. Estudando um painel composto por 14 tumores primários de cólon pareados com seu tecido normal, um alto grau de metilação foi detectado em 12 amostras tumorais mas não em amostras normais. Nós também investigamos a hipometilação do LINE-1. Utilizando um painel de linhagens celulares tumorais, tumores primários de cabeça e pescoço e de cólon como modelos, observamos que a hipometilação do LINE-1 é uma alteração comum em câncer, presente em mais de 90% dos casos. Esses achados são sugestivos de que a hipermetilação do fragmento DiMe-6 e a hipometilação do LINE-1 podem representar marcadores tumorais de câncer de cabeça e pescoço bem como de outros tipos de neoplasias e confirmam a importância de alterações epigenéticas como marcadores moleculares de diagnóstico em câncer.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, metilação do DNA; marcadores moleculares.



ABSTRACT

Head and neck cancer is a morbid and often fatal disease and at the present time few effective molecular markers have been identified. An abnormal pattern of DNA methylation occurs at specific genes in almost all neoplasms, suggesting that this alteration can be used as a molecular marker in cancer. We have applied the MS/AP-PCR method to isolate sequences differentially methylated in head and neck squamous cell carcinomas. Comparing cancer tissue to normal mucosa, we found 2 bands hypermethylated in tumor but not in normal mucosa and 8 bands were hypomethylated. Sequence analysis revealed these hypomethylated fragments contained Line-1 repeats and had significant matches with sequences on human chromosomes 2, 6, 7, 9, 11, 15, 20 and X. The most frequently hypermethylated fragment, that we have called DiMe-6, was 269 bp in length and maps close to a CpG island on chromosome 9q33.2. By using COBRA analysis, methylation of this fragment was detected in 12 of 13 (92.3%) head and neck cell lines studied and 21 of 32 (65.6%) primary tumors. Matched normal tissue from HNSCC patients presented lower methylation than tumor sample. Aberrant methylation of DiMe-6 in plasma DNA was all accompanied with methylation in the corresponding tumor samples. None of the control plasma showed aberrant methylation. We extended the investigation of the methylation status of this fragment to other cancer cell lines and methylation was found in those derived from colon, breast, acute promyelocytic leukemia and lung. Studying a panel composed of 14 primary colon tumors matched with their normal tissue, a high degree of methylation was detected in 12 tumor specimens but not in the normal samples. Additionally, we investigated the LINE-1 hypomethylation. Using a panel of cancer cell lines, primary head and neck and colon tumors as a model, we found that hypomethylation of LINE-1 is a very common dysregulation in cancer, representing more than 90% of the cases. These findings suggest that DiMe-6 hypermethylation and LINE-1 hypomethylation can represent cancer markers in head and neck cancer as well as in other kinds of neoplasias and confirm the importance of epigenetic dysregulation as molecular marker to tumor diagnosis.

Keywords: head and neck cancer; DNA methylation; molecular marker

ANEXO 1

Características clínicas e demográficas de pacientes portadores de HNSCC estudados e densidade de metilação do fragmento DiMe-6 e do elemento transponível LINE-1 determinada pelo método COBRA.

Código	Sítio Anatômico	TNM	Idade	Sexo	Fumo	Álcool	DiMe-6 M%	LINE-1 M%
1	Cavidade Oral	T3N2M0	38	M	Sim	Sim	2	NA
2	Cavidade Oral	T3N1M0	49	M	Sim	Sim	21	41
3	Cavidade Oral	T2N0N0	75	F	Sim	Não	67	52
4	Cavidade Oral	T2N0M0	55	M	Sim	Sim	91	32
5	Cavidade Oral	T4N1M0	77	M	Sim	Sim	66	68
6	Cavidade Oral	T4N0M0	49	M	Sim	Sim	4	NA
7	Cavidade Oral	T2N0M0	52	M	Sim	Sim	11	NA
8	Cavidade Oral	T4N1M0	55	F	Não	Não	27	NA
9	Cavidade Oral	T4N1M0	70	M	Sim	Sim	13	NA
10	Cavidade Oral	T2N0M0	65	F	Não	Não	26	50
11	Cavidade Oral	T3N0M0	76	F	Sim	Sim	24	60
12	Cavidade Oral	T3N1M0	48	M	Sim	Sim	5	53
13	Orofaringe	T4N1M0	60	M	Sim	Sim	50	44
14	Orofaringe	T3N0M0	39	M	Sim	Sim	7	62
15	Orofaringe	T3N0M0	62	M	Sim	Sim	7	40
16	Orofaringe	T4N2M0	60	M	Sim	Sim	6	59
17	Orofaringe	T2N1M0	34	M	Sim	Sim	7	67
18	Orofaringe	T4N2M0	60	M	Sim	Sim	34	80
19	Laringe	T4N2Mx	47	M	Sim	Sim	3	44
20	Laringe	T4N0M0	56	M	Sim	Sim	14	48
21	Laringe	T1N0M0	45	M	Sim	Não	14	63
22	Laringe	T4N0M0	55	M	Sim	Sim	10	NA
23	Laringe	T4N0M0	50	M	Sim	Sim	5	59
24	Laringe	T4N0M0	55	M	Sim	Não	21	60
25	Laringe	T3N1Mo	59	M	Sim	Não	34	NA
26	Laringe	T2N0M0	57	M	Sim	Sim	25	NA
27	Laringe	T2N0M0	80	M	Sim	Não	0	NA
28	Laringe	T1N0M0	53	M	Sim	Sim	70	NA
29	Laringe	T4N0M0	71	M	Sim	Sim	21	64
30	Laringe	T4N2M0	46	M	Sim	Sim	6	NA
31	Laringe	T4N0M0	72	M	Sim	Sim	51	NA
32	Laringe	T4N0M0	44	M	Sim	Sim	10	NA

NA = não analisado

ANEXO 2

Representação gráfica dos resultados da análise de metilação dos genes *p16^{INK4a}*, *RASSF1A*, *TIG1* e *hMLH1* (MSP) e do fragmento DiMe-6 (COBRA). NA = não analisado, M/T = número de genes metilados em relação ao número de genes analisado por amostra, U = não metilado, M = metilado.

Patient	<i>p16INK4A</i>	<i>RASSF1A</i>	<i>TIG1</i>	<i>hMLH1</i>	DiMe 6	M/T
HNSCC5						5/5
HNSCC6						3/5
HNSCC18				NA		3/4
HNSCC15						2/5
HNSCC31						2/5
HNSCC7						2/5
HNSCC2				NA		2/4
HNSCC29				NA		2/4
HNSCC4				NA		2/4
HNSCC13			NA	NA		2/3
HNSCC24		NA	NA	NA		2/2
HNSCC22	NA	NA	NA	NA		1/1
HNSCC26	NA	NA	NA	NA		1/1
HNSCC25	NA	NA	NA			1/2
HNSCC20			NA	NA		1/3
HNSCC21			NA	NA		1/3
HNSCC32			NA	NA		1/3
HNSCC10				NA		1/4
HNSCC23				NA		1/4
HNSCC28			NA			1/4
HNSCC3				NA		1/4
HNSCC11						1/5
HNSCC8						1/5
HNSCC9						1/5
HNSCC14						0/5
HNSCC16						0/5
HNSCC17						0/5
HNSCC30						0/5
HNSCC12						0/4
HNSCC19			NA			0/4
HNSCC1		NA	NA	NA		0/2
HNSCC27	NA	NA	NA			0/2
n	28	26	20	17	32	
Freq. Absoluta	7	2	8	2	21	
Freq. Relativa	25.5%	7.7%	40.0%	11.80%	65.6%	

U
M

Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 24 de Março de 2003.

Marcos R. H. Estécio

Marcos Roberto Higino Estécio



