

Marília de Freitas Calhaz

ANÁLISE DE METILAÇÃO EM MÚLTIPLOS
GENES EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO



1910001374



ANÁLISE DE METILAÇÃO EM MÚLTIPLOS GENES EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Marilia de Freitas Calmon

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**

São José do Rio Preto - SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto
Programa de Pós – Graduação em Genética

ANÁLISE DE METILAÇÃO EM MÚLTIPLOS GENES EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Marilia de Freitas Calmon



T. 1374/05

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal

São José do Rio Preto – SP
Fevereiro de 2005

40101045

4616.006.6

C164a

04/04/2005

Doação

R\$ 24,00

AUTOR(A)

076/2005

100/05

Calmon, Marília de Freitas.

Análise de metilação em múltiplos genes em câncer de cabeça e
pescoço / Marília de Freitas Calmon – São José do Rio Preto : [s.n.],
2005

95 f.: il. ; 30 cm.

Orientador: Paula Rahal

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética. 2. Metilação. 3. Cabeça - Câncer. 4. Pescoço - Câncer.
5. Marcadores biológicos. I. Rahal, Paula. II. Universidade Estadual
Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616-006.6



MARILIA DE FREITAS CALMON

**ANÁLISE DE METILAÇÃO EM MÚLTIPLOS GENES EM CÂNCER DE
CABEÇA E PESCOÇO**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador:

2º Examinador

3º Examinador

*"Aos meus pais, à minha
irmã e ao Eduardo".*

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

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me permitido cursar a turma que eu escolhi, em uma faculdade onde conheci várias pessoas que, por muitas razões, ficaram para sempre em minha memória e no meu coração.

A prof. Dra. Paula Kubal, uma profissional atenciosa e receptiva, que me orientou durante o mestrado e me ensinou muito sobre profissionalismo, humildade e persistência para alcançar os objetivos e acabou se tornando uma pessoa muito especial e minha amiga.

A prof. Dra. Otília Caballero, que possibilitou o desenvolvimento de parte da minha pesquisa de projeto de mestrado.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em minhas decisões, me deram muita força nos meus momentos de decisões pessoais e profissionais e sempre fizeram a possível para me ver feliz.

A minha irmã, que embora distante, sempre esteve ao meu lado nos momentos felizes e alegres da minha vida.

**“Aos meus pais, à minha
irmã e ao Eduardo”.**

A minha mãe e ao meu tio Cláudio, que sempre me ajudaram e me deram muita força quando eu preciso e a toda a minha família que sempre pode contar.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS por ter me permitido cursar o curso que eu escolhi, em uma faculdade onde conheci várias pessoas que, por motivos variados, ficarão para sempre em minha memória e no meu coração.

À prof.^a Dra. Paula Rahal, uma profissional atenciosa e receptiva, que me orientou durante o mestrado e me ensinou muito sobre profissionalismo, humildade e persistência para alcançar os objetivos e acabou se tornando uma pessoa muito especial e minha amiga.

À prof.^a Dra. Otávia Caballero, que possibilitou o desenvolvimento de parte da minha pesquisa do projeto de mestrado.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram em minhas decisões, me deram muita força nos meus momentos de decisões pessoais e profissionais e sempre fizeram o possível para me ver feliz.

À minha irmã, que embora distante, sempre esteve ao meu lado nos momentos tristes e alegres da minha vida, nunca deixando me sentir sozinha.

À minha avó e ao meu tio Cláudio, que sempre me ajudam e me deram muita força quando eu preciso e a toda a minha família que sempre pude contar.



Ao meu namorado Eduardo, que conheci em Londrina, onde passamos momentos felizes e inesquecíveis.

À Dra. Fátima Pereira de Souza, uma pessoa iluminada que me ajudou a trilhar o maravilhoso caminho da biologia molecular, me ensinando e me auxiliando nos testes e na prática do dia a dia laboratorial.

Ao Fabrício Carvalho, um grande amigo que fiz no Instituto Ludwig, e as pessoas que trabalham com ele no laboratório, que me acolheram e assim possibilitaram o desenvolvimento de parte da minha pesquisa.

Aos colegas do laboratório do IBILCE, que me ensinaram que o laboratório, além de ser um ambiente de trabalho, também deve ser um ambiente onde a alegria, confiança e a amizade são cultivadas.

À Camila Domit e Renata Stolf, que se tornaram mais que minhas amigas e sim minhas irmãs, pois sei que nossas amizades serão eternas e que sempre poderei contar com elas assim como elas sempre poderão contar comigo para qualquer coisa.

Ao Teco, Pitoca, Nero, Spike e Alfredo, que são meus “amiguinhos” e nunca me deixam ficar desanimada quando estou ao lado deles.

MUITO OBRIGADA!!!



LISTA DE ABREVIATURAS:

INCA: Instituto Nacional do Câncer

TNM: Sistema de estadiamento clínico. TNM é a abreviação para tumor (T),

linfonodos (node, em inglês -N) e metástases (M).

SAM: S-adenosilmetionina

BRCA1: Breast Cancer 1

hMLH1: Colon Cancer

GSTP1: Glutathione S-transferase p1

MGMT: O⁶-methylguanine DNA-methyltransferase

CDH1: cadherin 1 ou E-cadherin

TIMP3: Tissue inhibitor of Metalloproteinase 3

DAPI: Proteína Quinase associada à morte

Rb: Retinoblastoma

MDM2: p53 binding protein

p53: Gene supressor de tumor p53

Ras: v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral

p14^{ARF}: Gene supressor de tumor p14p16^{INK4a}: Gene supressor de tumor p16

p53: Gene supressor de tumor p53

pRb: retinoblastoma 1

CDK4: Ciclina dependente de quinase 4

CDK6: Ciclina dependente de quinase 6

E-CAD: E-caderina

***“É melhor tentar e falhar, que
preocupar-se e ver a vida passar.***

***É melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.***

***Eu prefiro na chuva caminhar, que em
dias tristes em casa me esconder.***

***Prefiro ser feliz, embora louco, que
em conformidade viver.”***

Martin Luther King

LISTA DE ABREVIATURAS:

INCA: Instituto Nacional do Câncer

TNM: Sistema de estadiamento clínico, TNM é a abreviação para tumor (T), linfonodos (node, em inglês - N) e metástases (M).

SAM: S-adenosilmetionina

BRCA1: Breast câncer 1

hMLH1: Colon Cancer

GSTP1: Glutathione S-transferase pi

MGMT: O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase

CDH1: cadherin 1 ou E-cadherin

TIMP3: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3

DAPK: Proteína Quinase associada à morte

Rb: Retinoblastoma

MDM2: p53 binding protein

p53: Gene supressor de tumor p53

Ras: v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

p14^{ARF}: Gene supressor de tumor p14

p16^{INK4A}: Gene supressor de tumor p16

p53: Gene supressor de tumor p53

pRb: retinoblastoma 1.

CDK4: Ciclina dependente de quinase 4

CDK6: Ciclina dependente de quinase 6

E-CAD: E-caderina



ADAM23: A Desintegrina e Metaloprotease domínios 23

PCR: Reação de polimerização em cadeia

MSP: Reação de polimerização em cadeia metilação específica

Ms-SNuPE: extensão de oligonucleotídeo de nucleotídeo sensível a metilação

McCOBRA: melting curve combined bisulphite restriction analysis

COBRA: combined bisulphite restriction analysis

SNaPmeth: single nucleotide polymorphism methylation

APC: Adenomatosis Polyposis Coli

II - Objetivos

III - Fatores Genéticos e Epigenéticos na Carcinogênese

IV - Artigo que será submetido a publicação

V - Discussão

VI - Conclusões

VII - Referências bibliográficas

VIII - Resumo

IX - Abstract



SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	viii
I - INTRODUÇÃO	10
1.1 Câncer e Metilação	11
1.2 Genes supressores de tumor <i>p14</i> e <i>p16</i>	20
1.3 Gene de reparo de DNA <i>MGMT</i>	21
1.4 Gene <i>DAPK</i> – Proteína Quinase Associada à Morte	22
1.5 Gene <i>E-CADERINA</i> (<i>Caderina E</i>) - <i>E-CAD</i>	23
1.6 Gene <i>ADAM23</i>	24
II - Objetivos	26
III - Fatores Genéticos e Epigenéticos na Carcinogênese	28
IV - Artigo que será submetido à publicação	37
V - Discussão	59
VI - Conclusões	70
VII -Referências bibliográficas	73
VIII - Resumo	92
IX - Abstract	94



1.1 Câncer e metástase

A carcinogênese é um processo de aquisição de anormalidades genéticas e epigenéticas que levam à disfunção celular. No desenvolvimento de câncer, as células adquirem uma transformação atípica, tal expressão o aumento anormal de genes que são comuns às células normais, sendo tal diferença a marca do

INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte entre os 45 e 64 anos de idade (INCA, 2003). Segundo dados estatísticos elaborados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), indicam que foram registradas no Brasil 402.190 casos novos e 126.960 mortes pela doença em 2002, para o sexo masculino são esperados 229.610 casos novos, enquanto que, para o sexo feminino são esperados 237.810 casos novos, sendo que do total destas estimativas, 13.880 serão casos de câncer de cabeça e pescoço (INCA, 2003).

O termo câncer de cabeça e pescoço descreve uma diversidade de cânceres de histologias distintas que ocorrem em vários sítios anatómicos (DAWSON & OKAMURA, 1990). Essa terminologia tem sido aplicada principalmente para aqueles cânceres que ocorrem em regiões como a cavidade oral, a orofaringe, hipofaringe e a laringe. Por causa da variabilidade de sítios anatómicos, da origem dos tecidos, da biologia de crescimento do tumor, dos padrões de metástases e limites de extensão do tumor, os sinais e sintomas da doença são muito variados (BAST et al., 2000).

1.1 Câncer e metilação

A carcinogênese é um processo de acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas que levam à disfunção celular. No desenvolvimento do câncer, as células adquirem uma organização atípica, não expressando o mesmo conjunto de genes que suas contrapartes normais, sendo tal diferença a marca do estado canceroso. O câncer é responsável pela principal causa de morte em indivíduos entre os 45 e 60 anos de idade (GO et al., 2001).

Atualmente, no Brasil, o câncer constitui a segunda causa de morte por doença. As estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil em 2003, elaboradas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), indicam que foram registrados no Brasil 402.190 casos novos e 126.960 mortes pela doença. Em 2005, para o sexo masculino são esperados 229.610 casos novos, enquanto que, para o sexo feminino são estimados 237.830 casos novos, sendo que do total desta estimativa, 13880 serão casos de câncer de cabeça e pescoço (INCA, 2005).

O termo câncer de cabeça e pescoço descreve uma diversidade de cânceres de histologias distintas que ocorrem em vários sítios anatômicos (DAWSON & OKAMURA, 1990). Esta terminologia tem sido aplicada primariamente para aqueles cânceres que ocorrem em regiões como a cavidade oral, a orofaringe, hipofaringe e a laringe. Por causa da variabilidade de sítios anatômicos, da origem dos tecidos, da biologia do crescimento do tumor, dos padrões de metástases e limites da extensão do tumor, os sinais e sintomas da doença são muito variados (BAST et al., 2000).



O processo da carcinogênese de cabeça e pescoço envolve interações dinâmicas entre vários fatores de risco. Aproximadamente 90% destes tumores ocorrem depois da exposição aos conhecidos carcinógenos como o tabaco, o fumo e substâncias como o betel. Sabe-se que o uso de álcool está intimamente ligado ao tabaco na carcinogênese e faz parte do grupo de agentes que podem potencializar a carcinogênese relacionada ao tabaco. Outros fatores importantes são os vírus, predisposição genética, ocupação, radiação e dieta (KULKARNI & SARANATH, 2004).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 30.000 pessoas foram diagnosticadas com câncer oral ou de faringe no ano de 2004. O câncer oral mata 1 pessoa por hora, 24 horas por dia e, dos 30.000 novos casos diagnosticados, somente metade viverá mais do que 5 anos. Durante décadas, o câncer oral acometeu mais homens do que mulheres, em uma proporção de 6:1. Esta proporção, atualmente, é de 2 homens para cada mulher que é diagnosticada com câncer oral. Esta mudança nas proporções, provavelmente ocorreu devido a mudanças no estilo de vida, principalmente com o aumento de mulheres fumantes ao longo das últimas décadas (Oral Cancer Foundation, 2004).

O estabelecimento do planejamento terapêutico dos carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço baseia-se principalmente no sistema de estadiamento TNM (BAATENBURG DE JONG et al., 2001; GROOME et al., 2001). Entretanto, alguns tumores que apresentam o mesmo estadiamento clínico demonstram padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de outros fatores complementares capazes de nortear com



maior precisão o prognóstico da doença (SANCHES-CESPEDEZ et al., 2000; ROSAS et al., 2001). Apesar das incessantes pesquisas focadas no comportamento biológico e nas características moleculares dos carcinomas da cabeça e pescoço, eles ainda persistem como um índice de morbidade sendo a detecção tardia o principal fator causal das baixas taxas de sobrevida. Entre os problemas enfrentados encontra-se a extensão das intervenções cirúrgicas e o alto índice de recidivas loco-regionais. A capacidade de delinear o curso da doença, bem como de detectá-la precocemente são fatores que contribuiriam para um aumento da sobrevida e da qualidade de vida dos pacientes (PARTRIDGE et al., 1999; PARTRIDGE et al., 2000).

A carcinogênese constitui um processo em múltiplos passos, caracterizando-se pela ocorrência ou acúmulo de alterações genéticas como: aneuploidia, perda de heterozigose, deleções, inserções, mutações pontuais, amplificação gênica e pelas alterações epigenéticas, as quais caracterizam-se por um processo herdado durante a divisão celular, sem a ocorrência de alterações na sequência do DNA (ESTELLER, 2000A; ESTELLER et al., 2000B; FEINBERG, 2001; SMIRAGLIA & PLASS, 2002). As mudanças no perfil da expressão gênica são evidentes em células cancerosas no nível genético, como por exemplo, mutações e no nível epigenético, como por exemplo, a inativação transcricional devido a metilação. Atualmente, sabe-se que os fatores epigenéticos são igualmente importantes nesse processo de muitos passos (JONES, 2003).

No genoma dos mamíferos, a metilação ocorre somente na citosina que está localizada na posição 5' para a guanina em uma ilha CpG.



Recentemente, considera-se ilha CpG toda a janela do genoma que possui 500 pares de bases com um conteúdo C:G de, pelo menos 55% e uma frequência observada sobre a esperada de CpG, de pelo menos 0,657 (LAIRD, 2003). O genoma humano contém, aproximadamente, 29.000 ilhas CpG, distribuídas em um padrão não aleatório, com preferência pelas regiões promotoras do primeiro éxon de genes codificadores de proteínas (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001). A metilação da citosina ocorre depois da síntese do DNA, pela transferência enzimática de um grupo metil do doador S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono da posição 5' na citosina (figura 1).

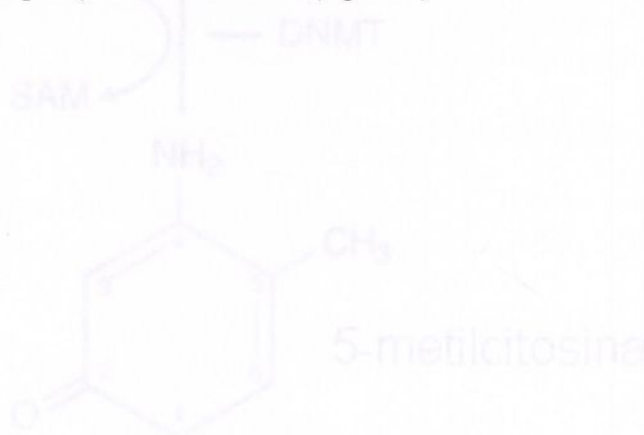


Figura 1 – Mecanismo de metilação que ocorre na citosina. Figura adaptada e modificada de Strahler e Brown (2004).

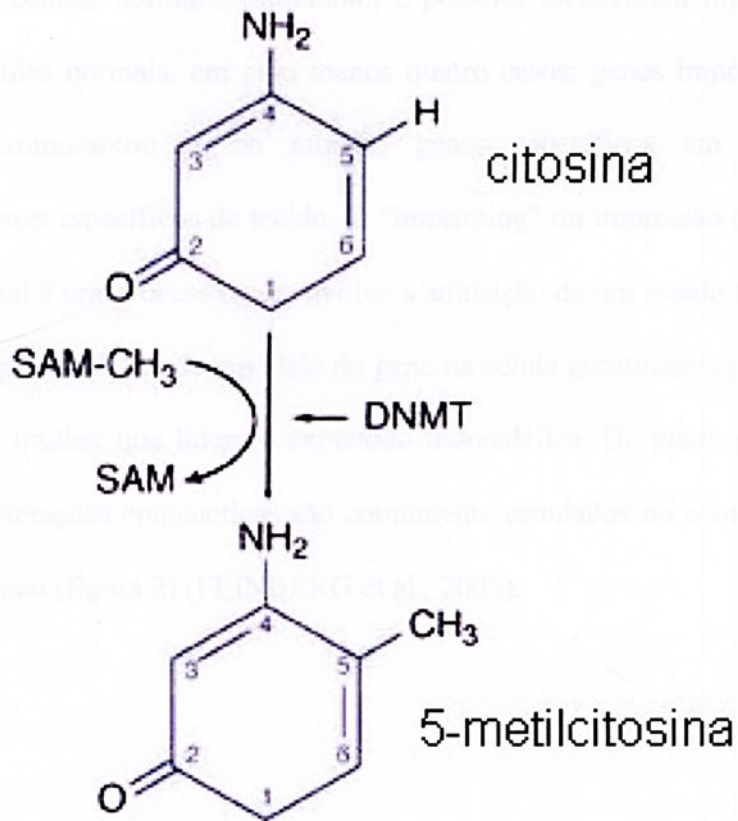


Figura 1 –Mecanismo de metilação que ocorre na citosina. Figura extraída e modificada de Strathdee e Brown. (2004).

A maioria das ilhas CpG é encontrada próxima à região promotora de quase metade dos genes no genoma e tais ilhas estão, geralmente, desmetiladas nas células normais. Entretanto, é possível localizarem ilhas CpG metiladas em células normais, em pelo menos quatro casos: genes imprintados, inativação do cromossomo X na mulher, genes específicos em células germinativas e genes específicos de tecido. O “imprinting” ou impressão definida no genoma parental é um processo que envolve a aquisição de um estado fechado da cromatina e hipermetilação de um alelo do gene na célula germinativa primária do homem ou da mulher que lidera a expressão monoalélica. De modo geral, o imprinting e as alterações epigenéticas são comumente estudados no contexto do silenciamento gênico (figura 2) (FEINBERG et al., 2002).



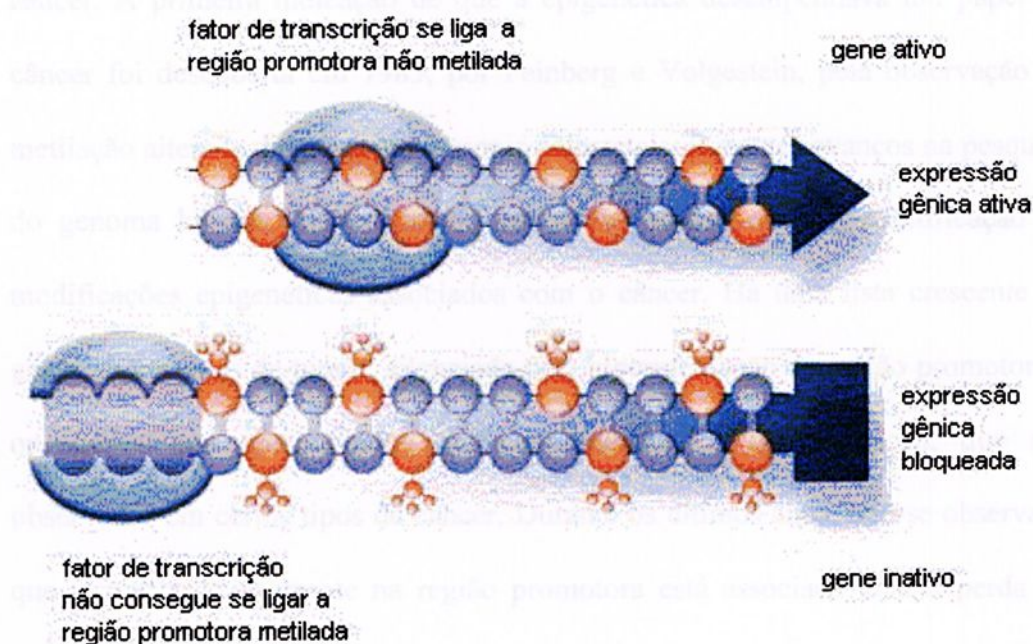


Figura 2 – Inativação gênica em consequência da inibição do processo de transcrição devido à metilação da região promotora do gene. Figura extraída e modificada de <http://www.epigenomics.com/en/en/content-Science-10041-DNA-methylation-10116.php>.

A hipermetilação do DNA das ilhas CpG nas regiões dos genes é uma alteração epigenética do genoma que desempenha um papel significativo no câncer. A primeira indicação de que a epigenética desempenhava um papel no câncer foi descoberta em 1983, por Feinberg e Volgestein, pela observação de metilação alterada de genes em tumores colorretais. Recentes avanços na pesquisa do genoma humano têm resultado em novos acessos para a identificação de modificações epigenéticas associados com o câncer. Há uma lista crescente de genes supressores de tumor, silenciada pela hipermetilação da região promotora e oncogenes que são ativados em consequência da hipometilação, que são observados em certos tipos de câncer. Durante os últimos anos, tem-se observado que a metilação aberrante na região promotora está associada com a perda ou ganho da função gênica e pode fornecer vantagem seletiva às células neoplásicas. O efeito de tais hipermetilações nas regiões promotoras pode ser análogo a mutações de perda de função genética como as mutações pontuais e deleções (SMIRAGLIA & PLASS., 2002).

A avaliação de alterações genéticas e/ou epigenéticas envolvidas na patogênese ou na progressão tumoral vem sendo utilizada nos últimos anos evidenciando-se considerável valor prognóstico e diagnóstico (ROSAS et al., 2001; CHANG et al., 2002; OGI et al., 2002). A presença da metilação na região dos promotores gênicos tem sido considerada um potencial marcador para os cânceres em geral, principalmente para os cânceres esporádicos, podendo ser considerada um marcador para vários tumores. Esteller et al. (2001) avaliaram o padrão de metilação em vários genes. Os autores verificaram o silenciamento de



12 genes, entre os genes supressores tumorais: *p16^{INKa}*, *p15^{INKb}*, *p14^{ARF}*, *p73*, *APC* e *BRCA1*, genes reparadores de DNA: *hMLH1*, *GSTP1* e *MGMT* e genes relacionados com invasão, metástase e morte celular: *CDH1*, *TIMP3*, *DAPK* em 15 sítios anatômicos diferentes acometidos pelos principais cânceres humanos, entre eles os de cabeça e pescoço.

A possibilidade de análise dos padrões de metilação na saliva de pacientes com carcinomas da cabeça e pescoço ressaltou mais uma vez a sensibilidade e a especificidade da técnica a qual foi enfoque do trabalho de Rosas et al. (2001), sugerindo sua utilização como monitoramento destes pacientes e também como método de detecção precoce do câncer de cabeça e pescoço em populações de risco.

O estudo da epigenética, principalmente a metilação do DNA, oferece um grande potencial para a identificação de biomarcadores que podem ser usados no diagnóstico nos primeiros estágios do desenvolvimento do câncer e para a avaliação mais acurada do risco individual para o desenvolvimento da doença.



1.2 Genes supressores de tumor *p14* e *p16*

Anormalidades em vários componentes da maquinaria regulatória do ciclo celular têm sido observadas em diversos tipos de cânceres humanos, incluindo o câncer de cabeça e pescoço. O ciclo celular descontrolado em células tumorais é resultado da desregulação de duas vias principais do controle do ciclo celular: a *p53* e a via *Rb*. O gene supressor tumoral *p14^{ARF}* interrompe o ciclo celular através da inibição de *mdm2* e assim facilita a parada do ciclo celular e apoptose mediada pelo gene supressor de tumor *p53* (POMERANTZ et al., 1998). Foi demonstrado que o oncogene *Ras* produz uma resposta antitumorigênica mediada pela “up-regulation” de ambos *p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}*, que por sua vez ativa o gene supressor tumoral *p53* e *pRb*.

O membro da família do INK4A, o gene supressor de tumor *p16^{INK4A}*, se liga à ciclina dependente de kinase, especialmente *CDK4* e *CDK6*, bloqueando assim a entrada para a fase *G1* do ciclo celular através da prevenção da fosforilação do *Rb*. O produto do gene supressor tumoral *p16^{INK4A}* atua como regulador negativo da proliferação celular através da interação com o *CDK4* e inibindo sua atividade kinase (SHINTANI et al., 2001).

Shintani et al. (2001) identificaram que a inativação do *p14* ocorreu predominantemente pela metilação de sua região promotora, sendo a frequência detectada nos tumores de 28,1% e que a inativação de *p16* via metilação foi de 50%. A função da metilação como mecanismo responsável pelo silenciamento transcricional dos genes *p14^{ARF}* e *p16^{INK2a}* em carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço e especificamente da boca foi demonstrada por

diversos autores (MIRACCA et al., 1999; NAKAHARA et al., 2001; ZHAO et al., 1999) ressaltando a metilação de *p16^{INK2a}* como a mais freqüente nos carcinomas da cabeça e pescoço.

Zhao et al. (1999) observaram hipermetilação do gene *p16^{INK2a}* em 34% dos casos de carcinomas maxilofaciais de células escamosas. Entretanto, estes não encontraram correlação entre o padrão de metilação e os estádios do câncer.

1.3 Gene de reparo de DNA *MGMT*:

O gene *MGMT* (*O*⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase) codifica uma enzima de reparo de DNA que protege as células de efeitos carcinogênicos de alquilantes, corrigindo as mutações causadas por estes carcinógenos. Este gene de reparo está freqüentemente inativado em linfomas e em tumores de colon, pulmão e cérebro. Esteller (2000A), em revisão de genes hipermetilados nos cânceres humanos, ressaltou que a inativação do gene *MGMT* tem sido descrita em vários tipos tumorais, porém sem evidências de mutação, relatando que experimentos em linhagens celulares sugeriram ser a metilação aberrante ou a hipermetilação o único mecanismo responsável pelo silenciamento deste gene.

O padrão de metilação do gene *MGMT* tem sido pesquisado não apenas nos carcinomas primários, mas também em soro, urina e saliva destes pacientes, avaliando-se ainda sua associação com parâmetros clínico-patológicos. Sanches-Céspedes et al. (2000) observaram que a metilação no promotor do gene



MGMT em tumores primários de cabeça e pescoço e no soro foram respectivamente de 33% e 48%. Rosas et al. (2001) observaram hipermetilação em casos de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço, sendo que a região promotora do gene *MGMT* apresentou-se metilada em 23% dos casos analisados. A saliva destes pacientes também foi avaliada apresentando uma frequência de metilação de 50% para o gene *MGMT*. A presença da metilação foi detectada nos pacientes em todos os estádios clínicos da doença. Ressaltou-se a associação significativa entre a presença de metilação do DNA detectada na saliva dos pacientes e a localização do tumor primário. Os autores verificaram que a maior frequência de metilação detectada na saliva provinha dos pacientes com tumores primários na cavidade bucal.

1.4 Gene *DAPK* – Proteína Quinase Associada à Morte:

O gene *DAPK* codifica uma proteína de 160-kD, uma enzima quinase serina-treonina calmodulina-dependente. Este gene está envolvido com o controle da apoptose e uma vez desregulado pode comportar-se ou como um oncogene ou como um gene supressor de tumor. A proteína quinase está associada à morte celular e caracteriza-se como um mediador positivo da apoptose induzida pelo interferon gama. A atividade do gene *DAPK* apresenta-se relacionada com os pontos de checagem *p53* dependentes nos estádios iniciais da oncogênese, sendo o responsável pela eliminação das células neoplásicas. A hipermetilação do gene *DAPK* tem se mostrado ser uma importante alteração epigenética em malignidades do pulmão, esôfago, cabeça e pescoço, próstata, hematológicas e

gástricas. A hipermetilação deste gene também ocorre em várias malignidades das células B, incluindo linfomas de células B, mielomas múltiplos e linfoma de Burkitt (REDDY et al., 2003).

Rosas et al. (2001) observaram metilação em 33% dos tumores de cabeça e pescoço analisados e detectaram hipermetilação em 60% das salivas dos pacientes analisados. A incidência da hipermetilação foi consistente com estudos anteriores em tumores de cabeça e pescoço (SANCHEZ-CÉSPEDES et al., 2000). Hasegawa et al. (2002) analisaram 80 casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço e observaram metilação na região promotora do gene *DAPK* em 23% dos casos.

1.5 Gene *E-CADERINA* (*Caderina E*) - *E-CAD*:

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana que modula a adesão intercelular dependente de cálcio. O desenvolvimento das neoplasias malignas caracteriza-se em parte pela perda da habilidade das células neoplásicas em manter a adesão intercelular, em invadir os tecidos adjacentes e gerar metástases. A E-caderina é a principal molécula de adesão celular do epitélio e a redução ou a perda de sua expressão, via mutações ou perda de heterozigose, apresenta-se freqüente durante a carcinogênese, afetando sua potente atividade supressora tumoral, descrita em carcinomas de estômago, cólon, endométrio e ovário (NAKAYAMA et al., 2001).

O estudo de Hasegawa et al. (2002) apresentou metilação para o gene *E-CAD* em 36% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Chang



et al. (2002) observaram metilação aberrante em 64% dos casos de carcinoma de língua e Nakayama et al. (2001) também observaram metilação em 78% dos casos analisados para o gene *E-CAD*. Chang et al. (2002), em seu estudo, sugeriram que a metilação do gene *E-CAD* em associação com a perda de expressão do mesmo pode persistir em lesões invasivas e metastáticas durante a progressão do câncer.

1.6 Gene *ADAM23* :

Os ADAMs (A Desintegrina e Metaloprotease domínios) compreendem uma família de proteínas de superfície celular ancoradas à membrana com uma organização estrutural comum, incluindo metaloprotease, desintegrina, fator de crescimento epidérmico, domínios transmembranos e citoplasmáticos. Os ADAMs são os únicos entre as proteínas de superfície celular que possuem um potente domínio de adesão e um potente domínio protease (PRIMAKOFF & MYLES, 2000).

O gene *ADAM23* exibe a estrutura típica dos membros da família ADAM, entretanto, o domínio metaloprotease é inativo, sugerindo que este está exclusivamente envolvido no processo de adesão celular (SAGANE et al., 1998). Neste contexto, o *ADAM23* foi recentemente observado interagir especificamente com a integrina $\alpha v \beta 3$ em uma modo RGD-dependente (CAL et al., 2000).

Costa et al. (2004) encontraram metilação aberrante em 69,2% dos casos de tumores primários de mama analisados e observaram que os tumores com estádios avançados possuíam um maior grau de hipermetilação na região



promotora deste gene. O padrão de metilação deste gene para os casos de tumores de cabeça e pescoço ainda não foi estudado.

OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste estudo são:

1. Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *MGMT*, *DAFK*, *E-CAD* e *ADAM13* em tumores de cabeça e pescoço.

OBJETIVOS

2. Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *MGMT*, *DAFK*, *E-CAD* e *ADAM13* em amostras de saliva de indivíduos com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço.
3. Comparar as frequências de hipermetilações dos genes em amostras de tumores de indivíduos portadores de tumor de cabeça e pescoço com as amostras de saliva de indivíduos normais pareados por sexo e idade.

4. Comparar as frequências de hipermetilações dos genes entre as amostras de tumores e saliva de indivíduos portadores de tumor de cabeça e pescoço.

Os objetivos específicos deste estudo são:

1. Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *p14^{ARF}*, *p16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *E-CAD* e *ADAM23* em tumores de cabeça e pescoço.
2. Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *p14^{ARF}*, *p16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *E-CAD* e *ADAM23* em amostras de salivas de indivíduos sem diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço.
3. Comparar as frequências de hipermetilações dos genes em amostras de tumores de indivíduos portadores de tumor de cabeça e pescoço com as amostras de salivas de indivíduos normais pareados por sexo e idade.
4. Comparar as frequências de hipermetilações dos genes entre as amostras de tumores e salivas de indivíduos portadores de tumor de cabeça e pescoço.

Gratias Agere

Fatores Genéticos e Epigenéticos na Carcinogênese

Reck A, Castro Jr CG, Rivero LE, Fraga JC, Brunetto AL

FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA CARCINOGENESE

Resumo A carcinogênese é um processo multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais que levam à transformação de células normais em células cancerígenas. Os fatores genéticos incluem mutações em genes que controlam o crescimento celular, a apoptose e a reparação do DNA. Os fatores ambientais incluem exposição a carcinógenos, radiação, vírus e alterações no estilo de vida. A interação entre esses fatores é complexa e ainda não totalmente compreendida. Este artigo discute os mecanismos moleculares da carcinogênese, com ênfase nos aspectos genéticos e epigenéticos.

Palavras-chave: Carcinogênese, Fatores genéticos, Fatores ambientais, Epigenética, Câncer.

A carcinogênese é um processo multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais que levam à transformação de células normais em células cancerígenas. Os fatores genéticos incluem mutações em genes que controlam o crescimento celular, a apoptose e a reparação do DNA. Os fatores ambientais incluem exposição a carcinógenos, radiação, vírus e alterações no estilo de vida. A interação entre esses fatores é complexa e ainda não totalmente compreendida. Este artigo discute os mecanismos moleculares da carcinogênese, com ênfase nos aspectos genéticos e epigenéticos.

Introdução

A carcinogênese é um processo de transformação de células normais em células cancerígenas, envolvendo fatores genéticos e ambientais. No desenvolvimento de células, as células normais sofrem alterações epigenéticas, como metilação e acetilação, que regulam a expressão de genes. Quando essas alterações ocorrem de forma anormal, podem levar à carcinogênese. Este artigo discute os mecanismos moleculares da carcinogênese, com ênfase nos aspectos genéticos e epigenéticos.

O câncer é uma doença multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais. A interação entre esses fatores é complexa e ainda não totalmente compreendida. Este artigo discute os mecanismos moleculares da carcinogênese, com ênfase nos aspectos genéticos e epigenéticos.

Ciência Básica

Fatores Genéticos e Epigenéticos na Carcinogênese

Rech A, Castro Jr CG, Rivero LF, Fraga JC, Brunetto AL



Abstract: Genetic and Epigenetic Factors in Carcinogenesis - Carcinogenesis is a stepwise process of accumulation of genetic and epigenetic abnormalities that can lead to cellular dysfunction. The main epigenetic modification of the human genome is methylation of cytosine residues within the context of the CpG dinucleotide. The aberrant CpG island methylation can also be used as a biomarker of malignant cells and as a predictor of their behaviour, and may constitute a good target for future therapies. Chemoprevention is the use of natural or synthetic compounds to block, reverse or prevent the development of invasive cancers.

Key words: methylation of CpG islands, carcinogenesis, chemoprevention

Introdução

A carcinogênese é um processo de acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas, que levam à disfunção celular. No desenvolvimento do câncer, as células cancerosas adquirem uma organização atípica, não expressando o mesmo conjunto de genes que suas contrapartes normais, sendo tal diferença a marca do estado canceroso. A mudança do perfil da expressão gênica é evidente aos níveis genético (por exemplo, mutações) e epigenético (por exemplo, inativação transcricional devido à metilação). Atualmente, sabe-se que os fatores epigenéticos são igualmente importantes nesse processo de muitos passos¹.

O câncer é responsável pela principal causa de morte em indivíduos entre os 45 e 60 anos de idade². As estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil em 2003,

Resumo: A carcinogênese é um processo multifásico de acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas que levam a uma disfunção celular. A principal modificação genética do genoma humano é a metilação da citosina localizadas em dinucleotídeos CpG. A metilação aberrante de ilhas CpG pode ser usado com biomarcadores de células malignas, e pode constituir um bom alvo para as terapias futuras. A quimioprevenção é o uso de compostos naturais ou sintéticos para o bloqueio, reversão ou prevenção do desenvolvimento de cânceres invasivos.

Palavras chaves: metilação de ilhas CpG, carcinogênese, quimioprevenção

elaboradas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA)³, indicam que deverão ser registrados no Brasil 402.190 casos novos e 126.960 mortes pela doença.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer são a alimentação, os hormônios, a exposição a diversos tipos de radiações, fumo, carcinógenos do meio ambiente e no ambiente de trabalho e fatores genéticos. Esse último tem um papel fundamental em diversos tipos de cânceres. Evidências sólidas comprovam que a carcinogênese e o desenvolvimento do câncer ocorrem devido a mudanças nos pares de bases, por deleções, inserções, recombinações e amplificações de oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao aparecimento de metástase⁴.

Há duas décadas, os fatores epigenéticos começaram a suscitar o interesse de pesquisadores, como outro provável fator de risco associado à carcinogênese. A epigenética é definida como alterações estáveis no genoma, herdáveis por meio da divisão celular e que não envolvem por si, a sequência de DNA. Essas alterações são reversíveis, pelo menos na linhagem celular, podendo atuar à distância e são facilmente afetadas pelo ambiente, ao contrário das mutações genéticas⁵. Os fatores epigenéticos são representados pela hipermetilação das ilhas CpG e da desacetilação de histonas, que parecem estar ligadas entre si. Normalmente, as acetiltransferases específicas de histonas adicionam grupamentos acetil aos resíduos de lisina, próximos à região N-terminal de histonas. Imagina-se que,

como as histonas acetiladas possuem uma afinidade reduzida pelo DNA, e possivelmente uma pela outra, a cromatina pode ser capaz de adotar uma estrutura mais aberta, apropriada para a expressão gênica. A desacetilação das histonas, no entanto, promove a repressão da expressão gênica, presumivelmente devido ao fato de a cromatina tornar-se mais condensada.

Bird *et al.* (1999)⁶ definiram uma família de proteínas (MBDs), que preferencialmente, se liga à metilcitosina e tem uma capacidade inerente de inibir a transcrição gênica. Mais recentemente, duas dessas MBDs, a MeCP2 e a MBD2 têm sido observadas na participação do complexo protéico que recruta co-repressores transcricionais, proteí-

nas remodeladoras de cromatina (complexos Sin3a e NuRD) e desacetilases de histonas (HDAC1 e HDAC2). Por meio desses complexos, os sítios de metilação de DNA poderiam então ter como alvo a formação da cromatina, incluindo o estado desacetilado das histonas, que é típico de domínios reprimidos transcricionalmente (Figura 1).

1. Metilação - No genoma dos mamíferos, a metilação ocorre somente na citosina que está localizada na posição 5' para a guanina em uma ilha CpG. Recentemente, considera-se ilha CpG toda a janela do genoma que possui 500 pares de bases com um conteúdo C:G de, pelo menos, 55% e uma frequência observada sobre a esperada de CpG, de pelo menos, 0,657. O genoma

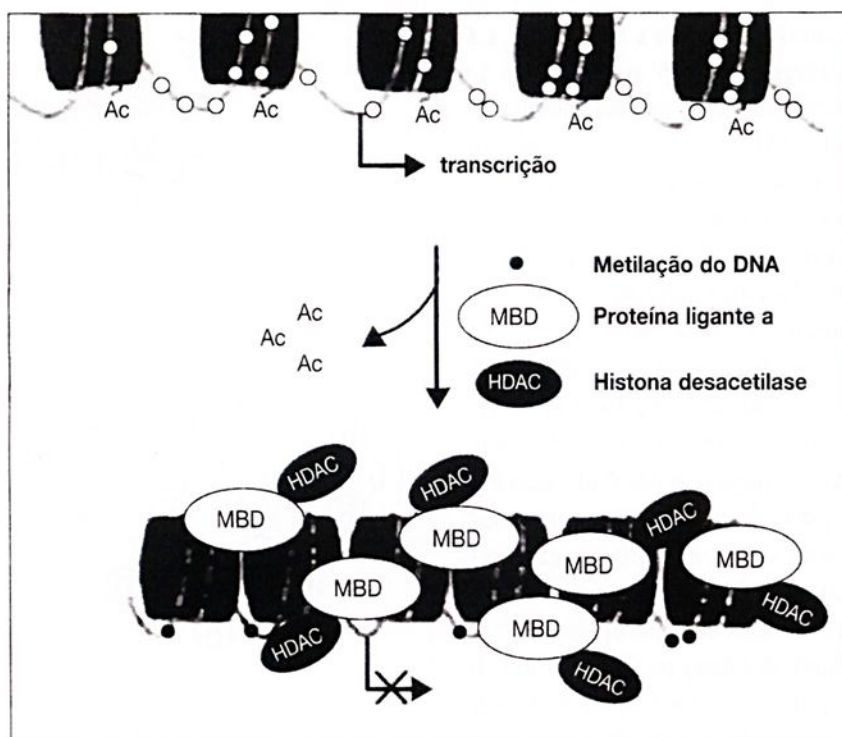


Figura 1 - Modelo de metilação que leva ao silenciamento gênico. (Adaptado de Worm, G. Guldberg, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and promising target for anticancer therapy *J. Oral Pathol. Med.*, v.31: 443 - 449, 2002)

humano contém, aproximadamente, 29.000 ilhas CpG, distribuídas em um padrão não aleatório, com preferência pelas regiões promotoras do primeiro éxon de genes codificadores de proteínas^{8,9}. A metilação da citosina ocorre depois da síntese do DNA, pela transferência enzimática de um grupo metil do doador S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono da posição 5' na citosina (Figura 2)

A reação enzimática é feita por uma das enzimas chamada DNA metiltransferase. A primeira metiltransferase a ser descoberta foi a DNMT1, a principal enzima metiltransferase nos mamíferos, que atua na manutenção de padrões de metilação pré-existent no geno-

ma. A DNMT1 atua, preferencialmente, no DNA hemimetilado, copiando então os padrões de metilação na fita de DNA recém sintetizada. A DNMT1 tem múltiplas funções na célula, em adição a seu papel na manutenção da metilação. A enzima DNMT1 participa da embriogênese, impressão epigenética *imprinting* e inativação do cromossomo X. As outras metiltransferases, denominadas DNMT3A e DNMT3B, estão envolvidas primeiramente na metilação de novos sítios, em um processo chamado de metilação *de novo*. Estudos *in vitro* indicaram que a família de enzimas DNMT3 não tem preferência por DNA não metilado ou hemimetilado¹.

A maioria das ilhas CpG é encontrada próxima à região promotora de quase metade dos genes no genoma e tais ilhas estão, geralmente, desmetiladas nas células normais. Entretanto, é possível localizarem-se ilhas CpG metiladas em células normais, em pelo menos quatro casos, ou seja: genes imprintados, inativação do cromossomo X na mulher, genes específicos em células germinativas e genes específicos de tecido. O *imprinting* do genoma parental é um processo que envolve a aquisição de um estado fechado da cromatina e hipermetilação de um alelo do gene na célula germinativa primária do homem ou da mulher que lidera a expressão monoalélica. De modo geral, o *imprinting* e as alterações epigenéticas são comumente estudados no contexto do silenciamento gênico⁵.

1.1. Metilação e câncer - A primeira indicação de que a epigenética desempenhava um papel no câncer foi descoberto, em 1983, por Feinberg e Volgestein, a partir da observação de metilação alterada de genes em tumores colo-retais. Atualmente, há uma lista crescente de genes supressores de tumor, silenciada pela hipermetilação da região promotora, bem como oncogenes que são ativados em consequência da hipometilação, observada em certos tipos de câncer. Durante os últimos anos, tem-se observado que a metilação aberrante na região promotora está associada com a perda ou ganho da função gênica e pode fornecer vantagem seletiva às células neoplásicas.

A significância funcional da hipermetilação de genes supressores de

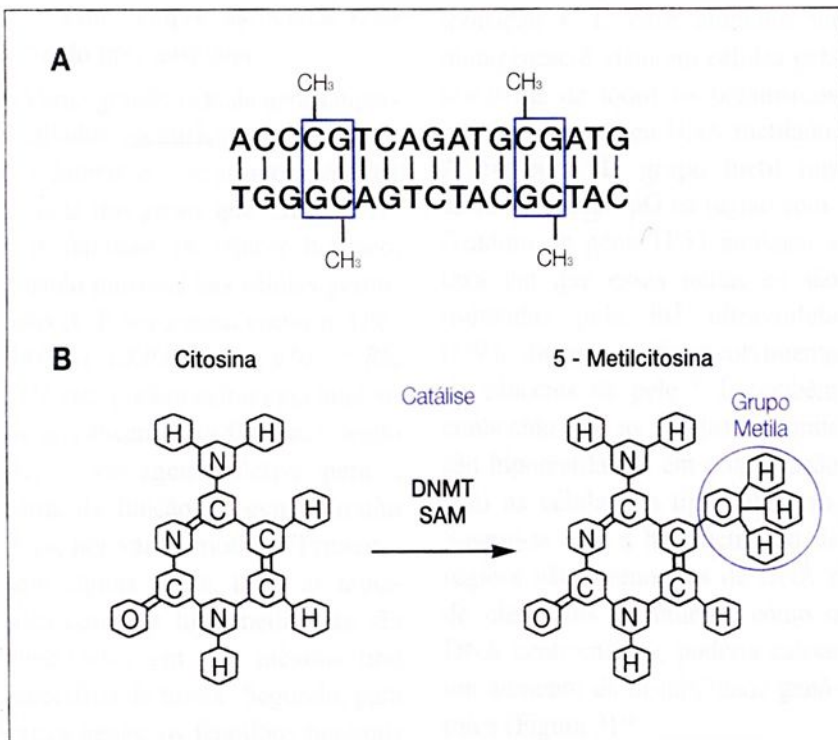


Figura 2 - (A) Ilhas CpG no genoma humano. (B) Adição pós-replicativa de um grupo metil na citosina. (Adaptado de Worm, G, Guldberg, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and promising target for anticancer therapy J. Oral Pathol. Med, v.31: 443 - 449, 2002)

tumor pode ser observada, examinando-se as consequências da inativação de cópias individuais desses genes. Em 1971, Knudson analisando o retinoblastoma herdado e esporádico concluiu que, pelo menos, duas mutações devem ser necessárias para criar esse tumor. O modelo de Knudson prevê que uma consequência fenotípica da perda de genes supressores de tumor não é observada até que ambos os alelos do gene sejam inativados. Além disso, as análises de estudos mostram claramente que os tumores podem “estabilizar” a manutenção das mutações em um alelo do gene, enquanto o outro é hipermetilado, levando a uma inativação funcional do gene^{10,11}. Ainda mais, parece que a hipermetilação nunca ocorre na região promotora do gene mutante, mas está sempre associada com alelo do tipo selvagem¹².

Há uma grande lista de genes hipermetilados identificados em cânceres humanos, incluindo mais da metade dos genes que causam formas familiares de câncer humano, quando mutados nas células germinativas. Esses genes, como o *APC*, *BRCA-1*, *LKB1*, *MLH1*, *p16^{INK4a}*, *Rb*, *VHL*, etc., podem exibir essa mudança em cânceres não-familiares, sendo que a vantagem seletiva para a perda da função do gene é muito clara, por vários motivos. Primeiro, para alguns genes, tanto as mutações como as hipermetilações são observadas em um mesmo tipo específico de tumor. Segundo, para vários genes, os fenótipos tumorais preditos para a perda de função de um gene específico acompanha tanto as mudanças genéticas como

as epigenéticas. Terceiro, a mesma interrupção de mecanismos biológicos cruciais podem acompanhar os dois tipos de mudanças. A lista de genes hipermetilados em câncer também inclui muitos que são documentados como supressores de tumor. De modo relevante, para alguns desses genes, a metilação do promotor pode ser o único tipo de inativação do gene encontrada no câncer humano, desde que mutações para muitos dos genes são raras ou não foram observadas¹³.

Além do silenciamento da expressão gênica, a metilação também pode influenciar a tumorigênese através de outros mecanismos. Isso ocorre porque a 5-metilcitosina é, por si só, mutagênica, ou seja, pode submeter-se a uma desaminação hidrolítica espontânea que causa transição C>T. Esse aumento na mutagênese é visto em células germinativas de todos os organismos que possuem o seu DNA metilado. A presença do grupo metil nos dinucleotídeos CpG na região codificadora do gene TP53 aumenta a taxa em que essas mutações são induzidas pela luz ultravioleta (UV), durante o desenvolvimento de cânceres de pele¹⁴. É também conhecido que as células tumorais são hipometiladas, em comparação com as células do tipo selvagem. Sugere-se que a hipometilação de regiões não promotoras de DNA e de elementos estruturais, como o DNA centromérico, poderia causar um aumento da instabilidade genômica (Figura 3)¹⁵.

Observou-se que a hipometilação de um locus, transcricionalmente controlado pela metilação, pode

ativar a transcrição de genes associados. De fato, a hipometilação do oncogene *H-ras* tem sido observada em carcinomas de estômago, cólon e pulmão; entretanto, não foi observada a expressão aumentada desse gene nos referidos casos. Constituem exemplos de genes regulados transcricionalmente pela hipometilação o gene decorin proteoglicanas em carcinomas de cólon, o gene *LIM-HOX* em leucemias mielogênicas crônicas e o gene *pS2* em câncer de mama e em outros tipos de tumores¹⁶.

O perfeito equilíbrio das células normais sofre uma dramática transformação em células cancerosas. As aberrações epigenéticas observadas podem ser resumidas nos seguintes passos: (1) silêncio transcricional de genes supressores tumorais pela hipermetilação e desacetilação de histonas da região promotora; (2) hipometilação genômica global; (3) perda de eventos imprintados (LOI); (4) falta epigenética da repressão de parasitas intragenômicos e (5) o aparente defeito genético nos genes relacionados com a cromatina¹⁷.

1.1.1 Metiloma - Uma importante direção para os futuros estudos sobre metilação é a definição dos componentes do metiloma, isto é, o conteúdo total de metilação da célula. O metiloma representa um alvo proveitoso de modificações epigenéticas no desenvolvimento normal e na doença. Em adição ao descobrimento de novas DMRs (regiões metiladas diferencialmente), Strichman-Almashanu *et al.* (2002)¹⁸ observaram uma nova classe de ilhas CpG, previamente não

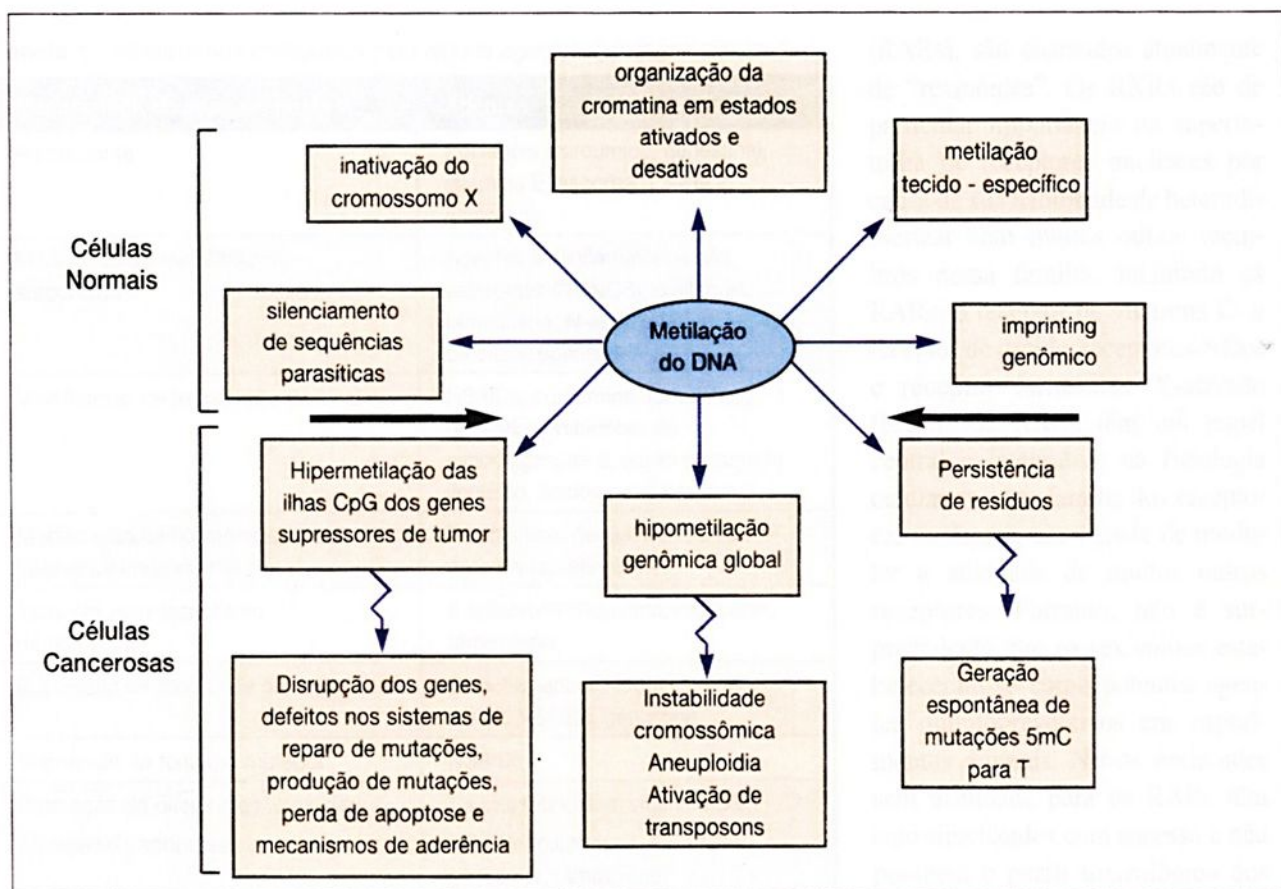


Figura 3 - A metilação do DNA no centro do comportamento normal e maligno das células.

reconhecidas em alelos paternos e maternos em células somáticas. Algumas dessas estão dentro dos promotores de genes que mostram expressão restrita às células germinativas, como o MAGE (melanoma e antígeno testículo-específico). Outras, aparentam servir como padrão de epigenética global, à medida que estão localizadas perto do final dos cromossomos. Ainda mais, as identificações dessas seqüências levantam duas possibilidades adicionais intrigantes: (1) elas podem mostrar perda de metilação em tumores, causando ativação gênica aberrante; (2) elas podem mostrar variações polimórficas na população, adicionando

diversidade epigenética no desenvolvimento normal e na doença. Os exemplos de ambas as possibilidades estão próximos⁵.

1.2 Quimioprevenção e agentes metiladores - O termo quimioprevenção, introduzido por Sporn em 1976, pode ser definido como o uso específico de agentes naturais ou sintetizados quimicamente para reverter, suprimir ou prevenir a progressão do câncer invasivo. Os estudos de quimioprevenção são baseados na hipótese que a intervenção de processos biológicos envolvidos na carcinogênese será inibida e, por sua vez, reduzirá a incidência do câncer. Essa hipótese fornece uma estrutura para o dese-

nho e avaliação de testes de quimioprevenção, incluindo o raciocínio para a seleção de agentes que inibirão os processos biológicos e o desenvolvimento de marcadores intermediários associados com a carcinogênese¹⁹.

No passado, os agentes quimiopreventivos eram desenvolvidos e classificados baseados na reversão de uma fase específica da carcinogênese²⁰. O aperfeiçoamento no entendimento dos mecanismos moleculares de carcinogênese tem sido utilizado como guia para o desenvolvimento de intervenções quimiopreventivas. Mecanismos de ação têm sido propostos para os agentes atuais e novos agentes têm sido identifica-

Tabela 1 - Mecanismos postulados para alguns agentes quimiopreventivos²².

Mecanismos de ação propostos	Agentes
Antioxidante	Polifenóis (curcumina, genestina), vitamina E, ascorbato, selênio, carotenos
Modulação do metabolismo aracdônico	Agentes antiinflamatórios não esteróides (NSAIDs), polifenóis, tamoxifeno, N-acetilcisteína, inibidor de ciclooxigenase-2
Modificação de transdução de sinal	NSAIDs, curcumina, tamoxifeno, genestina, inibidores de ciclooxigenase-2, ácido conjugado linoléico, ácidos gordurosos n-3
Modificação de hormônios ou em fatores de crescimento	Tamoxifeno, genestina, NSAIDs, curcumina, retinóides
Bloqueio no metabolismo de poliamina	2-difluorometilornitina, retinóides, tamoxifeno
Supressão da função de oncogene	Monoterpenos(D-limonemo, álcool perillil), NSAIDs, genestina
Supressão do fenótipo mutador	NSAIDs
Promoção da diferenciação celular Ativação da apoptose	Cálcio, retinóides, vitamina D3 NSAIDs, curcumina, retinóides, genestina, tamoxifeno

dos baseados em suas habilidades de modular um ou mais eventos moleculares na carcinogênese²¹ (Tabela 1).

Todos os agentes citados na tabela acima são de grande relevância para a quimioprevenção do câncer. Os agentes inibidores da ciclooxigenase 2 induzida são importantes, pois a ciclooxigenase 2 é uma enzima chave, responsável pela síntese de prostaglandinas inflamatórias do ácido aracdônico. Embora não seja recente o conceito de que inflamação e carcinogênese estejam relacionadas, a imediata relevância dessa noção para o mundo moderno da genética molecular foi demonstrada através da observação de que a expressão elevada do gene COX-2 é

um evento primário e um importante acontecimento na carcinogênese do colón²² e o nocaute do gene COX-2 poderia suprimir a carcinogênese de colón em ratos, geneticamente predispostos a desenvolver essa condição. Esse dado tem levado ao desenvolvimento de novos agentes farmacológicos, como a celecoxibe, seletiva para a inibição da atividade enzimática de COX-2. Os agentes seletivos para inibição de COX-2 são mais tolerados em administrações crônicas prolongadas do que as drogas anti-inflamatórias não-esteróides usadas atualmente.

Os retinóides são seletivos por se ligarem a três receptores retinóides X (RXRs) e, como não se ligam a três receptores do ácido retinóico

(RARs), são chamados atualmente de "rexinóides". Os RXRs são de particular importância na superfamília de receptores nucleares por causa de sua habilidade de heterodimerizar com muitos outros membros dessa família, incluindo os RARs, o receptor de vitamina D, o receptor de tiróide, receptores órfãos e receptor farnesóide X-ativado (FXR). Os RXRs têm um papel central e integrativo na fisiologia celular da superfamília dos receptores nucleares, em virtude de modular a atividade de muitos outros receptores. Portanto, não é surpreendente que os rexinóides estabelecem-se como potentes agentes quimiopreventivos em experimentos animais. Novos rexinóides sem afinidade para os RARs têm sido sintetizados com sucesso e não possuem o perfil toxicológico dos retinóides típicos: eles não produzem o mesmo tipo de toxicidade mucocutânea e são teratogênicos muito fracos²³.

Os agentes quimiopreventivos 5-azacitidina e 5-aza-2'-deoxicitidina (ZCyd e ZdCyd) inibem a metilação do DNA. Como o ZCyd é incorporado no DNA e RNA, o tratamento de células com ZCyd levam a uma inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas. A incorporação do ZCyd no RNAt tem mostrado inibir as enzimas RNAt metiltransferases. Como a metilação também desempenha um papel importante no processamento do RNA ribossômico, os efeitos da incorporação de ZCyd na função e estabilidade do RNA são aditivos para muitos dos efeitos do ZCyd na síntese de proteína. O agente 5-aza-2'-deoxicitidina, que é

somente incorporado ao DNA é, pelo menos, 10 vezes mais citotóxico que o ZCyd para células animais em cultura. Em doses baixas suficientes para impedir a morte celular, a incorporação de Zcyd e ZdCyd no DNA de culturas de células levam a uma rápida perda de atividade da metiltransferase, porque as enzimas se ligam de forma irreversível aos resíduos de ZCyd no DNA²⁴. No entanto, o uso desses agentes causa náuseas, vômitos, diarreia e mielosupressão, fatores que limitam as doses e a duração do tratamento, além do potencial de ambos formarem lesões mutagênicas.

O uso apropriado de um agente quimiopreventivo depende do entendimento de seu mecanismo de ação em todos os níveis: molecular, celular, tecidual e do órgão, assim como no indivíduo em sua totalidade. Sem esse conhecimento pode-se, somente, fazer decisões intuitivas na seleção de agentes preventivos e esperar que o resultado clínico seja expressivo²¹.

Os grandes testes que vêm sendo desenvolvido em quimioprevenção estão dando um certo tempo para os pesquisadores levantarem questões relevantes para futuras estratégias, visando o desenvolvimento e eficácia de novos agentes:

- 1) O tempo e os recursos gastos em testes preliminares de eficácia pré-clínica em modelos animais para inovação genética e quimiopreventiva são cruciais para a seleção de agentes para testes clínicos;
- 2) Como sugerido por Meyskens (1998)²⁵ é hora de considerar a

incorporação de estratégias de imunomodulação dentro das intervenções de prevenção do câncer, pois a transformação maligna requer um sistema imunológico tolerante a antígenos externos;

- 3) Dada à complexidade do processo carcinogênico com múltiplas transduções de sinais e vias de transcrição, a combinação de agentes de quimioprevenção parece ser necessária para obter um impacto sobre o risco de tumor epitelial;
- 4) A integração de uma modulação da dieta dentro de uma estratégia compreensiva de quimioprevenção para indivíduos de alto risco representa um importante desafio²¹.

A quimioprevenção do câncer é uma disciplina nova e ainda não têm um grande impacto na incidência do câncer. A genética molecular da carcinogênese e estudos *in vitro* e *in vivo* em laboratórios sustentam a hipótese que essa doença pode ser prevenida. Em poucas décadas de investigações clínicas, os agentes de quimioprevenção levantaram mais questões que respostas. Entretanto, cuidadosas e persistentes investigações têm mostrado grandes avanços durante estes últimos anos²⁶.

1.3 Perspectivas futuras - Nos últimos anos, tem se tornado aparente que o câncer é uma doença causada tanto, geneticamente, por meio de mutações, quanto pelo mal direcionamento epigenético. Nos próximos anos, ocorrerá um melhor entendimento dos mecanismos que sustentam as mudanças de metilação do DNA nas células cancerosas.

Espera-se também, uma explosão no número de marcadores específicos para metilação, assistidos por ferramentas *in silico*, seguida de processos de extração e culminando na construção de pequenos painéis de marcadores que serão otimizados para aplicações clínicas, como validação de risco, detecção precoce, diagnóstico molecular de biópsias, quimiopredição e monitoramento da recorrência da doença⁷.

Referências Bibliográficas

- 1 Jones PA. Epigenetics in Carcinogenesis and Cancer prevention. ANN. N. Y. ACAD. SCI.; 983: 213-219, 2003.
- 2 Go VLW, Debra AW, Butrum R. Diet, nutrition and cancer prevention: where are we going from here? AM. SOCIETY FOR NUTRITIONAL SCIENCES; 312IS-3126S, 2001.
- 3 Instituto Nacional do Câncer. <http://www.inca.gov.br>
- 4 Sigimura T, Ushijima T. Genetic and epigenetic alterations in carcinogenesis. MUT. RES.; 462: 235-246, 2000.
- 5 Feinberg AP. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. CANCER BIOLOGY; 12: 389-398, 2002.
- 6 Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression - belts, braces and chromatin. CELL; 99: 451-454, 1999.
- 7 Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. NATURE REVIEWS; 3: 253-266, 2003.
- 8 Venter, JC.; Adams, MD.; Myers, EW, et al. The sequence of the human genome. SCIENCE; 9: 1304-1351, 2001.
- 9 LANDER ES, LINTON LM, BIRREN B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. NATURE; 409: 860-921, 2001.
- 10 Myohanen SK, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation can selectively silence individual p16INK4A alleles in neoplasia. CANCER RES.; 58: 591-593, 1998.
- 11 Gracy WM, et al. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in heredi-

ASCO/IASLC I CONFERÊNCIA LATINO AMERICANA EM CâNCER DE PULMÃO

LALCa 2004

18 a 21 de MARÇO de 2004

CENTRO DE EXIBIÇÕES DO
CASA GRANDE HOTEL -

GUARUJÁ - SP

A LALCa 2004 está sendo co-organizada pela Sociedade Brasileira de Cancerologia, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, com o co-patrocínio da ASCO - American Society of Clinical Oncology e IASLC - International Association for the Study of Lung Cancer. Recebe ainda os apoios da SOAD - South American Office for Anticancer Drug Development, FLASCA - Federación Latino Americana de Sociedades de Cancer, Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, Sociedade Brasileira de Patologia, Sociedade Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial e Unesp. O programa científico cobre um amplo escopo de tópicos, tais como prevenção, diagnóstico precoce de lesões pré-malignas, quimioprevenção, estratégias anti-tabagismo, epidemiologia clínica, avanços no diagnóstico e estadiamento, novas modalidades de tratamento (clínico, cirúrgico e radioterapêutico), novos agentes antineoplásicos e novas combinações em quimioterapia, testes de predição antecipada de resposta tumoral a medicamentos anti-câncer, farmacogenômica e farmacocinética de medicamentos com alvos moleculares específicos em tumores, tratamento de subtipos tumorais em câncer de pulmão.

A alta qualidade dos palestrantes internacionais e o escopo científico da programação oferecem uma oportunidade única ao médico oncologista, cirurgião torácico, radioterapeuta, pneumologista e pesquisadores de receberem informação atualizada da mais alta qualidade e atualidade em Câncer de Pulmão.

Presidente Internacional:
Paul Bunn, MD, PhD

Presidentes Regionais:
Prof^ª Dra. Nise Yamaguchi e
Prof. Dr. Gilberto Schwartzmann

Informações na Internet:
www.lungcancer.com.br

Solicite o envio da primeira circular
da LALCa pelo e-mail:
lungcancer@terra.com.br

- tary diffuse gastric cancer. *NATURE GENET.*; 26: 16-17, 2000.
- 12 Esteller M, et al. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *HUM. MOL. GENET.*; 10: 3001-3007, 2001.
 - 13 Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachmanke, et al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *HUM. MOL. GENET.*; 10: 687-692, 2001.
 - 14 Pfeifer GP, Tang M, Derissenko MF. Mutation hotspots and DNA methylation. *CURR. TOP. MICROB. IMMUNOL.*; 249: 1-19, 2000.
 - 15 Xu GL, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *NATURE*; 301: 89-92, 1999.
 - 16 Ehrlich. DNA hypomethylation and cancer. In: DNA alterations in cancer. Genetic and Epigenetic changes. Ehrlich, M. (Ed.) Natick, MA: Eaton.; 273-291, 2000.
 - 17 Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. PATHOLOGY*; 196: 1-7, 2002.
 - 18 Strichman-Almashanu LZ, Lee R, Onvango P, Perlman E, Flam F, et al. A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *GENOME RES.*; 12:543-554, 2002.
 - 19 Kim ES, Hong K, Khuri FR. Chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *ANNU. REV. MED.*; 53: 223-243, 2002.
 - 20 Lippman S, Benner S, Hong W. Cancer chemoprevention. *J. CLIN. ONCOL.*; 12:851-873, 1994.
 - 21 Shureiqi I, Reddy P, Brenner DE. Chemoprevention: general perspective. *CRI. REV. IN ONCOL./HEMATOL.*; 33: 157-167, 2000.
 - 22 Prescott SM, White RL. Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell*; 87: 783-786, 1996.
 - 23 Sporn MB, Suh N. Chemoprevention of cancer. *CARCINOGENESIS*; 3:525-530, 2000.
 - 24 Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanism studies and their implications for cancer therapy. *ONCOGENE*; 21: 5483-5495, 2002.
 - 25 Meyskens F. Principles of human chemoprevention. *HEMATOL. ONCOL. CLIN. NORTH AM.*; 1295: 1-7, 1998.
 - 26 Goodman GE. Prevention of lung cancer. *CRIT. REV. IN ONCOL./HEMAT.*; 33:187-197, 2000.

Autores:

Marília de Freitas Calmon - Mestranda do programa de pós-graduação em genética, área de concentração em genética da UNESP - Campus IBILCE (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas) de São José do Rio Preto.

Nívea Dulce Tedeschi Conforti Fróes - Mestre e Doutora em Genética, Pós-Doutor Universidade do Texas, ramo Médico de Galveston, EUA. Coordenadora do laboratório de Epidemiologia Molecular. IBILCE/UNESP.

Endereço para correspondência:

Marília de Freitas Calmon - Rua Frei Baltazar, 131 - São José do Rio Preto - CEP: 15025-390 - telefone: (17) 2311425
e-mail: macal803@hotmail.com

Analysis of the Methylation in Multiple Genes in Head and Neck Cancer

Mariana de Freitas Calmon^a, Fabrício Carvalho^b, Flávia Pinheiro de Souza^c, José Francisco G. Filho^d, Érica E. Fukuyama^e, Adriano Cristina O. Costa^f, Anselmo A. Castanho^g, Gláucia Luisa S. Caballero^h, Elidia H. Tajaraⁱ, José Antonio Carteiro^j, Paula Pêche^k

^a Departamento of Biology, UNESP-Bil. CT, Brazil

^b Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Brazil

ARTIGO QUE SERÁ SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

^c Universidade de São Paulo, Brazil

^d Ludwig Institute for Cancer Research – New York Branch of Human Cancer Immunology at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, USA

^e College of Medicine of São José do Rio Preto, Brazil

^f Corresponding author. Tel: 17 2301423

E-mail address: mcalmon@ludwiglabs.com.br (Mariana Calmon)

Keywords: p14^{ARF}, p16^{INK4a}, DAP-Kinase, E-Cadherin, MGMT, ADAM23
Hypermethylation, head and neck cancer, saliva

Analysis of the Methylation in Multiple Genes in Head and Neck Cancer

Marilia de Freitas Calmon^a, Fabrício Carvalho^b, Fátima Pereira de Souza^c, José Francisco G. Filho^d, Érica E. Fukuyama^d, Adriana Cristina O. Costa^e, Anamaria A. Camargo^b, Otávia Luisa S. Caballero^f, Eloísa H. Tajara^g, José Antonio Cordeiro^g, Paula Rahal^a.

^a Departamento of Biology, UNESP-IBILCE, Brazil

^b Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch, Brazil

^c Laboratory of Virology, USP, Brazil

^d Institute of Cancer Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho, Brazil

^e University of Campinas, Brazil

^f Ludwig Institute for Cancer Research – New York Branch of Human Cancer Immunology at Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, USA

^g College of Medicine of São José do Rio Preto, Brazil.

*Corresponding author. Tel:17 2311425

E-mail address: macal131@yahoo.com.br (Marilia Calmon)

Keywords: p14^{ARF}, p16^{INK4a}, DAP-Kinase, E-Cadherin, MGMT, ADAM23, hypermethylation, head and neck cancer, saliva.

Abstract

Cancer constitutes an important cause of morbidity and is the second greatest cause of mortality worldwide. Head and neck cancer is one of the ten most frequent types, with epidermoid carcinoma the predominant histological type. Changes in the gene expression, including mutations and transcriptional inactivation due to methylation, are evident in cancerous cells. There is a growing list of tumor suppressor genes silenced by hypermethylation of the promoter region and oncogenes that are activated due to hypomethylation, observed in different types of cancer. During the last few years, aberrant methylation in the promoter region has been observed and associated with the loss or gain of gene function which may give a selective advantage to neoplastic cells. In this current case-controlled study, the methylation pattern of the promoter regions of *p14^{ARF}*, *p16^{INKa}*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes in the DNA from 43 samples of head and neck tumors were analyzed. Additionally, the methylation pattern found in tumoral samples of the aforementioned genes was investigated in an attempt to identify the same pattern in saliva samples of patients with head and neck cancer. The *p14* tumoral suppressor gene was hypermethylated in 30% (13/43) of samples. The prevalence of hypermethylation in the *p16* gene was seen in 63% (27/43) of tumors. The frequencies of hypermethylation of the promoter regions of the *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes were 81.4% (35/43), 88.3% (38/43) and 42% (18/43) respectively. Of the thirteen patients in whom the DNA of the tumor and saliva were compared, 61.5% (8/13) presented with the same pattern of methylation both in the saliva and tumor samples for at least three genes. In the control group, which included 52 participants, the frequencies of the aberrant methylation of the promoter regions of the *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes observed in saliva

were 15% (8/52), 19% (10/52), 73% (38/52), 60% (36/52) and 10% (5/52) respectively. The *E-CAD*, *p16*, *p14* and *ADAM23* genes presented a greater frequency of aberrant methylation in the samples of the tumor group compared to the control group. DNA methylation markers have obvious applications in diagnostics, but can also contribute indirectly to therapeutics as predictors of response to therapy. Early detection of cancer will allow therapeutic interventions to be applied to inhibit further development of cancer and such information could also be used in the development of strategies to prevent cancer.

Head and neck cancer is a major public health globally. Currently, head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a type of cancer that is one of the most common causes of cancer-related death at a rate of approximately 300,000 new cases per year worldwide. More than 15,000 Americans will develop cancer of the head and neck this year; nearly 11,000 of them will die from it. The overall five year survival rate for patients with early clinically evident cervical lymph node metastases is 85% with little variation dependent upon tumor staging. However, patients with microscopic lymph node metastases have a survival rate of 34%. It has been estimated that 30-50% of patients without clinically evident cervical lymph node metastases do in fact microscopic metastases and therefore a poor prognosis [2,3].

The term head and neck cancer refers to several types of cancer with distinct histologies that occur in several anatomic sites [4]. This terminology has been primarily applied to those cancers that occur in regions such as the oral cavity, the oropharynx, the hypopharynx and the larynx. Due to the variability of the anatomical sites, the origin of the tissues, the biology of tumor growth, the metastatic patterns and the limits of extension of the tumors, the signs and symptoms of the disease are very variable [5].

The therapeutic planning of head and neck epidermoid carcinomas is mainly based on the TNM system [6]. However, some tumors present the same clinical characteristics

Introduction

Carcinogenesis is a process of accumulation of genetic and epigenetic abnormalities that leads to cellular dysfunction. In cancer development, the cells acquire an atypical organization, that is, they do not express the same set of genes as their normal counterparts, a difference that identifies the cancerous state. Cancer is the main cause of death in individuals between 45 and 60 years old [1].

Head and neck cancer is a major public health globally. Currently, head and neck squamous cell carcinomas occur at a rate of approximately 500.000 new cases per year world wide. More than 55,000 Americans will develop cancer of the head and neck this year; nearly 13,000 of them will die from it. The overall five year survival rate for patients without clinically evident cervical lymph node metastases is 85% with little variation dependent upon tumor staging. However, patients with microscopic lymph node metastases have a survival rate of 54%. It has been estimated that 20-50% of patients without clinically evident cervical lymph node metastasis do in fact microscopic metastases and therefore a poor prognosis [2;3].

The term head and neck cancer refers to several types of cancer with distinct histologies that occur in several anatomic sites [4]. This terminology has been primarily applied to those cancers that occur in regions such as the oral cavity, the oropharynx, the hypopharynx and the larynx. Due to the variability of the anatomical sites, the origin of the tissues, the biology of tumor growth, the metastatic patterns and the limits of extension of the tumors, the signs and symptoms of the disease are very variable [5].

The therapeutic planning of head and neck epidermoid carcinomas is mainly based on the TNM system [6]. However, some tumors present the same clinical characteristics

demonstrating different growth patterns and evolution, suggesting a necessity to analyze other complementary factors capable of more precisely predicting the prognosis of the disease [7;8]. Despite incessant researchs studying the biological behavior and the molecular characteristics of head and neck cancers, a high mortality rate still persists with late detection as the main cause for low survival rates among patients. The ability to define the course of the disease, as well as to detect it in the early stages are factors which contribute to an improved survival rate and quality of life of patients.

Carcinogenesis consists of a multistep process, characterized by the occurrence or accumulation of genetic alterations, such as: aneuploid, loss of heterozygosis, deletions, insertions, point mutations, gene amplification and by the epigenetic alterations, which are characterized by an inherited process during cellular division, without the occurrence of alterations in the DNA sequence [2; 9-11]. Changes of the profile of the gene expression are evident in cancerous cells including mutations and epigenetic alterations, as well as transcriptional inactivation due to methylation. Nowadays, it is known that epigenetic factors are equally important in this multistep process [12].

Recent advances in studies of transcriptom have resulted in new approaches in the identification of epigenetic changes associated with cancer. There is a growing list of tumor suppressor genes silenced by hypermethylation of the promoter region and oncogenes that are activated as a consequence of hypomethylation, that have been observed in certain types of cancer. Over the last years, it has been observed that aberrant methylation in the promoter region is associated to the loss or gain of gene functions and may selectively benefit neoplastic cells. The effect of these hypermethylations in the promoter regions may



be analogous to loss of genetic function by mutations such as point mutations and deletions [13].

The study of epigenetics, principally methylation of the DNA, offers a great potential for the identification of biomarkers that can be used in the diagnosis of the first development stages of cancer and to more accurately evaluate the individual risk of developing the disease [14].

Among these are the *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes. The protein coded by the *p14^{ARF}* tumoral suppressor gene is involved in the regulation of the cell cycle, interrupting the G1 or G2 phases [15]. Studies have reported that epigenetic alterations of the *p14* gene are important events in head and neck carcinogenesis and in the development of benign tumors [16;17]. The product of the *p16^{INK4A}* tumoral suppressor gene acts as a negative regulator of cellular proliferation through the interaction with the CDK4 protein by inhibiting its kinase activity. The mechanism of methylation, which has as a consequence, the transcriptional silencing of the *p16^{INK2a}* gene, was observed in epidermoid head and neck carcinomas, particularly of the oral cavity [18-20]. The *DAPK* gene codes a calmodulin dependent serine-threonine kinase. This protein is classified as a positive mediator of apoptosis induced by *IFN-γ*. In studies on head and neck cancer samples, a positive correlation was seen between methylation of the *DAPK* gene and the presence of lymph nodes, confirming the role of this protein in the dissemination of the tumor [8]. The glycoprotein E-caderin is the main adhesion molecule of the epithelium and a reduction or loss of its expression is frequently seen during carcinogenesis. It has been suggested that methylation of the *E-CAD* gene in association with the loss of its expression may remain in invasive and metastatic lesions during the progression of cancer [21]. The *ADAM23* gene is

exclusively involved in the process of cellular adhesion [22]. It has been shown that advanced stage primary breast tumors present with a high degree of methylation in the *ADAM23* gene [22].

In this present case-controlled study the pattern of methylation of the promoter region of the *p14^{ARF}*, *p16^{INKa}*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes in DNA samples from 43 head and neck tumors were analyzed. For some head and neck cancer patients, saliva and tumor samples were compared to see if similar methylation patterns for the aforementioned genes could be detected in both types of samples.

Materials and Methods

Sample collection

Forty-three tumor samples were collected from patients diagnosed as having head and neck tumors in the Dr. Arnaldo Vieira de Carvalho Cancer Institute. Saliva samples were also collected from 13 of these patients and paired with the respective tumors. Of these patients, 32 were male, 11 were female. Of the 43 patients who completed the questionnaire, 95% were smokers and 70% alcoholics. Fresh samples were obtained from surgical resection of head and neck tumors. Of these tumoral samples, 37% were removed from the oral cavity, 26% from the larynx and 37% from the oropharynx. Saliva samples were collected by mouth washes using saline solution and stored at -20 °C.

Additionally, 52 saliva samples were collected from apparently healthy individuals, without lesions or clinical diagnoses of head and neck cancer, as a control. Of these 52



individuals, 31 were female and 21 were male and 51% were smokers and 36.7% were alcoholics.

Research protocols and informed consents were reviewed and approved by the in-house Ethics Committee of IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto and affiliated institution (Hospital of Cancer Arnaldo Vieira de Carvalho), as well as the National Committee of Ethics in Research. Demographic data, including age at diagnosis, gender and alcohol and tobacco exposure, were obtained from medical records. Tumor stage and grade were determined from surgical and pathology reports. Tumor stage classification was assigned on the basis of the 1997 American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging criteria [6].

Collection and extraction of the DNA from tumor and saliva samples

The tumor samples, collected after surgical resection, were stored in cryogenic tubes at -70 °C. The saliva of individuals was collected in a 0.9% saline solution and stored at -20 °C. Extraction of the DNA was performed according to the protocol of Sambrook et al. 1989 [23].

DNA conversion by Sodium bisulfite

After determining the concentration of each DNA sample by spectrophotometry, 2 µg of DNA (per sample) were denaturized by the addition of Herring Sperm DNA (10 mg/mL) and NaOH (3M) and after they were heated to 50 °C for 20 minutes. Subsequently, the DNA was treated by adding a sodium bisulfite (2.5M) / hydroquinone (1M) solution



and heated to 70 °C during 3 hours in the dark. After the treatment, the Wizard clean up kit (Promega) was utilized for purification of the DNA according to the instructions of the manufacturer. Subsequently, the DNA was precipitated by the addition of ammonia acetate (5M), 100% frozen ethanol and 20 mg/mL glycogen and incubated at -20 °C overnight. After the precipitation, the DNA was resuspended by adding DDW after being centrifuged and dried at room temperature.

Methylation specific polymerase chain reaction (MSP)

After the conversion of the DNA, methylation specific polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed to analyze the pattern of methylation of chosen genes. In this study the specific genes were: *p14*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23*. The primers used for each gene in the PCR reaction were specific for methylated and non-methylated DNA (Table 1). The pattern of methylation (detection of the methylated or non-methylated alleles) in the promoter region of the six genes was analyzed in 3 cell lines derived from colon cancer (*HCT116*, *SW480*, *DLD-1*), one cell line derived from breast cancer (*MCF7*), one cell line derived from lung cancer (*H1299*) and one from bladder cancer (*SCABER*). The Nested PCR technique was used only for the *p16* gene according to the protocol of Kresty et al. 2003 [24]. Following PCR, the product was added to 8% polyacrylamide gel to see the size of the amplicons to assess the methylation pattern of the genes in the tumor samples.

Table 1 – Primer sequence utilized in MSP

Gene	Primer Sequence for the methylated situation (5' – 3')	Primer Sequence for the non-methylated situation (5' – 3')	Reference
ADAM23	F ATTGTTTTTTTGGTTAGAATGTCG R TAAAAAAAACACAAAAACCGAACG	F ATTGTTTTTTTGGTTAGAATGTTG R TAAAAAAAACACAAAAACCAAACA	Costa et al. (2004) [22]
DAPK	F GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC R CCCTCCCAAACGCGA	F GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT R CAAATCCCTCCCAAACACCAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001) [25]
E-CAD	F TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT R TAACTAAAATTCACCTACCGAC	F TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT R CACAACCAATCAACACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001) [25]
P14	F GTGTAAAGGGCGGCGTAGC R AAAACCCTCACTCGCGACGA	F TTTTGGTGTTAAAGGGTGGTGTAGT R CACAAAAACCCTCACTCACAACAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001) [25]
P16	F CGGGGAGTAGTATGGAGTCGGCGGC R GACCCCGAACCGCGACCGTAA	F TGGGGAGTAGTATGGAGTTGGTGGT R CAACCCCAAACCACAACCATAA	Kersty et al., (2002) [24]

F = forward primer, R = reverse primer.

Statistical analysis

The McNemar, test and confidence for two proportions and the Fisher Exact test were used to analyze the observed data. A p -value < 0.05 was considered significant.

Results

This study was composed of samples from 43 patients diagnosed with head and neck cancer and 52 samples from control individuals. There was no statistical difference in respect to age between the control group (mean age 62 years old) and the tumor group (mean age 58 years old).

The result showed that 100% (43/43) of the tumors had aberrant methylation of the promoter region in at least one of the genes analyzed and that 34,9% (15/43) presented with hypermethylation in, at least, 4 of the genes studied. The *p14* tumoral suppressor gene was hypermethylated in 30% (13/43) of these samples. The prevalence of hypermethylation of the *p16* gene was observed in 63% (27/43) of the tumors. In respect to the *DAPK*, *E-CAD*, and *ADAM23* genes, the frequency of hypermethylation of the promoter regions were 81.4% (35/43), 88.3% (38/43) and 42% (18/43) respectively.

For the control group ($n = 52$), the frequencies of aberrant methylation of the promoter regions of the *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes observed in the saliva samples were 15% (8/52), 19% (10/52), 73% (38/52), 60% (36/52) and 10% (5/52) respectively. The results demonstrated that none of the saliva samples presented with hypermethylation in at least 4 of the genes studied.



The *E-CAD*, *p16*, *p14* and *ADAM23* genes presented with a greater frequency of aberrant methylation in the tumor group samples compared to the control group ($p = 0.009$, $p < 0.0005$, $p = 0.042$ and $p = 0.0005$, respectively). There was no statistically significant evidence of differences in the frequency of aberrant methylation of the promoter region of the *DAPK* gene when comparing the control group with the tumor group (Table 2).

From 13 patients, DNA of both tumor and saliva samples was concomitantly studied. Of these, 61.5% (8/13) presented the same methylation pattern in both saliva and tumor samples for, at least, 3 genes (Table 3). There was no significant evidence of differences in the methylation between tumor and saliva samples of these patients.

Table 2 – Hypermethylation frequencies of the promoter regions of genes in the Control and Tumor Groups

Group	<i>P14</i>	<i>P16</i>	<i>DAPK</i>	<i>E-CAD</i>	<i>ADAM23</i>
Control	8	10	38	36	5
Tumor	13	27	35	38	18
<i>P-value</i>	0.042	<0.0005	NS	0.009	0.0005

NS: p-value > 0.05



T. 1374/05

Table 3 – Methylation of the promoter region of the genes of tumors and saliva of head and neck cancer patients

DNA of saliva/DNA of tumor					
Patient	<i>p14</i>	<i>P16</i>	<i>DAPK</i>	<i>E-CAD</i>	<i>ADAM23</i>
1	UU	UM	MM	MM	MM
2	MU	MM	MM	MU	MU
3	UU	UU	UU	MM	MM
4	UU	UM	MM	MM	UM
5	UU	MM	UM	UU	UU
6	UU	MU	UM	MU	UM
7	UU	UM	UM	MM	UM
8	UU	MM	MM	MM	MU
9	UU	MM	MU	MU	UU
10	UM	MU	UM	MM	MM
11	UU	MM	MM	MM	UM
12	UU	MM	MU	UM	UU
13	UU	MU	UM	UM	UM

M = methylated U = unmethylated

Discussion

Methylation is the main epigenetic event in humans and changes in the methylation pattern play an important role in tumorigenesis. In particular, hypermethylation of the *CpG* islands, normally desmethylated in the promoter region of many tumor suppressor genes, correlate with a loss of expression [26]. Development of the sensitive MSP technique has simplified studies of genes inactivated by hypermethylation of the promoter region in human cancer. The advantages of the MSP technique are its simplicity, specificity for each gene and its sensitivity, enabling the detection of one methylated gene copy in 1000 non-methylated copies [27].

The transcriptional silencing of multiple genes by hypermethylation of their *CpG* islands in the promoter region has been observed in squamous cell carcinomas in the head and neck region, including in the mouth [28].

The frequency of methylation of the promoter region of the *p16*, *p14*, *E-CAD* and *DAPK* genes has been observed in head and neck cancer samples in from 27% to 50% [8; 19; 20; 29], from 14% to 43.8% [16; 30], from 64% to 94.4% [21; 31-32] and from 7 to 68.3% [7; 8; 28; 30] of cases respectively. This is consistent with the prevalence of methylation of the majority of the genes analyzed in this study. The *p16* and *DAPK* genes in the tumor samples presented with a greater frequency of methylation of the promoter region than in previously published studies. This is, possibly, due to the fact that the samples of the current study presented different histologic characteristics from the aforementioned studies.

For the first time, hypermethylation of the *ADAM23* gene was found in head and neck cancer samples. The *ADAM23* gene (a Desintegrin and Metalloprotease domain 23

gene) codes a surface protein that possesses a potent adhesion domain and is exclusively involved in cellular adhesion processes [33]. In this study 42% of tumor samples were hypermethylated for this gene but the methylation frequency for the *ADAM23* gene in saliva samples of the control group was low suggesting the important role of a member of the *ADAM* family in head and neck carcinogenesis.

The *E-CAD*, *p16*, *p14* and *ADAM23* genes presented a greater frequency of aberrant methylation in samples from the Tumor Group when compared to the Control Group. This, as the mean age of the members of the two groups were not significantly different, confirms that the methylation pattern of the promoter region of these genes is linked to head and neck carcinogens [16; 32].

There was no evidence of significant differences in the methylation of the studied genes when comparing saliva and tumor samples of the 13 patients diagnosed with head and neck cancer. This study demonstrated that it is possible to detect aberrant methylation in the saliva of patients with head and neck cancer using the MSP technique. This technique is sensitive to detect of DNA of tumors in the saliva and may be useful to detect and monitor tumors in patients with head and neck cancer. Further studies are necessary involving greater numbers of matched tumor and saliva samples from individuals with head and neck cancer to verify the possibility of using a methylation panel for diagnosis and prognosis of this type of cancer that has high morbidity and mortality rates and where 50% of all patients are diagnosed with the disease at an advanced stage, many of whom die due to relapse [34].

DNA methylation is the only epigenetic mark preserved in genomic DNA isolated from tumours or biopsies. In theory, an enormous amount of information can be encoded by

DNA methylation patterns [35]. DNA methylation markers have obvious applications in diagnostics, but can also contribute indirectly to therapeutics as predictors of response to therapy. Early detection of cancer will allow therapeutic interventions to be applied to inhibit further development of cancer and such information could also be used in the development of strategies to prevent cancer.

References:

- [1] Go VLW, Debra AW, Butrum R. Diet, nutrition and cancer prevention: where are we going from here? Am. Society for Nutritional Sciences 2001: 3121S-3126S.
- [2] Smiraglia DJ, Smith LT, Lang JC. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). J. Med. Genet. 2003; 40: 25-33.
- [3] National Cancer Institute. <http://www.nci.nih.gov>
- [4] Dawson MI, Okamura WH. Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids. Boca Raton, FL: CRC, 1990.
- [5] Bast RC, Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Holland JF, Frei EMIL, EDITORS. Hamilton (Canada): BC Decker Inc; Cancer Medicine, 5th ed, 2000.
- [6] Fleming, ID; Philips, JL; Menck, HR; Murphy GP; Winchester DP. The National Cancer Data Base report on recent hospital cancer program progress toward complete American Joint Committee on Cancer/TNM staging. Cancer 1997; 80(12):2305-10.



- [7] Rosas SLB, Koch W, Carvalho MGC et al. Promoter hipermethylation patterns of p16, *O*⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, and *Death-associated protein kinase* in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Research* 2001; 61: 939-42.
- [8] Sanches-Céspedes M, Esteller M, Wu L et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Research* 2000; 60: 892-95.
- [9] Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur. J. Cancer* 2000; 36: 2294-3000.
- [10] Esteller M, Tortola S, Toyota M. et al. Hypermethylation-associated inactivation of *p14^{ARF}* is independent of *p16^{INK4a}* methylation and p53 mutational status. *Cancer Res.* 2000; 60:129-33.
- [11] Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 392-4.
- [12] Jones PA. Epigenetics in Carcinogenesis and Cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 983: 213-19.
- [13] Smiraglia DJ, Plass C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. *Oncogene* 2002; 21: 5414-5426.
- [14] Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nature Rev.* 2003; 3: 253-66.
- [15] Domínguez G, Silva J, Garcia JM et al. Prevalence of aberrant methylation of p14ARF and p16INK4a in some human primary tumors. *Mutation Res.* 2003; 530: 9-17.

[16] 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.* 2001; 37: 498- 504.

[17] Weber A, Bellmann U, Bootz F.; Wittekind C, Tannapfel A. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. *Virchows Arch.* 2002; 441: 133-142.

[18] Miracca EE, Kowalski LP, Nagal MA. High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. *British Journal of Cancer* 1999; 81(4): 677-683.

[19] Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16^{INK4a} gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Letters* 2001; 163: 221-28.

[20] Huang M, Yeh K, Shih H et al. The correlation between CpG methylation and protein expression pf p16 in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* 2002; 10:551-554.

[21] Chang HW, Chow V, Lam KY et al. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in orral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002; 94: 386-92.

[22] Costa FF, Verbisck NV, Salim ACM et al. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. *Oncogene* 2004; 23(7):1481-8.

[23] Sambrook J, Fritsch EF, Maniats T. *Molecular cloning – A laboratory manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA., 1989.

[24] Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ et al. Alterations of p16^{INK4a} and p14^{ARF} in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res.* 2002; 62: 5295-5300.

- [25] Zöchbauer-müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2001; 61:249-255.
- [26] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 1998; 72:141-196.
- [27] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, HAMILTON, S. R.; NELKIN, B. D.; BAYLIN, S. B. Methylation-specific PCR. A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.93:9821-9826, 1996.
- [28] Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology* 2004; 40:145-153, 2004.
- [29] Ai L, Stephenson KK, Ling W et al. The p16(CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *United States and Canadian Academy of Pathology* 2003; 16(9):944-950.
- [30] Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Res.* 2002; 8: 3164-3171.
- [31] Nakayama S, Sasaki A, Mese H et al. The e-cadherin gene is silence by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93: 667-73.
- [32] Yeh K, Shih M, Lin TH et al. The correlation between CpG methylation on promoter and protein expression of E-Cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2002; 22:3971-3976.

- [33] Sagane K, Ohya Y, Hasegawa Y, Tanaka I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem.* 1998; 334:93-98.
- [34] Goldenberg D, Harden S, Masayeva B et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130:39-44.
- [35] Jones PA, Laird PW. Cancer-epigenetics comes of age. *Nature Genetics* 1999; 21(2):163-7.

DISCUSSÃO



A metilação é a principal modificação epigenética em humanos e mudanças no padrão de metilação desempenham um importante papel na carcinogênese. Em particular, a hipermetilação de ilhas CpG no promotor desregula as regiões promotoras de muitos genes supressores tumorais, correlacionando-se com a perda de expressão de alguns. A ampla distribuição de genes

hipermetilados no DNA do genoma humano, e a inativação de genes supressores tumorais hipermetilados causam alterações de deleções cromossômicas. A metilação de ilhas CpG no DNA do genoma humano é a principal modificação epigenética em humanos e mudanças no padrão de metilação desempenham um importante papel na carcinogênese. Em particular, a hipermetilação de ilhas CpG no promotor desregula as regiões promotoras de muitos genes supressores tumorais, correlacionando-se com a perda de expressão de alguns. A ampla distribuição de genes

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa têm extensivamente investigado as ilhas CpG que estão aberrantemente hipermetiladas no câncer, como, por exemplo, a hipermetilação do gene *BRCA1* que ocorre em cânceres de mama e ovário e tem como resultado defeitos no reparo do DNA. Embora o conceito de metilação global do DNA genômico possa ter um importante papel na carcinogênese, uma análise geral em células cancerosas tem pouco a oferecer como um marcador molecular. Na investigação e detecção do câncer, um biomarcador refere-se a uma substância ou processo que é indicativo da presença do câncer no corpo. Pode ser também uma molécula secretada pelo tumor ou uma resposta específica do corpo para a presença do câncer (1,2,3,4). Para os marcadores epigenéticos serem clinicamente úteis, os métodos de detecção da hipermetilação das ilhas CpG de genes supressores de tumor têm que ser rápidos, não invasivos e sensíveis, como a PCR de metilação específica (BESTELER, 2004).

A metilação é a principal modificação epigenética em humanos e mudanças no padrão de metilação desempenham um importante papel na tumorigênese. Em particular, a hipermetilação de ilhas CpG normalmente desmetiladas na região promotora de muitos genes supressores tumorais correlaciona-se com a perda de expressão. A larga distribuição de genes hipermetilados ao longo do genoma humano, e a descoberta de genes supressores tumorais hipermetilados em regiões de alta frequência de deleções cromossômicas têm estimulado esforços para examinar o genoma da célula cancerosa (BAYLIN et al., 1998).

Nos últimos anos, vários grupos de pesquisa vem, extensivamente, mapeando as ilhas CpG que estão aberrantemente hipermetiladas no câncer, como por exemplo, a hipermetilação do gene *BRCA1* que ocorre em cânceres de mama e ovário e tem como resultado defeitos no reparo do DNA. Embora o conteúdo de metilação global do DNA genômico possa ter um importante papel na carcinogênese, sua análise geral em células cancerosas tem pouco a oferecer como um marcador molecular. Na investigação e detecção do câncer, um biomarcador refere-se a uma substância ou processo que é indicativo da presença do câncer no corpo. Pode ser também uma molécula secretada pelo tumor ou uma resposta específica do corpo para a presença do câncer (LAIRD, 2003). Para os marcadores epigenéticos serem clinicamente úteis, os métodos de detecção da hipermetilação das ilhas CpG de genes supressores de tumor têm que ser rápidos, não radioativos e sensíveis, como a PCR de metilação específica (ESTELLER, 2003).



A detecção de citosinas metiladas em sítios específicos do DNA de espécimes clínicas é notoriamente difícil porque a metilação é apagada durante os procedimentos convencionais usados para amplificar o DNA, incluindo clonagem e reação de polimerase em cadeia (PCR). A análise de Southern Blot de DNA digerido com endonucleases de restrição sensível à metilação foi previamente descrita como uma ferramenta indispensável no estudo da metilação do DNA, mas este método tem sido substituído por técnicas baseadas na modificação inicial de DNA com bissulfito de sódio seguida de PCR. O bissulfito seletivamente desamina os resíduos de citosina para uracila, deixando as citosinas metiladas intactas (WANG et al., 1980), e o DNA modificado pode ser usado como um “molde” para o PCR padrão, usando oligonucleotídeos específicos para o gene de interesse (FROMMER et al., 1992). O sequenciamento resultante da amplificação por PCR mostra um padrão preciso de citosinas metiladas, mas pode ser tecnicamente difícil e dispendioso. Uma variedade de métodos de PCR tem sido desenvolvidos, incluindo PCR de metilação específica (MSP), extensão de oligonucleotídeo de nucleotídeo sensível à metilação (Ms-SNuPE), e métodos baseados no uso de endonucleases de restrição, que são simples de serem usados mas sofrem uma desvantagem, pois somente um número pequeno de sítios CpG podem ser analisados em cada teste. Há técnicas que analisam quantitativamente ou qualitativamente a metilação do DNA, dentre estas técnicas estão a de Southern blot e *HpaII* PCR, que utilizam digestão restritiva como princípio de discriminação da metilação; e técnicas como, por exemplo, McCOBRA (melting curve combined bisulphite restriction analysis), COBRA (combined bisulphite



restriction analysis), SNaPmeth (single nucleotide polymorphism methylation) e MSP (methylation specific primer), que tem como princípio discriminante da metilação a conversão por bissulfito de sódio (LAIRD, 2003).

Entre os métodos descritos anteriormente, o mais amplamente utilizado é a PCR de metilação específica (MSP). O desenvolvimento da técnica sensível MSP tem simplificado os estudos de genes inativados pela hipermetilação da região promotora em câncer humano. Os oligonucleotídeos específicos para metilação são desenvolvidos em condições estridentes com a inclusão de controles negativos e positivos para evitar resultados falso-positivos. As vantagens da técnica MSP são sua simplicidade, especificidade para cada gene e sua alta sensibilidade, permitindo a detecção de 1 cópia gênica metilada em 1000 cópias não metiladas (HERMAN et al., 1996). Foi utilizada esta técnica neste estudo, pois, como foi citado acima, é uma técnica simples, porém sensível, sendo eficiente na busca por marcadores moleculares de metilação no câncer de cabeça e pescoço.

A hipermetilação de promotores de genes conhecidos desempenha um importante papel na tumorigênese e pode ser encontrada em estágios iniciais da carcinogênese, podendo ser útil como biomarcador. Essas alterações epigenéticas iniciais podem, de fato, produzir perda do controle do ciclo celular, quebra de interações célula-célula e célula-substrato e ainda múltiplos tipos de instabilidade genética, característico do câncer. Por exemplo, em sistemas experimentais de carcinogênese e em estágios iniciais de tumores humanos, a perda da função do gene *p16* em consequência de mecanismos



epigenéticos parece auxiliar na transposição dos pontos de checagem iniciais críticos para o começo da imortalidade celular. A hipermetilação do gene *APC*, crítico para a regulação da via transcricional β -catenina-TCF, tem sido observado em um grupo de cânceres de cólon. Similarmente, a hipermetilação do gene *p14^{ARF}* pode começar em pólipos de cólon e assim determinar como o metabolismo da proteína p53 e outras proteínas reguladas pela MDM2, a proteína regulada pela interação com *p14^{ARF}* é subsequente mediada durante a progressão do tumor. Em termos de eventos epigenéticos específicos fundamentais que levam à progressão dos tumores, a hipermetilação do gene *MLH1* é a mudança mais frequentemente associada com instabilidade de microsatélite em neoplasias de cólon, endometrial e gástrica. Entre os processos de reconhecimento célula-célula que podem predispor à invasão, a hipermetilação da região promotora do gene *E-caderina* frequentemente ocorre em estágios iniciais de câncer de mama (BAYLIN et al., 2001). O silenciamento transcricional de múltiplos genes por hipermetilação de suas ilhas CpG na região promotora também tem sido observados em carcinomas de células escamosas da região da cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral (KULKARNI & SARANATH, 2004).

A frequência de metilação da região promotora dos genes *p16*, *p14*, *E-CAD*, *MGMT* e *DAPK* tem sido observada em amostras de câncer de cabeça e pescoço em um intervalo de 27 a 50% (SANCHEZ-CESPEDES et al., 2000; NAKAHARA et al., 2001; HUANG et al., 2002; AI et al., 2003), 14 a 43,8% (SHINTANI et al., 2001; OGI et al., 2002), 64 a 94,4% (NAKAYAMA et al., 2001; CHANG et al., 2002; YEH et al., 2002), 23 a 51,7% (SANCHEZ-



CESPEDES et al., 2000; ROSAS et al., 2001; KULKARNI & SARANATH, 2004), 7 a 68,3% (SANCHEZ-CESPEDES et al., 2000; ROSAS et al., 2001; OGI et al., 2002; KULKARNI & SARANATH, 2004). A prevalência de metilação da maioria dos genes analisados no presente estudo foi consistente com os estudos citados acima, pois os genes *p14*, *E-CAD* e *MGMT* apresentaram-se hipermetilados, respectivamente, em 30%(13/43), 88,3%(38/43) e 35%(15/43) das amostras de tumores de cabeça e pescoço. As frequências de metilação da região promotora dos genes *p16* (63%%) e *DAPK* (81,4%) nas amostras de tumores apresentaram-se maiores que nos estudos anteriores. Isto possivelmente deve-se ao fato da amostragem do presente estudo apresentar características histológicas diferentes dos estudos citados acima.

Foi estudado, pela primeira vez neste trabalho, o padrão de metilação do gene *ADAM23* em câncer de cabeça e pescoço. Os Adams (A Desintegrin And Metalloprotease domains) compreendem uma família de proteínas de superfície celular de ancoragem à membrana com uma organização estrutural comum, incluindo domínios metaloprotease, desintegrina, transmembrana e citoplasmático. Os Adams são os únicos entre as proteínas de superfície celular que possuem um potente domínio de adesão e um potente domínio protease (HOWARD et al., 1999; COUSIN et al., 2000; SUZUKI et al., 2000). As interações célula-célula e matriz-matriz são conhecidas por determinar os processos de adesão celular, proliferação e migração celular, que estão diretamente envolvidos no desenvolvimento e progressão do tumor. Levando em consideração a habilidade de desenvolver essas funções citadas acima, alguns

membros da família ADAM desempenham um importante papel em cânceres humanos. O gene *ADAM 11* foi originalmente identificado como um candidato a gene supressor de tumor envolvido no câncer de mama (EMI et al., 1993), enquanto que vários membros da família ADAM (ADAM 9, 10, 11 e 15) têm sido propostos serem responsáveis por características patológicas de malignidades hematológicas (WU et al., 1997). A proteína codificada pelo gene *ADAM 23* exibe uma estrutura típica dos membros da família, entretanto, o domínio metaloprotease está inativo, sugerindo que esta proteína está exclusivamente envolvida em processos de adesão celular (SAGANE et al., 1998). No estudo de Costa et al. (2004) foi observado que tumores de mama primários com um estadiamento mais avançado possuíam uma maior frequência de hipermetilação. Neste trabalho observou-se que 42% das amostras de tumores estavam hipermetiladas para este gene e que a frequência de metilação deste mesmo gene nas amostras de saliva do grupo controle foi baixa, sugerindo o importante papel de um membro da família ADAM na carcinogênese de cabeça e pescoço.

No presente estudo, os genes *E-CAD*, *p16*, *p14* e *ADAM 23* apresentaram maior frequência de metilação aberrante nas amostras do grupo tumor em relação ao grupo controle. Isto sugere que o padrão de metilação da região promotora destes genes esteja ligado à carcinogênese de cabeça e pescoço, já que a média de idade entre o grupo controle (média = 62) e o grupo tumor (média = 58) não apresentou diferença significativa (SHINTANI et al., 2001; YEH et al., 2002).

O envelhecimento é um dos maiores fatores de risco para o câncer e as maiores taxas de câncer ocorrem em pessoas com mais de 70 anos de idade. A associação entre câncer e envelhecimento tem levado muitos cientistas a focar o acúmulo de mutações e aberrações cromossômicas como fatores primários na tumorigênese. Várias pesquisas, no entanto, tem mostrado explicações epigenéticas para a perda de expressão gênica envolvida na formação do tumor (ESTELLER et al., 2002). Estas modificações ocorrem primariamente na carcinogênese e podem iniciar o processo. Os eventos relacionados com o envelhecimento, incluindo um decréscimo geral na metilação genômica e hipermetilação de certas ilhas CpG, têm sido propostos como tendo papéis importantes no processo de tumorigênese. Um aumento na metilação *de novo* é um evento relacionado com o envelhecimento que ocorre em tecidos normais que podem progredir para metilação regional, levando ao silenciamento de genes específicos importantes para a supressão da formação do tumor (LOPATINA et al., 2002). Também tem sido proposto que a metilação dependente do envelhecimento pode afetar genes envolvidos com a regulação do crescimento e diferenciação, predispondo o genoma para outras metilações aberrantes, eventualmente levando à neoplasia (ISSA, 1999). A metilação relacionada com a idade cresce de uma maneira linear ao nível populacional, embora a taxa de crescimento das ilhas CpG metiladas pode diferenciar entre os indivíduos. Por causa da metilação ter o potencial para mudar a fisiologia celular, o risco de transformação neoplásica das células afetadas pode aumentar, levando a uma ligação mecânica entre o envelhecimento e o câncer (YUASA et al., 2002).



Em estudo realizado por Toyota et al., (1999), foi observado que 70-80% das ilhas CpG hipermetiladas em tumores primários de cólon também estavam, porém em uma extensão menor, em tecidos de cólons normais envelhecidos. Os outros 20 a 30% dos genes, como *hMLH1* e *p16^{INK4a}*, pareciam estar predominantemente metilados em um grupo de cânceres de cólon. Então, ficou postulado que havia dois tipos de metilação no cólon: metilação relacionada à idade (tipo A), que começa na mucosa normal como uma função da idade e a metilação relacionada ao câncer (tipo C) que é restrito aos cânceres e nenhuma metilação é observada no cólon normal.

A metilação relacionada à idade também têm sido encontrada em outros órgãos, como por exemplo, urotélio e estômago (HABUCHI et al., 2001; ISSA et al., 2001). O estudo de Yuasa et al. (2002) observou que o gene *hMLH1*, que é classificado como gene com ilhas CpG metiladas relacionadas ao câncer, também apresentou metilação relacionada ao envelhecimento.

Neste estudo observou-se que não houve diferença significativa para a frequência de hipermetilação do gene *DAPK* entre os dois grupos analisados. Sugere-se, portanto, que a hipermetilação deste gene é um processo ligado ao envelhecimento, pois os indivíduos pertencentes aos dois grupos analisados possuíam idade avançada em torno de 60 anos e não houve diferença significativa de idade entre os dois grupos em questão. Este dado corrobora com o estudo de Yuasa et al. (2002) que observou que o silenciamento de outros genes, como aqueles relacionados à resistência ao stress, através da metilação podem acelerar processos relacionados ao envelhecimento. Estudos adicionais são



necessários para elucidar esta controvérsia do “ovo ou da galinha”, pois há dúvidas se a metilação acelera o processo de envelhecimento ou se o envelhecimento acelera a metilação do DNA (Yuasa et al., 2002).

No presente trabalho foi observada uma maior frequência de metilação aberrante para o gene *MGMT* no grupo controle. O gene *MGMT*, relacionado com o reparo de DNA, remove a O⁶- metilaguanina do DNA pela transferência do grupo metil para uma cisteína ativa, em sua própria sequência, em uma reação que inativa uma molécula de *MGMT* para cada lesão reparada. Este gene apresenta metilação aberrante em diversos tipos de câncer, como cólon, cérebro, cabeça e pescoço e linfomas. O estudo de Kim et al. (2001) mostrou que fatores como os carcinógenos, presentes na fumaça do cigarro, induzem o processo de metilação e as ilhas CpG metiladas também são os sítios de ligação preferidos para o benzopireno diol epóxido e outros carcinógenos que são encontradas na fumaça de cigarro, causando aductos de DNA e tranversões G→T (JONES & BAYLIN, 2002). Os dados acima corroboram com o presente estudo, pois 78% dos indivíduos fumantes, pertencentes ao grupo controle apresentaram metilação aberrante na região promotora do gene *MGMT*.

A hipermetilação das ilhas CpG tem sido usada como uma ferramenta útil para detectar células cancerosas em diversos tipos de fluídos biológicos e amostras de biópsia como, por exemplo, lavagem bronquioalveolar, linfonodos, urina, sêmen, lavagem ductal, catarro e saliva (AHRENDT et al., 1999; SANCHEZ-CEPEDES et al., 1999; GOESSL et al., 2000; PALMISANO et al., 2000; ; CAIRNS et al., 2001; EVRON et al., 2001; ROSAS et al., 2001).



Neste estudo não houve evidência significativa de diferença de metilação dos genes estudados entre os tumores e as salivas dos treze pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço. Este trabalho demonstrou que é possível detectar metilação aberrante na saliva de pacientes com câncer de cabeça e pescoço através da técnica MSP. Esta técnica permite uma detecção sensível do DNA do tumor na saliva e pode ser muito útil para detecção precoce e monitoramento em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Há a necessidade de um estudo com um maior número de amostras de tumores e salivas pareadas de indivíduos diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço para a confirmação da possibilidade do uso de um painel de metilação para um diagnóstico e prognóstico deste tipo de câncer com alta incidência de morbidade e mortalidade, onde 50% de todos os pacientes possuem a doença em estágio avançado no momento do diagnóstico e muitos destes morrem por recorrência local ou regional (GOLDENBERG et al., 2004).



O presente estudo apresentou as seguintes conclusões descritas abaixo:

1. No grupo tumor, a frequência de hipermetilação dos genes *p14*, *p16*, *DMR*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* foi de, respectivamente: 30%, 63%, 81,4%, 88,3%, 42% e 35%.

CONCLUSÕES

2. No grupo controle, a frequência de metilação aberrante na região promotora dos genes *p14*, *p16*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* observada nas amostras de saliva do grupo controle foram, respectivamente: 13%, 13%, 13%, 0,7% e 11%.
3. Os genes *E-CAD*, *p16*, *p14* e *ADAM23* apresentaram maior frequência de metilação aberrante nas amostras do grupo tumor em relação ao grupo controle, sugerindo que o padrão de metilação da região promotora destes genes esteja ligado a carcinogênese de cabeça e pescoço.
4. Observou-se que não houve diferença significativa para a frequência de hipermetilação do gene *DMR* entre os dois grupos analisados, sugerindo, portanto, que a hipermetilação deste gene é um processo ligado ao envelhecimento.
5. Foi observada uma maior frequência de metilação aberrante para o gene *MGMT* no grupo controle.
6. Não houve evidência significativa de diferença de metilação dos genes avaliados entre os tumores e as salivas dos onze pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço, demonstrando que é possível detectar

O presente estudo apresentou as seguintes conclusões descritas abaixo:

1. No grupo tumor, a frequência de hipermetilação dos genes *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* foi de, respectivamente: 30%, 63%, 81,4%, 88,3%, 42% e 35%.
2. No grupo controle, a frequência de metilação aberrante da região promotora dos genes *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* observadas nas amostras de saliva do grupo controle foram respectivamente: 15%, 19%, 73%, 60%, 10% e 71%.
3. Os genes *E-CAD*, *p16*, *p14* e *ADAM 23* apresentaram maior frequência de metilação aberrante nas amostras do grupo tumor em relação ao grupo controle, sugerindo que o padrão de metilação da região promotora destes genes esteja ligado a carcinogênese de cabeça e pescoço.
4. Observou-se que não houve diferença significativa para a frequência de hipermetilação do gene *DAPK* entre os dois grupos analisados, sugerindo, portanto, que a hipermetilação deste gene é um processo ligado ao envelhecimento.
5. Foi observada uma maior frequência de metilação aberrante para o gene *MGMT* no grupo controle.
6. Não houve evidência significativa de diferença de metilação dos genes estudados entre os tumores e as salivas dos treze pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço, demonstrando que é possível detectar



metilação aberrante na saliva de pacientes com câncer de cabeça e pescoço através da técnica MSP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRENT, S. A.; CHOW, L. T.; XU, L. H.; YANG, S. C.; EISENBERGER, C. E.; ESTELLER, M.; HERMAN, J. G.; WU, L.; DECKER, P. A.; JIN, J.; SIBRANSKY, D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst.*, v. 91, n.4, p. 332-9, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL, L.; SUEN, J. Y.; HANNA, E.; FAN, C. The p15^{CDKN2a}/INK4a tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *United States and Canadian Academy of Pathology*, v.16, n. 9, p. 944-950, 2003.

BAATENDIJK DE JONG, K. J.; HERMANS, J.; MOLENAAR, J.; BRUIN, J. J.; LE CESSIE, S. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head Neck*, v. 23, n. 9, p. 718-24, 2001.

BAST, R. C.; KUTE, D. W.; FOLLOCK, R. E.; WEICHELBAUM, R. R.; HOLLAND, J. F.; FREI, B.M.L. EDITORS. Hamilton (Canada): BC Decker Inc. *Cancer Medicine*, 5th ed, 2000.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; VERTINO, P. M.; ISSA, J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.*, v. 72, p. 141-196, 1998.

AHRENDT, S.A.; CHOW, J. T.; XU, L. H.; YANG, S. C.; EISENBERGER, C. F.; ESTELLER, M.; HERMAN, J. G.; WU, L.; DECKER, P.A.; JEN, J.; SIDRANSKY D. Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. **J Natl Cancer Inst.**, v. 91, n.4, p. 332-9, 1999.

AI, L.; STEPHENSON, K. K.; LING, W.; ZUO, C.; MUKUNYADSI, P.; SUEN, J. Y.; HANNA, E.; FAN, C. The p16(CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. **United States and Canadian Academy of Pathology**, v.16, n. 9, p. 944-950, 2003.

BAATENBURG DE JONG, R. J.; HERMANS, J.; MOLENAAR, J.; BRIAIRE, J. J.; LE CESSIE, S. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. **Head Neck.**, v. 23, n. 9, p. 718-24, 2001.

BAST, R. C.; KUFEL, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; HOLLAND, J. F.; FREI, EMIL, EDITORS. Hamilton (Canada): [BC Decker Inc](#); **Cancer Medicine**, 5th ed, 2000.

BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G.; GRAFF, J. R.; VERTINO, P. M.; ISSA, J. P. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. **Adv. Cancer Res.**, v. 72, p. 141-196, 1998.



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. Gen.**, v. 10, n. 7, p. 687-692, 2001.

CAIRNS, P.; ESTELLER, M.; HERMAN, J. G. et al. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, p. 2727-2730, 2001.

CAL, S.; FREIJE, J. M.; LOPEZ, J. M.; TAKADA, Y.; LOPEZ-OTIN, C. ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the α 5 β 3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol Biol Cell.**, v. 11, n. 4, p. 1457-69, 2000.

CHANG, H. W.; CHOW, V.; LAM, K. Y.; WEI, W. I.; YUEN, A. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. **Cancer**, v. 94, n. 2, p. 386-92, 2002

COSTA, F. F.; VERBISCK, N. V.; SALIM, A. C. M.; IERARDI, D. F.; PIRES, L. C.; SASAHARA, R. M.; SOGAYAR, M. C.; ZANATA, S. M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON, A. J. G.; CAMARGO, A. A. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, (Dec.), p.1-8, 2003.

COUSIN, H.; GAULTIER, A.; BLEUX, C.; DARRIBERE, T.; ALFANDARI, D. PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. **Dev Biol.**, v. 227, n. 1, p. 197-210, 2000.

DAWSON, M. I.; OKAMURA, W.H. Chemistry and Biology of Synthetic Retinoids. Boca Raton, FL: CRC, 1990.

EMI, M.; KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; SAITO, H.; INAZAWA, J.; ITO, I.; KASUMI, F.; NAKAMURA, Y. A novel metalloprotease/disintegrin-like gene at 17q21.3 is somatically rearranged in two primary breast cancers. **Nat Genet.**, v. 5, n. 2, p. 151-7, 1993.

EPIGENOMICS. Disponível em: <http://www.epigenomics.com/en/content-Science-10041-DNAmethylation-10116.php>. Acesso em: 03/12/2004.

ESTELLER, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 2294-300, 2000A.

ESTELLER, M.; TORTOLA, S.; TOYOTA, M.; CAPELLA, G.; PEINADO, M. A.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. **Cancer Res.**, v. 60, n. 1, p. 129-33, 2000B.



ESTELLER, M.; CORN, P. G.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res.**, v. 61, n. 8, p. 3225-9, 2001.

ESTELLER, M.; FRAGA, M. F.; PAZ, M. F.; CAMPO, E.; COLOMER, D.; NOVO, F. J.; CALASANZ, M. J.; GALM, O.; GUO, M.; BENITEZ, J.; HERMAN, J. G. Cancer epigenetics and methylation. **Science**, v. 297, p. 1807-1808, 2002.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Lancet Oncolgy**, v. 3, p. 351-358, 2003.

EVRON, E.; DOOLEY, W. C.; UMBRICHT, C. B.; ROSENTHAL, D.; SACCHI, N.; GABRIELSON, E.; SOITO, A. B.; HUNG, D. T.; LJUNG, B.; DAVIDSON, N. E.; SUKUMAR, S. Detection of breast cancer cells in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. **Lancet.**, v. 357, n. 9265, p. 1335-6, 2001.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. **Nature**, v. 301, p. 89-92, 1983.

FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics takes center stage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 392-4, 2001.



FEINBERG, A. P. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. **Cancer Biology**, v. 12, p. 389-398, 2002.

FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 89, n. 5, p.1827-31, 1992.

GO, V.L.W.; DEBRA, A.W.; BUTRUM, R. Diet, nutrition and cancer prevention: where are we going from here? **Am. Society for Nutritional Sciences**, 3121S-3126S, 2001.

GOESSL, C.; KRAUSE H, MULLER M, HEICAPPELL R, SCHRADER M, SACHSINGER J, MILLER K. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. **Cancer Res.**, v. 60, n. 21, p. 5941-5, 2000.

GOLDENBERG, D.; HARDEN, S.; MASAYESVA, B.; HA, P.; BENOIT, N.; WESTRA, W. H.; KOCH, W. M.; SIDRANSKY, D.; CALIFANO, J. A. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer, **Archotolaryngol. Head and Neck Surg.**, v. 130, p. 39-44, 2004.



GROOME, P. A.; SCHULZE, K.; BOYSEN, M.; HALL, S. F.; MACKILLOP, W. J. A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. **Head Neck.**, v. 23, n. 8, p. 613-24, 2001.

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, n. 27, p. 4231-6, 2002.

HABUCHI, T.; TAKAHASHI, T.; KAKINUMA, H.; WANG, L.; TSUCHIYA, M. A.; SATOH, S.; AKAO, T.; SATO, K.; OGAWA, O.; KNOWLES, M. A.; KATO, T. Hypermethylation at 9q32-33 tumour supresor region isa ge-related in neomal urothelium and and early and frequent alteration in bladder cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 531-537, 2001.

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

HOWARD, L.; NELSON, K, K.; MACIEWICZ, R. A.; BLOBEL, C. P. J. Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. **Biol. Chem.**, v. 274, p. 31693-31699, 1999.



HUANG, M.; YEH, K.; SHIH, H.; WANG, Y.; LIN, T.; CHANG, J.; SHIH, M.; CHANG, J. The correlation between CpG methylation and protein expression of p16 in oral squamous cell carcinomas. **Int. J. Mol. Med.**, v. 10, p. 551-554, 2002.

INCA. Desenvolvido pelo Ministério da Saúde, 19962205. Apresenta textos e estimativas sobre os diversos tipos de câncer. Disponível em: <http://www.inca.org.br>. Acesso em: 04/12/2004.

ISSA, J. P. Aging, DNA methylation and cancer. **Curr. Rev. Oncol/Hematol.**, v. 32, p. 31-43, 1999.

JONES, P. A. Epigenetics in Carcinogenesis and Cancer prevention. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 983, p. 213-219, 2003.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Rev. Gen.**, v. 3, p. 415-428, 2002.

KIM, D. H.; NELSON, H. H.; WIENCKE, J. K.; ZHENG, S.; CHRISTIANI, D. C.; WAIN, J. C.; MARK, E. J.; KELSEY, K. T. p16^{INK4a} and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. **Cancer Res.**, v. 61, p. 3419-3424, 2001.



KULKARNI, V.; SARANATH, D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. **Oral Oncology**, v. 40, p. 145-153, 2004.

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Rev.**, v.3, p. 253-66, 2003.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE,



S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGETT, N.; CHENG, J. F.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAUGH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; LEE, H. M.; DUBOIS, J.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLOCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.;



BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H. C.; CHURCH D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWSKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS J, WHEELER R, WILLIAMS A, WOLF YI, WOLFE KH, YANG SP, YEH RF, COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J.; DE JONG, P.; CATANESE, J. J.; OSOEGAWA, K.; SHIZUYA, H.; CHOI, S.; CHEN, Y. J.; INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.*, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LOPATINA, N.; HASKELL, J. F.; ANDREWS, L. G.; POOLE, J. C.; SALDANHA, S.; TOLLEFSBOL, T. O. Differential maintenance and de novo methylating activity by three DNA methyltransferases in aging and immortalized fibroblasts. *J. Cell. Biochem.*, v. 84, p. 324-334, 2002.

BAYLIN, S. B.; HERNAN, T. G.; BELINSKY, S. A. Promoting lung cancer by



MIRACCA, E. E.; KOWALSKI, L. P.; NAGAL, M. A. High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. **British Journal of cancer**, v. 81, n. 4, p. 677-683, 1999.

NAKAHARA, Y.; SHINTANI, S.; MIHARA, M.; UHEYAMA, Y.; MATSUMURA, T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16^{INK4a} gene in oral squamous cell carcinomas. **Cancer Letters**, v. 163, p. 221-228, 2001.

NAKAYAMA, S.; SASAKI, A.; MESE, H.; ALCALDE, R. E.; TSUJI, T.; MATSUMURA, T. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human oral squamous cell carcinomas. **Int J Cancer**, v.93, n. 5, p. 667-73, 2001.

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. **Clinical Cancer Res.**, v. 8, p. 3164-3171, 2002.

Oral Cancer Foundation. Disponível em: <http://www.oralcancerfoundation.org/>. Acesso em: 12/12/2004.

PALMISANO, W. A.; DIVINE, K. K.; SACCOMANNO, G.; GILLILAND, F.D.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G.; BELINSKY, S. A. Predicting lung cancer by



detecting aberrant promoter methylation in sputum. **Cancer Res.**, v. 60, n. 21, p. 5954-8, 2000.

PARTRIDGE, M.; EMILION, G.; PATEROMICHELAKIS, S.; PHILLIPS, E.; LANGDON, J. Location of candidate tumour suppressor gene loci at chromosomes 3p, 8p and 9p for oral squamous cell carcinomas. **Int. J. Cancer.**, v. 83, n. 3, p. 318-25, 1999.

PARTRIDGE, M.; PATEROMICHELAKIS, S.; PHILLIPS, E.; EMILION, G. G.; A'HERN, R. P.; LANGDON, J. D. A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. **Cancer Res.**, v. 60, n. 14, p. 3893-8, 2000.

POMERANTZ, J.; SCHREIBER-AGUS, N.; LIEGEOIS, N. J.; SILVERMAN, A.; ALLAND, L.; CHIN, L.; POTES, J.; CHEN, K.; ORLOW, I.; LEE, H. W.; CORDON-CARDO, C.; DEPINHO, R. A. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. **Cell.**, v. 92, n. 6, p. 713-23, 1998.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet.**, v. 16, n. 2, p. 83-7, 2000.



REDDY, A. N.; JIANG, W. W.; KIM, M.; BENOIT, N.; TAYLOR, R.; CLINGER, J.; SIDRANSKY, D.; CALIFANO, J. Death-Associated Protein Kinase Promoter Hypermethylation in Normal Human Lymphocytes. **Cancer Res.**, v. 63, p. 7694-7698, 2003.

ROSAS, S. L. B.; KOCH, W.; CARVALHO, M. G. C.; WU, L.; CALIFANO, J.; WESTRA, W.; JEN, J.; SIDRANSKY, D. Promoter hipermethylation patterns of p16, *O*⁶-methylguanaine-DNA-methyltransferase, and Death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. **Cancer Research**, v. 61, p. 939-942, 2001.

SAGANE, K.; OHYA, Y.; HASEGAWA, Y.; TANAKA, I. Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. **Biochem.**, v. 334, p. 93-98, 1998.

SAITO, H.; TAKAZAWA, H.; UZAWA, K.; TANZAWA, H.; SATO, H. reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5' CpG island. **Int. J. Oncol.**, v. 12, p. 293-298, 1998.

SANCHEZ-CEPEDES, M.; ESTELLER, M.; HIBI, K.; COPE, F. O.; WESTRA, W. H.; PIANTADOSI, S.; HERMAN, J. G.; JEN, J.; SIDRANSKY,



D. Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. **Clin. Cancer Res.**, v. 5, n. 9, p. 2450-4, 1999.

SANCHES-CÉSPEDES, M.; ESTELLER, M.; WU, L.; NAWROZ-DANISH, H.; YOO, G. H.; KOCH, W. M.; JEN, J.; HERMAN, J. G.; SIDRANSKY, D. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Research**, v. 60, p. 892-895, 2000.

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.

SMIRAGLIA, D. J.; PLASS, C. The study of aberrant methylation in cancer via restriction landmark genomic scanning. **Oncogene**, v. 21, p. 5414-5426, 2002.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Mechanism of DNA methylation. Expert Reviews in Molecular Medicine: <http://www.expertreviews.org/> Accession information: (02)00423-4h.htm (shortcode: fig001gsb); 4 March 2002. Consultado em 03/12/2004.

SUZUKI, A.; KADOTA, N.; HARA, T.; NAKAGAMI, Y.; IZUMI, T.; TAKENAWA, T.; SABA, H.; ENDO, T. Meltrin alpha cytoplasmic domain



interacts with SH3 domains of Src and Grb2 and is phosphorylated by v-Src.

Oncogene, v. 19, n. 51, p. 5842-50, 2000.

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. USA**, v. 96, p. 8681-8686, 1999.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R. R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.;



LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; CHENG, M. L.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y. H.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; TINT, N. N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.;



MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y. H.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the human genome. *Science.*, v. 291, n. 5507, p. 1304-51, 2001.

ZHAO, Y.; ZHANG, S.; FU, B.; XIAO, C. Abnormalities of tumor suppressor genes p16 and p15 in primary maxillofacial squamous cell carcinomas. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 112, p. 26-33, 1999.

YE, K.; SHIH, M.; LIN, T. H.; CHEN, J.; CHANG, J.; KAO, C.; LIN, K.; CHANG, J. The correlation between CpG methylation on promoter and protein



expression of E-Cadherin in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 22, p. 3971-3976, 2002.

YUASA, Y. DNA methylation in cancer and ageing. **Mech. Ageing and Development**, v.123, p. 1649-1654, 2002.

WANG, R.Y.; GEHRKE, C. W.; EHRLICH, M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 8, n. 20, p. 4777-90, 1980.

WEBER, A.; BELLMANN, U.; BOOTZ, F.; WITTEKIND, C.; TANNAPFEL, A. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in primary and consecutive squamous cell carcinoma of the head and neck. **Virchows Arch.**, v. 441, p. 133-142, 2002.

WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promoting target for anticancer therapy. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, p. 443-449, 2002.

WU, E.; CROUCHER, P. I.; MCKIE, N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 437-442, 1997.



CALMON, M. E. Análise de metilação em genes múltiplos em câncer de cabeça e pescoço. São José do Rio Preto, 2005. 75p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Os cânceres da cabeça e pescoço encontram-se entre os dez mais frequentes, sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico predominantemente. Há uma lista crescente de genes supressores de tumor, silenciada pela hipermetilação

da região promotora e oncogenes que são ativados em consequência da hipometilação, que são observados em certos tipos de câncer. No presente estudo caso-controle foram analisadas a metilação da região promotora dos genes *p14^{ARF}*, *p16^{INK4a}*, *MGMT*, *DAPK*, *E-CAD* e *ADAM23* em DNA de 43

RESUMO

amostras de tumores de cabeça e pescoço. Foi avaliada se a perda do metiltransferase encontrado nas amostras de tumores para os genes citados acima poderia ser detectado nas salivas dos mesmos pacientes. No grupo tumor, a frequência de hipermetilação dos genes *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* foi de, respectivamente: 30%, 63%, 81,4%, 88,3%, 42% e 35%. No grupo controle, a frequência de metilação aberrante da região promotora dos genes *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* observados nas amostras de saliva do grupo controle foram respectivamente: 15%, 19%, 73%, 60%, 10% e 71%. Os genes *E-CAD*, *p14*, *p16* e *ADAM 23* apresentaram maior frequência de hipermetilação nas amostras do grupo tumor, o gene *MGMT* apresentou maior frequência de metilação no grupo controle e o gene *DAPK* não apresentou diferença significativa de frequência de metilação entre os grupos analisados. Não há evidência significativa de diferença de metilação dos genes estudados entre os tumores e as salivas pareadas dos pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, epigenética, metilação, marcadores moleculares

CALMON, M. F. Análise de metilação em genes múltiplos em câncer de cabeça e pescoço. São José do rio Preto, 2005. 75p. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Os cânceres da cabeça e pescoço encontram-se entre os dez mais freqüentes, sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico predominante. Há uma lista crescente de genes supressores de tumor, silenciada pela hipermetilação da região promotora e oncogenes que são ativados em consequência da hipometilação, que são observados em certos tipos de câncer. No presente estudo caso-controle foram analisados os padrões de metilação da região promotora dos genes *p14^{ARF}*, *p16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *E-CAD* e *ADAM23* em DNA de 43 amostras de tumores de cabeça e pescoço. Foi avaliado se o padrão de metilação encontrado nas amostras de tumores para os genes citados acima poderia ser detectado nas salivas dos mesmos pacientes. No grupo tumor, a freqüência de hipermetilação dos genes *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* foi de, respectivamente: 30%, 63%, 81,4%, 88,3%, 42% e 35%. No grupo controle, a freqüência de metilação aberrante da região promotora dos genes *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* e *MGMT* observadas nas amostras de saliva do grupo controle foram respectivamente: 15%, 19%, 73%, 60%, 10% e 71%. Os genes *E-CAD*, *p14*, *p16* e *ADAM 23* apresentaram maior freqüência de hipermetilação nas amostras do grupo tumor. O gene *MGMT* apresentou maior freqüência de metilação no grupo controle e o gene *DAPK* não apresentou diferença significativa de freqüência de metilação entre os grupos analisados. Não há evidência significativa de diferença de metilação dos genes estudados entre os tumores e as salivas pareados dos pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, epigenética, metilação, marcadores moleculares



CALMON, M. F., Analysis of the Methylation in Multiple Genes in Head and Neck Cancer. São José do Rio Preto, 2005, 75p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ABSTRACT

Head and neck cancer is one of the ten most frequent, with epidermoid carcinoma the predominant histological type. There is a growing list of tumor suppressing genes silenced by hypermethylation of the promoter region and oncogenes that are activated in consequence of hypomethylation, observed in certain types of cancer. In this case-control study, the methylation pattern of the promoter regions of *p16*, *p14*, *p15*, *MGMT*, *DAPI*, *E-CAD* and *ADAM23* genes in the DNA from 47 samples of head and neck tumors were analyzed. The methylation pattern found in tumoral samples of the aforementioned genes was investigated to attempt to identify the same pattern in saliva samples of the same patients. In the tumor group, the frequency of hypermethylation of the *p16*, *p14*, *DAPI*, *E-CAD*, *ADAM23* and *MGMT* genes were 30%, 63%, 81.4%, 83.3%, 43% and 23% respectively. In the control group, the frequencies of the aberrant methylation of the promoter regions of the *p16*, *p14*, *DAPI*, *E-CAD*, *ADAM23* and *MGMT* genes observed in saliva were 15%, 19%, 77%, 80%, 10% and 21% respectively. The *E-CAD*, *p16*, *p14* and *ADAM23* genes presented a greater frequency of aberrant methylation in the samples of the tumor group compared to the control group. The *MGMT* gene presented a greater frequency of methylation in the control group and the *DAPI* gene didn't presented significant difference in the frequency of methylation between the groups analyzed. There wasn't significant evidence of the difference of the methylation of the studied genes between the tumors and saliva of the patients diagnosed with head and neck cancer.

Key-words: head and neck cancer, epigenetics, methylation, molecular marker.

CALMON, M. F. Analysis of the Methylation in Multiple Genes in Head and Neck Cancer. São José do Rio Preto, 2005, 75p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Head and neck cancer is one of the ten most frequent, with epidermoid carcinoma the predominant histological type. There is a growing list of tumor suppressing genes silenced by hypermethylation of the promoter region and oncogenes that are activated in consequence of hypomethylation, observed in certain types of cancer. In this current case-controlled study, the methylation pattern of the promoter regions of *p14^{ARF}*, *p16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *E-CAD* and *ADAM23* genes in the DNA from 43 samples of head and neck tumors were analyzed. The methylation pattern found in tumoral samples of the aforementioned genes was investigated to attempt to identify the same pattern in saliva samples of the same patients. In the tumor group, the frequency of hypermethylation of the *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* and *MGMT* genes were 30%, 63%, 81.4%, 88.3%, 42% and 35% respectively. In the control group, the frequencies of the aberrant methylation of the promoter regions of the *p14*, *p16*, *DAPK*, *E-CAD*, *ADAM23* and *MGMT* genes observed in saliva were 15%, 19%, 73%, 60%, 10% and 71% respectively. The *E-CAD*, *p14*, *p16* and *ADAM 23* genes presented a greater frequency of aberrant methylation in the samples of the tumor group compared to the control group. The *MGMT* gene presented a greater frequency of methylation in the control group and the *DAPK* gene didn't presented significant difference in the frequency of methylation between the groups analyzed. There wasn't significant evidence of the difference of the methylation of the studied genes between the tumors and salivas of the patients diagnosed with head and neck cancer.

Key-words: head and neck cancer, epigenetics, methylation, molecular markers.



**Autorizo a reprodução deste trabalho
São José do Rio Preto, 14/02/2005**

Marília de Freitas Calmon



