

Marilia de Freitas Calmon

**SILENCIAMENTO EPIGENÉTICO DOS  
GENES *CRABP2* E *MX1* EM TUMORES DE  
CABEÇA E PESCOÇO**

U N E S P



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Campus de São José do Rio Preto

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

Programa de Pós Graduação em Genética

---

**Marilia de Freitas Calmon**

**SILENCIAMENTO EPIGENÉTICO DOS GENES *CRABP2*  
E *MX1* EM TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO.**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós Graduação em Genética, para  
obtenção do Título de Doutor em  
Genética.

**Orientadora: Profa. Dra. Paula Rahal**

---

São José do Rio Preto, SP.

2009

**Marilia de Freitas Calmon**

**SILENCIAMENTO EPIGENÉTICO DOS GENES  
*CRABP2* E *MX1* EM TUMORES DE CABEÇA E  
PESCOÇO**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientador:

2º Examinador:

3º Examinador:

4º Examinador:

5º Examinador:

São José do Rio Preto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/2009

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Genômicos, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, SP, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP); e no laboratório de Biologia Molecular e Genômica, do Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, São Paulo, SP, com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir que realizasse este trabalho e por ter me permitido nascer em uma linda família que sempre me apoiou em tudo que eu faço.

A minha orientadora, profa. Dra. Paula Rahal, que me deu oportunidade de realizar o meu doutorado e sempre me ensinou a ser uma pessoa ética e honesta profissionalmente. Agradeço por ter me orientado em todas as etapas do meu doutorado (tanto de perto quanto de longe) e de ter sido minha amiga, me dando sábios conselhos tanto na minha pessoal quanto profissional.

A Dra. Anamaria Camargo, que me permitiu realizar parte deste trabalho em seu laboratório, sempre atenciosa e prestativa, dando várias sugestões relevantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Sandro Valentini, Dra. Dirce Carraro, Dr. Wilson Araújo Jr., Dra. Anamaria Camargo, Dr. Cleslei Zanelli, Dra. Eloíza Tajara e Dra. Paula Rahal que me deram a oportunidade de participar do desenvolvimento de um Projeto temático da FAPESP e isso foi importante para o meu crescimento profissional e pessoal.

A Dra. Helena Brentani, que realizou as análises estatísticas deste trabalho.

Ao Rodrigo Vieira Rodrigues, mais que um amigo, que sempre esteve do meu lado durante a realização deste projeto e que me ajudou profissionalmente e pessoalmente, me ensinando que com paciência e humildade conseguimos trilhar até os caminhos mais difíceis.

Ao Ricardo Pereira, sempre muito gentil e prestativo, que me auxiliou durante o período em que passei no Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer.

A Valeria Paixão, uma pessoa iluminada, que sempre me deu apoio e carinho nos momentos tristes e alegres desta minha caminhada profissional.

A Maria Cristina, pela boa vontade e disponibilidade em realizar o seqüenciamento de todas as amostras produzidas neste trabalho.

Aos meus amigos que fiz no laboratório de Biologia Molecular e Genômica, que me acolheram com carinho e com isso eu me senti parte deste laboratório e me proporcionaram bons momentos e boas risadas durante a minha estadia no Instituto Ludwig.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de doutorado, o que contribuiu para a minha dedicação exclusiva para este trabalho.

A Carol Gomes Jardim, minha super amiga do peito, que sempre esteve do meu lado em todos os momentos da minha vida desde que a conheci.

A Cíntia Bittar, minha super amiguinha alegre, que sempre chega sorridente no laboratório, tornando o meu dia mais feliz e engraçado.

A Erica Babeto, uma pessoa muito especial, que sempre segurou minhas pontas no laboratório e com quem eu posso contar sempre que preciso.

A Paola Jocelan Scarin Provazzi, que sempre me escutou e sempre me deu conselhos valiosos sobre a vida pessoal e profissional.

A Jucimara Colombo, Marina Valsechi, Lílian Campos Pires, Mânlio Tasso, Lílian Myuki e Carol Bonfim, que cada um de sua maneira, me proporcionaram momentos agradáveis no laboratório.

A Lenira, que sempre está disposta a ajudar a todos no laboratório, principalmente nos trâmites burocráticos da UNESP e da FAPESP.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa para a realização do meu doutorado sanduíche na Universidade Johns Hopkins.

A Dra. Nita Ahuja e Dr. Stephen Baylin, que me permitiram realizar parte do meu doutorado no Laboratório de Biologia Molecular Humana, na Universidade Johns Hopkins e que me ensinaram, de maneira muito intensa, que um bom pesquisador deve se dedicar de corpo e alma a sua pesquisa e não deve ter medo dos obstáculos que aparecem durante o desenvolvimento dos projetos de pesquisa.

Ao Kornel Schuebel, um pesquisador com idéias interessantes, que sempre tinha uma solução mirabolante para os meus problemas laboratoriais e que acabava dando certo...

Ao Dr. Mashaal Dhir, uma pessoa muito obstinada e metódica, que me ajudou muito durante o período que passei nos EUA e que me falava a seguinte frase: "Não consigo dormir enquanto eu não aprendo, pelo menos, uma coisa nova por dia".

A Jana Jeschke, minha amiga alemã, que tornou meus momentos no laboratório mais alegres, principalmente durante os finais de semana, em que passávamos no laboratório, conversando sobre a vida e trabalhando.

Ao Dr. Wei Zhang, meu "mentor" na parte prática do desenvolvimento do meu projeto de doutorado sanduíche, que me ensinou todas as abordagens que utilizei no projeto e que teve muita paciência comigo durante este período.

A todos do Laboratório do Dr. Stephen Baylin, que me acolheram e me permitiram compartilhar a bancada com eles durante um ano.

A Dra. Mariana Brait, uma amiga muito muito prestativa e engraçada, que me acolheu em sua assim que eu cheguei em Baltimore e

com quem eu dividi todos os meus momentos alegres e tristes que passei nesta cidade.

A Dra. Maria Izabel Chiamolera, uma medica que admiro muito pois alem de medica e uma excelente pesquisadora e que foi minha companheira e da Mariana nos almoços na Hopkins e com quem eu vivi muitos momentos engraçados e alegres.

As famílias Calmon e Borges, que são tudo na minha e que eu tenho orgulho de pertencer a historia destas duas famílias compostas de pessoas bondosas, humildes e honestas e que sempre conseguem ver o lado bom de tudo que acontece em nossas vidas.

A meu pai, minha mãe e minha irmã, que são as pessoas mais importantes na minha vida. Agradeço seu apoio incondicional, compreensão, sobretudo nos momentos mais críticos e, a sua dedicada atenção, as lições diárias de amor e otimismo (principalmente meu pai), ao carinho e aos valores que me forem passados dos quais me orgulho muito.

Ao Eduardo Buono Saiki, que há onze anos faz parte de minha vida e que sempre esteve presente nos momentos em que eu mais precisei.

Ao Spike, Teco, Pitoca e Nero, meus lindos bebezinhos que todos os dias nos mostram que podemos ser felizes desde que tenhamos amigos com quem possamos partilhar nossas vidas.

Muito obrigada!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista." "A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É esta a emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e arte. O homem que desconhece esse encanto, incapaz de sentir admiração e estupefação, esse já está, por assim dizer, morto e tem os olhos extintos"

**Albert Einstein**

## Lista de abreviaturas e siglas

AJCC	American Joint Committee on Cancer
<i>ADAM23</i>	<i>ADAM metalloproteinase domain 23</i>
ADH	aldeído desidrogenase
AML	leucemia mielóide aguda
APC	adenomatous polyposis coli
ATP	trifosfato de adenosina
ATRX	motivo Zinc Finger rico em cisteína
<i>BRCA1</i>	<i>breast cancer 1</i>
<i>CCNA1</i>	<i>cyclin A1</i>
<i>CDH1</i>	<i>cadherin 1</i>
ChiP	Imunoprecipitação de cromatina
CID	domínio central interativo
<i>CLDN6</i>	<i>claudin 6</i>
CpA	citocina-fosfato-adenina
CpG	citocina-fosfato-guanina
CpT	citocina-fosfato-timina
CRBP	proteína ligante ao retinol celular
CRABP	proteína ligante ao ácido retinóico
<i>CRABP2</i>	<i>cellular retinoic acid binding protein 2</i>
<i>CREB</i>	<i>cAMP responsive element binding protein</i>

<i>CSTL2</i>	<i>solute carrier family 44, member 2</i>
CT	Tomografia por emissão de prótons
<i>DAPK</i>	<i>death-associated protein kinase 1</i>
<i>DDC</i>	<i>dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)</i>
DIM-5	histone H3 methyltransferase DIM-5
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
DNMT1	DNA metiltransferase 1
DNMT2	DNA metiltransferase 2
DNMT3a	DNA metiltransferase 3a
DNMT3b	DNA metiltransferase 3b
DNMT3l	DNA metiltransferase 3 like-protein
<i>EBF3</i>	<i>early B-cell factor 3</i>
E-box	seqüência de DNA que se localiza “upstream” de um gene na região promotora
<i>E2F</i>	<i>E2F transcription factor</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1</i>
<i>EGCG</i>	<i>(-)-epigallocatechina-3-gallato</i>
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<i>EGR1</i>	<i>early growth response 1</i>
<i>ETS1</i>	<i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i>
<i>EXT1</i>	<i>exostoses (multiple) 1</i>

<i>EZH2</i>	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
<i>FABP5</i>	<i>fatty acid binding protein 5</i>
<i>FBN2</i>	<i>fibrillin 2</i>
<i>FDA</i>	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FLUAV</i>	<i>Virus Influenza A</i>
<i>FUSSEL18</i>	<i>functional smad suppressing element 18</i>
<i>GADD45A</i>	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha</i>
<i>GATA1</i>	<i>GATA binding protein 1</i>
<i>GATA4</i>	<i>GATA binding protein 4</i>
<i>GSTP1</i>	<i>glutathione S-transferase pi 1</i>
GTP	guanosina trifosfato
Gy (Gray)	unidade de radiação absorvida por dose
<i>HDAC1</i>	<i>histone deacetylase 1</i>
<i>HDAC2</i>	<i>histone deacetylase 2</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>HP1</i>	<i>chromobox homolog 5</i>
<i>HPRT</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
HPV	Human Papiloma Virus
hSNF2H	actin dependent regulator of chromatin
hSWNF2H	enzima remodelante de cromatina dependente de ATP
ICF	Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies syndrome
IFN	interferon

<i>IGF2</i>	<i>insulin-like growth factor 2</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>IRX1</i>	<i>iroquois homeobox 1</i>
<i>JAK</i>	<i>JANUS KINASE</i>
<i>KIF4A</i>	<i>kinesin family member 4A</i>
K9ac	acetilação na lisina 9
K14ac	acetilação na lisina 14
K4me2	dimetilação na lisina 4
<i>K-ras</i>	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>p53</i>	<i>Supressor de tumor p53 (TP53)</i>
L1	elementos nucleares longos intercalares
<i>LHX6</i>	<i>LIM homeobox 6</i>
<i>LKB1</i>	<i>serine/threonine kinase 11</i>
<i>Lsh</i>	<i>helicase, lymphoid-specific</i>
MBD1	methyl-CpG binding domain protein 1
MBD3	methyl-CpG binding domain protein 3
m <sup>5</sup> CpG	5-metilcitosina-fosfato-guanina
MDS	Síndrome mielodisplásica
MeCP2	methyl CpG binding protein 2
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
<i>MINT31</i>	<i>spen homolog, transcriptional regulator 31</i>
Miz-1	zinc finger and BTB domain containing 17

<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2</i>
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
<i>MTHFR</i>	<i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i>
MRI	Ressonância magnética
MSP-PCR	Methylation specific primer-PCR
<i>MX1</i>	<i>myxovirus (influenza virus) resistance 1</i>
<i>MxA</i>	<i>myxovirus (influenza virus) resistance 1</i>
<i>Myc</i>	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
<i>NGALR</i>	<i>solute carrier family 22, member 17</i>
NLS	sinal localizador nuclear
OAS	2',5'-oligoadenilato sintetase
<i>p15/INK4b</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>
<i>P16</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>PAX2</i>	<i>paired box 2</i>
PBD	domínio ligante ao antígeno celular nuclear proliferante
PcG	proteínas do grupo Polycomb
<i>PCNA</i>	<i>antígeno nuclear de célula proliferante</i>
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PHD	domínio de homologia polibromo
<i>pRB</i>	<i>Retinoblastoma 1</i>
<i>PRC2</i>	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
PRK	proteína kinase ativada por RNA dupla fita

<i>p21WAF1</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
QMSP	Quantitative Methylation-Specific PCR
RA	ácido retinóico
RALDH	retinaldeído desidrogenase
<i>RARβ2</i>	<i>retinoic acid receptor, beta2</i>
RAR	receptor de ácido retinóico
RARE	elemento de resposta ao ácido retinóico
RaSH	Rapid Subtraction Hybridization
<i>RASSF1A</i>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1</i>
<i>RBP</i>	<i>proteína ligante ao retinol do plasma</i>
RLGS	Restriction Landmark Genomic Scanning
RDH	redutase de cadeia curta
<i>Rho</i>	<i>rhodopsin</i>
<i>RPRM</i>	<i>reprimido, TP53 dependent G2 arrest mediator candidate</i>
<i>RUNX3</i>	<i>runt-related transcription factor 3</i>
SAM	S-adenosilmetionina
<i>SEPT9</i>	<i>septin 9</i>
<i>Sin3a</i>	<i>SIN3 homolog A, transcription regulator</i>
<i>SLC5A8</i>	<i>solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8</i>
<i>SLC15A3</i>	<i>solute carrier family 15, member 3</i>
SDR	desidrogenase de cadeia curta
<i>SFRP1</i>	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>

<i>SNF2</i>	<i>actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 2</i>
Sp1	Sp1 transcription factor
STAT	sterol O-acyltransferase 1
<i>SUMO-1</i>	<i>SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1</i>
<i>SUV39</i>	<i>suppressor of variegation 3-9</i>
<i>TFPI2</i>	<i>tissue factor pathway inhibitor 2</i>
<i>TIMP3</i>	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>
<i>TMEFF2</i>	<i>transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2</i>
TR	Terapia de Radiação
tRNA <sub>Asp</sub>	aspartic acid transfer RNA
<i>TUBB6</i>	<i>tubulin, beta 6</i>
<i>Tyk2</i>	<i>tyrosine kinase 2</i>
<i>Ubc9</i>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog, yeast)</i>
USF	upstream transcription factor
<i>VHL</i>	<i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
Zn	zinco

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC) é uma doença heterogênea que afeta o epitélio da cavidade oral, laringe e faringe. A maioria dos pacientes é diagnosticada em estágios avançados da doença e ainda não existe nenhum marcador sensível e específico para o comportamento agressivo deste tumor. Portanto, uma detecção precoce e biomarcadores de prognóstico são altamente necessárias para uma administração mais racional da doença. A hipermetilação de ilhas CpGs é um dos mecanismos epigenéticos mais importantes que levam a um silenciamento gênico em tumores e tem sido extensivamente utilizados para a identificação de biomarcadores. Neste estudo foram combinados as análises de Rapid Subtractive Hybridization (RaSH) e *microarray* de uma maneira hierárquica para selecionar genes que, supostamente, são reativados pelo agente desmetilante 5'-Aza-2'-deoxicitidina (5Aza-dC) em linhagens celulares derivados de carcinoma de cabeça e pescoço (FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-38). Esta análise combinada identificou 78 genes dos quais 35 foram reativados em, pelo menos, 2 linhagens celulares e apresentavam ilha CpG nas suas regiões 5'. A reativação de três destes 35 genes (*CRABP2*, *MXI* e *SLC15A3*) foi confirmada por PCR em tempo real (Fold change  $\geq 3$ ). O seqüenciamento de bissulfito de sódio das suas ilhas CpGs revelou que eles estão, de fato, diferencialmente metilados em linhagens celulares derivadas de carcinoma de cabeça e pescoço. Foram detectadas uma maior frequência de hipermetilação dos genes *CRABP2* (58.1% para a região 1) e *MXI* (46.3%) em amostras primárias de câncer de cabeça e pescoço quando comparados a linfócitos de indivíduos saudáveis utilizando o PCR de metilação específica (MSP). Finalmente a ausência da proteína CRABP2 foi associada com o decréscimo das taxas de sobrevida livre de doença, sugerindo a potencial utilização da expressão do CRABP2 como um biomarcador de prognóstico para pacientes de câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: câncer de cabeça e pescoço, hipermetilação, expressão gênica, imunoistoquímica.

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a heterogeneous disease affecting the epithelium of the oral cavity, pharynx and larynx. Most patients are diagnosed at late stages of the disease and no sensitive and specific predictors of aggressive behavior have been identified yet. Therefore, early detection and prognostic biomarkers are highly desirable for a more rational management of the disease. Hypermethylation of CpG islands is one of the most important epigenetic mechanisms that leads to gene silencing in tumors and has been extensively used for the identification of biomarkers. In this study, we combined Rapid Subtractive Hybridization (RaSH) and microarray analysis in a hierarchical manner to select genes that are putatively reactivated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5Aza-dC) in HNSCC cell lines (FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A, UM-SCC-38A). This combined analysis identified 78 genes of which 35 were reactivated in at least 2 cell lines and harbored a CpG island at their 5' region. Reactivation of three out of these 35 genes (*CRABP2*, *MXI* and *SLC15A3*) was confirmed by qRT-PCR (fold change  $\geq 3$ ). Bisulfite sequencing of their CpG islands revealed that they are indeed differentially methylated in the HNSCC cell lines. Using Methylation Specific PCR (MSP), we detected a higher frequency of *CRABP2* (58.1% for region 1) and *MXI* (46.3%) hypermethylation in primary HNSCC, when compared to lymphocytes from healthy individuals. Finally, absence of the CRABP2 protein was associated with decreased disease-free survival rates, supporting a potential use of CRABP2 expression as a prognostic biomarker for HNSCC patients.

Keywords: Head and neck cancer, gene expression, Hypermethylation, immunohistochemistry

## SUMÁRIO

<b>Capítulo I – Introdução</b> .....	20
I) Câncer de cabeça e pescoço.....	21
II) Metilação.....	32
III) Mecanismos de regulação da transcrição gênica.....	48
IV) Metilação e câncer.....	56
IV.1) Metilação do DNA causando mutações pontuais.....	57
IV.2) Hipometilação do DNA.....	59
IV.3) Hipermetilação do DNA.....	61
IV.3.1) Silenciamento de genes supressores de tumor.....	62
IV.3.2) Silenciamento de genes de reparo de DNA.....	64
IV.3.3) Possíveis mecanismos para hipermetilação de ilhas CpGs no promotor em células tumorais.....	67
V) Agentes desmetilantes e câncer de cabeça e pescoço.....	73
VI) Hipermetilação em câncer de cabeça e pescoço.....	83
<b>Objetivos</b> .....	90
<b>Capítulo II – Artigo Original</b> .....	92
<b>Capítulo III – Discussão</b> .....	107
<b>Capítulo IV – Conclusões</b> .....	134
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	137
<b>Anexo I: Outras Produções Científicas</b> .....	158
<b>Anexo II: Material e métodos</b> .....	174

# ***INTRODUÇÃO***

---

### ***I. Câncer de cabeça e pescoço***

O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum, representando 6% de todos os casos e sendo responsável por uma estimativa de 650.000 novos casos e 350.000 mortes por câncer mundialmente todos os anos (Parkin *et al.*, 2005). As regiões de maior risco para este tipo de câncer incluem a Melanésia (uma sub-região da Oceania, nordeste da Austrália) e a Ásia sul central, oeste e sul europeu e África do sul, e para o câncer de laringe as regiões de maior risco são o sul e leste europeu, América do sul e oeste da Ásia (Parkin *et al.*, 2005). Somente nos Estados Unidos, foram diagnosticados 47.560 novos casos de câncer em 2008 (NCI, 2008). No Brasil, o estado de São Paulo é o estado com a incidência mais alta para o câncer da cavidade oral em homens (16,84/100.000 homens) e o estado do Rio Grande do Norte possui a incidência mais alta para as mulheres (5,44/100.000 mulheres). Para o ano de 2008 foram esperados 14.160 novos casos de câncer da cavidade oral, sendo 8.010 casos localizados somente na região sudeste (INCA, 2009).

A média de idade para o diagnóstico é em indivíduos de idade avançada (>60 anos), embora um número crescente desta malignidade está também sendo documentada em adultos jovens (Llewellyn *et al.*, 2001; Schantz e Yu, 2002). Um decréscimo sutil na incidência geral de câncer de cabeça e pescoço tem sido detectado nas últimas duas décadas. Entretanto, um aumento nos casos de câncer de base de língua e tonsilar têm sido notados (Saraiya *et al.*, 2007), que pode ser mais pronunciado em jovens adultos nos Estados Unidos e nos países europeus (Annertz *et al.*, 2002; Shiboski *et al.*, 2005).

Os tumores intraorais e de orofaringe são mais comuns entre os homens do que entre as mulheres, com uma razão homem:mulher de mais de 2,1. Entretanto esta disparidade na razão homem:mulher tem se tornado menos pronunciada ao longo dos últimos cinquenta anos, provavelmente porque as mulheres têm entrado em maior contato com carcinogênicos orais conhecidos, como o tabaco e o álcool. A incidência anual de câncer de cabeça e pescoço em Afro-americanos (12,4/100.000 indivíduos) é maior que em caucasianos (9,7/100.000 indivíduos), sendo que a incidência mais alta está entre os homens Afro-americanos (20,5/100.000 indivíduos) (Silvermman, 2001).

Apesar dos avanços na cirurgia, radiação e quimioterapia, a taxa de sobrevivência de 5 anos para o câncer de cabeça e pescoço não tem melhorado significativamente ao longo das últimas décadas, sendo que a taxa permanece em torno de 60% (Howe *et al.*, 2006). Os Afro-americanos têm uma taxa de mortalidade significativamente mais alta quando comparado aos caucasianos (4,4 versus 2,4/100.000 indivíduos) e isso ocorre parcialmente porque entre os Afro-americanos os tumores são freqüentemente descobertos em um estágio avançado (Caplan e Hertz-Picciotto, 1998).

O consumo de tabaco e álcool está implicado em 75% de todos os casos de câncer de cabeça e pescoço e tem efeito combinado multiplicativo (Vineis *et al.*, 2004). A porcentagem de pacientes que consomem tabaco diagnosticados com câncer oral é duas a três vezes maiores quando comparado à população geral. Em adição, pacientes tratados que foram diagnosticados com câncer oral e que continuam a consumir tabaco tem duas a seis vezes um risco maior de

desenvolver um segundo tumor no trato aerodigestivo superior do que aqueles que pararam de consumir tabaco (Silverman & Shillitoe, 1998). O consumo de maconha é também considerado um fator de risco potencial e pode ser parcialmente responsável pelo aumento de casos de câncer oral observado entre os jovens adultos (Zhang *et al.*, 1999). Entretanto, são ainda necessários estudos para confirmar a suposta associação entre o consumo de maconha e o câncer oral em jovens adultos.

O consumo de álcool tem sido identificado com um dos principais fatores de risco para tumores do trato aerodigestivo superior. Em estudos controlados para o consumo de tabaco, observou-se que os consumidores de álcool (moderado a alto) mostraram um risco de três a nove vezes mais de desenvolver câncer oral (Blot *et al.*, 1988; Jovanovic *et al.*, 1993; Mashberg *et al.*, 1993; Lewin *et al.*, 1998). Um estudo realizado na França observou que consumidores extremos de álcool (mais que 100 gramas de álcool por dia) tinham um risco 30 vezes maior de desenvolver câncer oral e de orofaringe. É importante mencionar a significância do efeito sinérgico do álcool e do tabaco, em alguns subgrupos de pacientes que eram consumidores extremos de álcool e tabaco podem ter mais de cem vezes um risco de desenvolver este tipo de câncer (Andre *et al.*, 1995).

Na Índia e no sul da Ásia, o uso crônico de betel na boca tem sido fortemente associado com o aumento no risco para o câncer oral. O consumo de betel frequentemente resulta em uma condição pré cancerosa progressiva da boca conhecida como fibrose da submucosa oral (Murti *et al.*, 1985).

Recentemente o HPV16 e 18 foram identificados como fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço. Aproximadamente 25% dos tumores de cabeça e pescoço contem DNA genômico do HPV. A associação entre o HPV e o câncer de cabeça e pescoço é muito forte para o câncer de tonsila, intermediária para o resto da orofaringe e fraca para a cavidade oral e laringe. Os tumores de cabeça e pescoço relacionados ao HPV ocorrem mais freqüentemente em indivíduos que não são fumantes, consumidores de álcool ou imunosuprimidos e são, freqüentemente, pobremente diferenciados ou de histologia basalóide. Algumas práticas sexuais, por causa de seus altos riscos para a transmissão da infecção por HPV, foram também notadas como fatores de risco para o câncer de orofaringe. Os tipos de HPV oncogênicos de alto risco (ex: HPV16 e HPV18) mediam seus efeitos carcinogênicos por meio das proteínas oncovirais E6 e E7, que inativam proteínas supressores de tumor p53 e pRb, respectivamente (Munger e Howley, 2002). Diferenças substanciais nos perfis de expressão gênica e defeitos cromossômicos têm sido documentados entre os tumores HPV positivos e HPV-negativos (Slebos *et al.*, 2006).

A associação entre o HPV e o câncer de cabeça e pescoço tem implicações importantes para o tratamento de prevenção e prognóstico. A positividade para HPV é um fator de prognóstico favorável no câncer de cabeça e pescoço (Licitra *et al.*, 2006). Os tumores HPV positivos têm tido uma melhor resposta a radiação, quimioterapia ou ambos e parecem ser mais suscetíveis ao sistema imune do que os tumores HPV negativos. Portanto, a infecção por HPV é um biomarcador preditivo importante que deveria ser levado em consideração no delineamento de

estudos clínicos prospectivos para o câncer de cabeça e pescoço. Por exemplo, é possível que pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço de estadiamento local avançado HPV positivos poderiam ter sucesso com terapia padrão, mas não poderiam se beneficiar de intensificação no tratamento. Finalmente, a vacinação contra o HPV mostrou-se eficiente na prevenção de câncer cervical e isto é de interesse potencial para a prevenção do câncer de cabeça e pescoço (Argiris *et al.*, 2008).

O consumo de frutas e verduras tem sido associado com o risco reduzido para o câncer de cabeça e pescoço (Pavia *et al.*, 2006). A anemia deficiente de ferro em combinação com disfagia é associada com um risco elevado de carcinoma da cavidade oral, orofaringe e esôfago (Larsson *et al.*, 1975). A imunossupressão parece predispor alguns indivíduos para um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, sendo que o carcinoma oral tem sido documentado em pacientes jovens com infecção por HIV (De Visscher *et al.*, 1997). Adicionalmente o papel de variáveis antropométricas específicas têm sido associadas ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Um estudo realizado com 1548 indivíduos na Itália observou que indivíduos do sexo masculino com um menor percentual de gordura abdominal tinham um risco maior de desenvolver câncer de laringe (Garavello *et al.*, 2006). Os fatores ocupacionais também têm sido associados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (Shangina *et al.*, 2006; Gillison, 2007). Embora a carcinogênese de cabeça e pescoço seja esporádica, a herança familiar tem sido notada (Suarez *et al.*, 2006). Além disso, o risco para o câncer de cabeça e

pescoço aumenta em indivíduos com síndromes de suscetibilidade ao câncer, como o câncer coloretal não poliposo hereditário, síndrome de Li-Fraumeni, anemia Fanconi e ataxia talangectasia (Trizna e Schantz, 1992; Foulkes *et al.*, 1996).

Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço são comumente localizados na cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe. A cavidade oral inclui a mucosa bucal, cristas alveolares superior e inferior, trígono retromolar, o assoalho da boca, palato duro, e dois terços anteriores da língua. A orofaringe inclui a base da língua, tonsilas, palato mole, úvula, parede posterior da faringe e as paredes laterais da faringe. A nasofaringe está situada atrás da cavidade nasal e tem uma parede posterior abaulada e paredes laterais que incluem a fossa de Rosenmuller e a mucosa cobrindo o tórus tubário formando o orifício do tubo Estaquiano. A hipofaringe está localizada entre a orofaringe e o esôfago cervical. A hipofaringe é dividida em três partes: o sinus piriforme, as paredes lateral e posterior da hipofaringe e a área pós cricóide. A laringe é dividida em três regiões: a laringe supraglótica, glótica e subglótica (Marur e Forastiere, 2008).

Os pacientes diagnosticados com a doença em estágio inicial apresentam sintomas vagos e achados físicos mínimos; a apresentação clínica varia de acordo com o sítio primário envolvido. Os pacientes com câncer da cavidade oral geralmente apresentam úlceras não-cicatrizantes e dores, enquanto o envolvimento da orofaringe pode resultar em sintomas de dores de garganta, disfagia crônica ou deglutição dolorosa persistente, que dura mais de seis semanas

e dores de ouvido. Pacientes diagnosticados com câncer de hipofaringe apresentam disfagia, dores de ouvido, rouquidão e às vezes adenopatia cervical. A apresentação clínica do câncer de laringe varia dependendo do subsítio. Os tumores de glote são freqüentemente diagnosticados em estágio inicial e possui uma alta taxa de cura. Estes pacientes apresentam rouquidão persistente e em estágio avançado apresentam respirações curtas ocasionais. Ao contrário, os pacientes com tumores na supraglote são diagnosticados em um estadiamento mais avançado e freqüentemente possuem uma massa no pescoço (Marur e Forastiere, 2008).

Um reconhecimento precoce dos sintomas e sinais de câncer de cabeça e pescoço é importante para um rápido diagnóstico. Ainda não existe nenhum método de rastreamento da doença, com exceção de rastreamento populacional com inspeção oral em regiões com alto risco para câncer da cavidade oral. As variantes histológicas do câncer de cabeça são raras e incluem verrucoso, basalóide, células fusiformes e carcinomas adenoescamoso. Os carcinomas pobremente diferenciados ou indiferenciados de cabeça e pescoço são administrados de forma similar ao carcinoma escamoso de cabeça e pescoço.

Um estadiamento acurado é o fator mais importante que guia as decisões sobre o regime terapêutico. Os métodos de estadiamento incluem um exame pelo cirurgião de cabeça e pescoço e uma avaliação radiológica que freqüentemente implica em imagens do pescoço por meio de tomografia por emissão de prótons (CT) ou ressonância magnética (MRI) ou ambos. O sítio mais comum de metástases distantes é o pulmão, seguido por linfonodos mediastinos, fígado e

ossos. A imagem do peito é rotineiramente feita em um rastreamento inicial e poderia detectar um segundo câncer primário no pulmão ou especialmente a presença de metástases no pulmão em câncer de cabeça e pescoço em estágio avançado. A classificação do estadiamento da sexta edição do Comitê da Junta Americana (AJCC) é amplamente usada e o critério de estadiamento varia de acordo com o sítio primário. Embora o sistema AJCC seja útil na definição da extensão anatômica do câncer, ele não inclui parâmetros patológicos ou biológicos de comportamento do tumor (Argiris *et al.*, 2008).

As decisões no tratamento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço são frequentemente complicadas, envolvendo muitos especialistas, incluindo cirurgiões de cabeça e pescoço, médicos oncologistas, radiologistas, cirurgiões plásticos e dentistas. O sítio do tumor primário, o estadiamento, a resectabilidade e os fatores do pacientes, incluindo as considerações sobre o ato de engolir e respirar, o desejo pela preservação do órgão e as doenças de comorbidade são utilizados para guiar um delineamento apropriado para o tratamento da doença. A cirurgia e a radioterapia têm sido as principais abordagens de tratamentos. Um aperfeiçoamento nas cirurgias e nas radioterapias e a incorporação de agentes sistêmicos na terapia curativa têm melhorado os resultados clínicos (Argiris, Karamouzis *et al.* 2008).

Os sobreviventes do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço enfrentam riscos, durante toda sua vida, de morrerem de doenças cardíacas ou respiratórias e de surgimento de segundo tumores primários, que são comumente associados com o consumo de cigarro (Khuri *et al.*, 2006).

Os segundos tumores primários desenvolvem em uma taxa de 3 a 5% todo ano e podem afetar todo o trato aerodigestivo. Até o presente, nenhum biomarcador estabelecido ou evidências baseadas em imagens para a sobrevivência do paciente existem, e nenhum agente quimiopreventivo teve sua eficiência comprovada.

De 1960 a 1980, a cirurgia e a terapia de radiação (TR) eram consideradas os únicos tratamentos eficientes para uma conduta curativa de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. A cirurgia é o tratamento padrão para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, mas é freqüentemente limitado pela extensão anatômica do tumor e o desejo de preservação do órgão. Quando a cirurgia é o tratamento primário, a dissecação de pescoço é realizada como parte do tratamento cirúrgico. Entretanto, após o tratamento, com quimioterapia primária, a dissecação do pescoço é freqüentemente recomendada quando se suspeita de doença residual, enquanto seu papel ainda permanece controverso no quesito resposta completa. A adaptação de procedimentos de dissecação seletiva de pescoço menos mórbido está fornecendo informações importantes sobre estadiamento para o delineamento de terapias e para a estimativa de prognóstico. A dissecação seletiva de pescoço é também um procedimento terapêutico razoável para os pescoços que não apresentam envolvimento clínico, que podem abrigar metástases em até um terço dos casos, na ausência de característica adversas histológicas em doença N1 clinicamente. A biópsia de linfonodo sentinela tem ganhado atenção por sua habilidade de detectar, de modo confiável, metástases nodais em carcinomas de células escamosas na cavidade oral e orofaringe e foi

validado por um grande teste multi-institucional realizado pela Faculdade Americana do Grupo de Cirurgiões Oncológicos. No futuro, os riscos de metástase poderão ser determinados por meio de assinaturas moleculares genéticas no linfonodo sentinela ou no tumor primário.

A radioterapia é uma parte integral do tratamento primário ou adjuvante do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. A radioterapia sozinha resulta em um alto controle do tumor e altas taxas de cura para estágios iniciais de câncer de glote, língua e tonsila. Avanços na imagem e entrega de radiação tem mudado drasticamente as abordagens nos tratamentos. Tomografias computadorizadas planejadas são agora freqüentemente combinadas com tomografia computadorizada de diagnóstico, imagem de ressonância magnética ou dados da tomografia de emissão de pósitron para melhorar a delimitação do tumor em três dimensões. A terapia de radiação para o tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é tipicamente dado em pequenas frações diárias de 2.0 Gy, 5 dias por semana, até uma dose total de 70 Gy ao longo de sete semanas. Os esquemas de altas doses por fração têm sido testados para estágios iniciais de carcinoma de células escamosas de laringe, com resultados excelentes e não foi observado nenhum aumento nos efeitos tóxicos (Le *et al.*, 1997).

As longas interrupções na radioterapia ou atrasos no começo da radioterapia pós-operativa são potencialmente prejudiciais, presumivelmente por causa da repopulação das células cancerosas (Bese *et al.*, 2007). Para contornar a cinética do tumor e explorar as diferenças no reparo de danos entre as células tumorais e saudáveis, os regimes de radioterapia de fracionamento alterado foram

introduzidos. Adicionalmente, a combinação de esquemas de fracionamento alterado e quimioterapia têm sido testadas em testes clínicos com resultados promissores (Bernier, 2005).

O papel da quimioterapia no tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço tem evoluído de um cuidado paliativo para um componente central do programas curativos para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço localmente avançados. Várias classes de agentes como os compostos de platina, antimetabólitos e taxanos tem mostrado uma atividade de agente único contra o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. O composto de platina, cisplatina, é tido como um agente padrão na combinação com radiação ou com outros agentes. As combinações baseadas no taxano são mais ativas e têm sido testadas na quimioterapia de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço localmente avançado (Argiris, 2005). Além disso, a inibição de *EGFR* tem emergido como uma nova estratégia de tratamento para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (karamouzis *et al.*, 2007), e o cetuximab é o primeiro agente direcionado a um alvo molecular que tem sido introduzido como uma prática padrão.

Uma série de eventos genéticos leva a inativação de genes supressores de tumor ou ativação de proto-oncogenes ou ambos, guiando com isso o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. As técnicas moleculares identificaram alterações genéticas e epigenéticas em lesões pré malignas e invasivas e permitiram o delineamento de um modelo de progressão hipotética para a carcinogênese de carcinoma de células escamosas de

cabeça e pescoço, que inicia-se com a observação de deleções e inativações e vai até a observação de deleções e inativação do PTEN que estão presentes no carcinoma invasivo (Califano *et al.*, 1996; Perez-Ordonez *et al.*, 2006; Ha & Califano, 2006). Células inflamatórias, imune e estromais contribuem para a carcinogênese e a resistência ao tratamento. A telomerase, que está envolvida na manutenção do telômero e imortalização, encontra-se reativadas em 90% do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e em lesões pré malignas (McCaul *et al.*, 2002). A perda do 9p21 é uma aberração genética muito comum porque ela tem sido encontrada em 70 a 80% dos casos de câncer de cabeça e pescoço (Mao *et al.*, 1996). A inativação do gene *p16*, que é causada por uma deleção homozigótica, mutações pontuais ou hipermetilação do promotor e a perda de 3p poderiam ser eventos iniciais na carcinogênese de cabeça e pescoço (Perez-Ordonez *et al.*, 2006).

Esperam-se elucidar-se adicionais dos eventos moleculares no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço para acelerar o desenvolvimento de novos agentes potencialmente eficientes e identificação de biomarcadores, que poderia otimizar o tratamento.

## ***II. Metilação***

O controle do início da transcrição em células de mamíferos pode ser dividido em três categorias: força intrínseca do promotor e disponibilidade do core da maquinaria de transcrição (Dvir *et al.*, 2001; Sandelin *et al.*, 2007), as ações de fatores de transcrição reguladores ou promotores específicos (positivo ou

negativo) (Malik e Roeder, 2005; Schulz *et al.*, 2007) e o controle da acessibilidade do DNA por alteração da estrutura da cromatina (Horisberger e Gunst, 1991; Gillison, 2007). Esta última categoria, incluindo as modificações pós traducionais de histonas e modificações pós replicacionais do DNA são menos compreendidos que as outras duas primeiras categorias.

Os genomas dos eucariotos carregam marcas químicas que são adicionadas ao DNA ou a cromatinas. Esta informação epigenética não é uniforme, mas é aplicada regionalmente e ela sinaliza ou preserva as atividades locais, como a transcrição ou o silenciamento gênico. O resumo total de todas as informações epigenéticas é denominado de epigenoma. Se quisermos entender o significado biológico e biomédico do fenômeno epigenético é obviamente importante mapear o epigenoma em alguns detalhes. Entretanto, diferentemente do genoma, o epigenoma é altamente variável entre as células e flutua no tempo de acordo com as condições de até mesmo uma única célula. Portanto, há pelo menos tantos epigenomas quanto há tipos celulares (Suzuki e Bird, 2008). As mudanças epigenéticas podem ser divididas, de maneira geral, em três processos interativos: a metilação de DNA, a modificação de histonas e o remodelamento de cromatina (Gal-Yam *et al.*, 2008).

A metilação do DNA refere-se a uma adição bioquímica de um grupo metil a bases nucleotídicas. A adenina pode ser modificada na posição 6-N (em bactérias e também na maioria dos eucariotos) (Baniushin, 2005), a citosina pode ser modificada na posição 4-N (na maioria das bactérias termofílicas) (Gromova e Khoroshaev, 2003) e na posição 5-C. A última modificação é a forma mais

comum de alteração do DNA entre todos os organismos (Leonhardt *et al.*, 1992). O genoma dos mamíferos contém aproximadamente  $3 \times 10^7$  resíduos de 5-metilcitosina ( $m^5C$ ), sendo a maioria localizada dentro de 5'- $m^5CG$ -3' dinucleotídeos (Leonhardt *et al.*, 1992). A modificação epigenética mais estudada em humanos é a metilação da citosina do DNA dentro do dinucleotídeo CpG; 3 a 6% de todas as citosinas estão metiladas no DNA normal humano. Em eucariotos superiores, os pares CpGs são os principais hotspots para mutação por causa da desaminação espontânea de  $m^5C$  em timina (T). A transição C→T resulta na eliminação progressiva de sítios CpG metilados de seqüências codificantes durante a evolução (Bird, 2002; Januchowski *et al.*, 2004). Potencialmente, os dinucleotídeos CpGs metiláveis não estão aleatoriamente no genoma humano, ao contrário, as regiões ricas em CpG conhecidas como ilhas CpGs estão localizadas na região final 5' (promotor, região não traduzida e 1 éxon) de muitos genes, que normalmente não estão metilados em células normais (Hanahan e Weinberg, 2000).

A metilação, juntamente com as modificações de histonas, desempenha um papel importante na modulação da estrutura da cromatina, controlando então a expressão gênica e muitos outros processos dependentes de cromatina (Kouzarides, 2007). Os efeitos epigenéticos resultantes mantêm os vários padrões de expressão gênica em diferentes tipos celulares (Turner, 2007). Os processos epigenéticos incluem imprinting genômico (Hore *et al.*, 2007), silenciamento gênico (Lande-Diner *et al.*, 2007; Miranda e Jones, 2007), inativação do cromossomo X (Yen *et al.*, 1998), reprogramação do processo de transferência

nuclear (Nagano *et al.*, 2004; Reik, 2007) e alguns elementos da carcinogênese (Gronbaek *et al.*, 2007). A metilação do DNA também está associada com fenômenos como reparo do DNA (Walsh e Xu, 2006), iniciação de dimorfismo sexual (Schaefer *et al.*, 2007), progressão por meio de pontos de checagem da divisão celular (Unterberger *et al.*, 2006) e supressão de um grande número de elementos transponíveis e retrovirais no genoma de mamíferos (Bird e Wolffe, 1999).

A metilação da citosina ocorre depois da síntese do DNA, pela transferência enzimática de um grupo metil do doador S-adenosilmetionina (SAM ou Adomet) para o carbono da posição 5' na citosina e a reação enzimática é feita por uma das enzimas chamada DNA metiltransferases (DNMTs) (Figura 1). A posição 5 da citosina é relativamente não reativa e sua metilação em solução aquosa neutra tem sido chamada de uma reação “quimicamente improvável”. Todas as enzimas metiltransferases utilizam um mecanismo comum catalítico e empregam o cofator AdoMet (S-adenosilmetionina (SAM)) como fonte do grupo metil. O início da reação ocorre quando a citosina é impulsionada para fora do DNA e inserida em um sítio ligante da enzima metiltransferase. Neste sítio ativo, a cisteína tiolato catalítica forma um estado de transição intermediário com o carbono 6 do anel da citosina. Isto cria uma enamina 4-5 reativa que ataca o grupo metil fornecido pelo cofator. Após o grupo metil ser transferido para a posição 5 do carbono do anel da citosina, a remoção do próton da posição 5 causa a reconstrução da ligação dupla 5,6 e o desligamento da enzima por  $\beta$ -eliminação (Siedlecki *et al.*, 2006) (Figura 2).

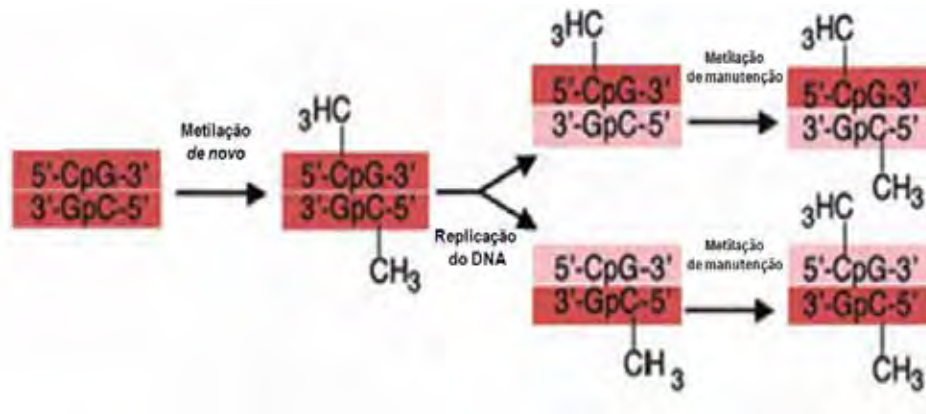


Figura 1- Processo de herdabilidade do padrão de metilação. A metilação é uma modificação estável que é herdada por meio das divisões celulares (metilação de manutenção). A preferência das DNA metiltransferase de manutenção por substratos hemimetilados e seus alvos para metilação permitem a cópia do padrão de metilação da fita parental de DNA para a fita filha de DNA recém sintetizada. (Modificado de Kanai et al., 2008)

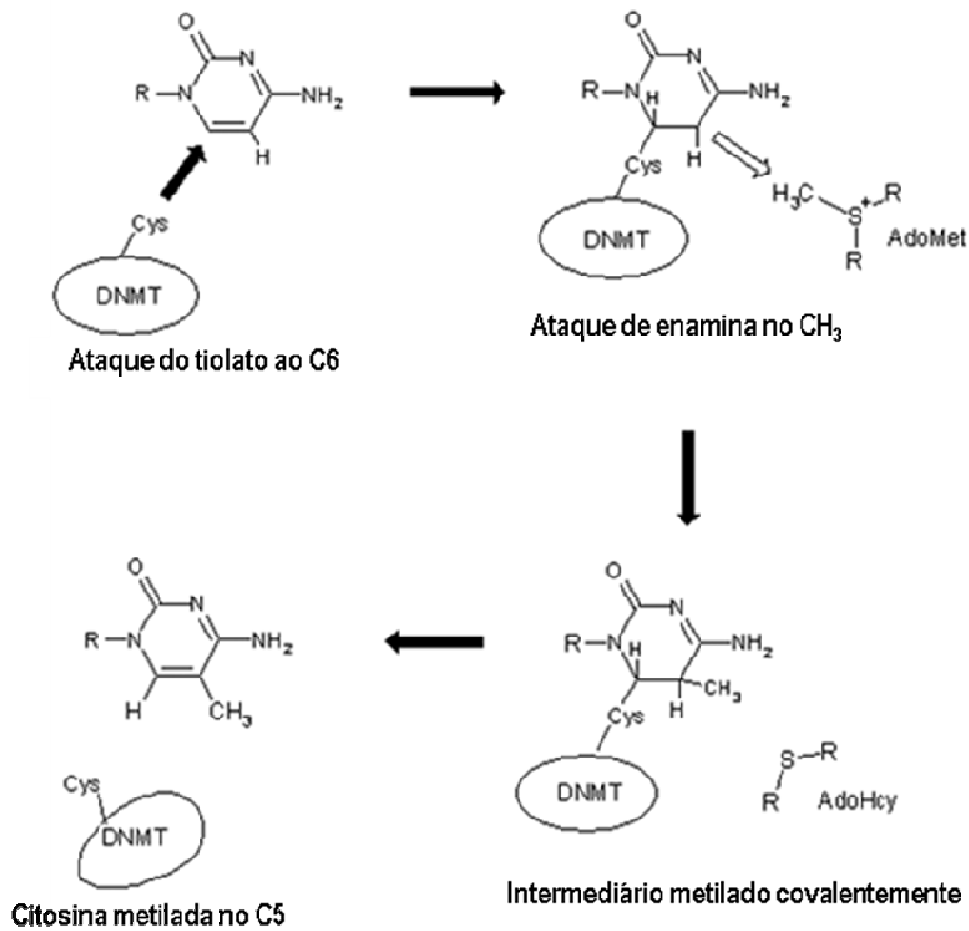


Figura 2- Reação catalisada pela DNA metiltransferase (DNMT) (Modificado de Siedlecki et al., 2006).

As DNMTs (DNA metiltransferases) usam o S-adenosil-L-metionina (AdoMet) como um doador de grupos metil. A primeira DNMT foi isolada e clonada da bactéria *Haemophilus haemolyticus*. Esta enzima bacteriana é composta de 327 resíduos de aminoácidos e três vezes menor que as DNMTs eucarióticas (Kumar *et al.*, 1994). A família de DNMT eucariótica possui cinco membros: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3l. As DNMTs de mamíferos contêm pelo menos três regiões estruturais: o domínio regulatório N-

terminal, que é responsável pela localização de DNMTs no núcleo; o domínio catalítico C-terminal, que se assemelha àquele da enzima procariótica e o ligante central, que consiste de dipeptídeos repetidos GK (Figura 3) (Araujo *et al.*, 2001). O domínio N-terminal desempenha um papel regulatório e contém os seguintes elementos: domínio ligante ao antígeno celular nuclear proliferante (PBD), sinal localizador nuclear (NLS), motivo Zinc Finger rico em cisteína (ATRX), domínio de homologia polibromo (PHD) e um domínio ligante a cromatina tetrapeptídeo PWWP (Posfai *et al.*, 1989; Leonhardt *et al.*, 1992). Em contraste, a seqüência primária do domínio catalítico C-terminal de DNMTs eucarióticas contém dez seqüências de motivos característicos diferentes, sendo que seis delas são evolutivamente conservadas: motivos I,IV,VI,VIII,IX e X.

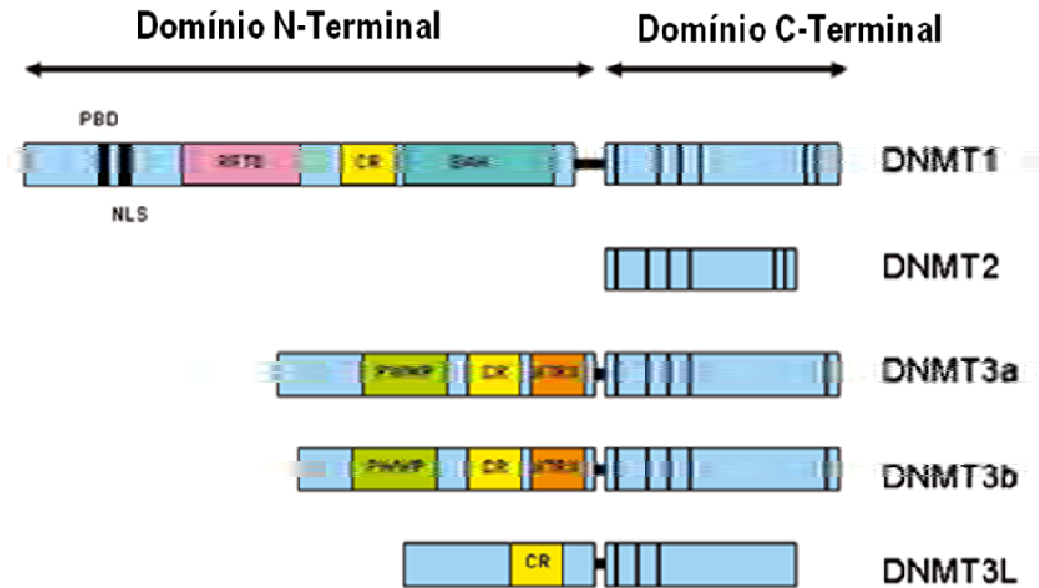


Figura 3- Arranjos dos domínios dos membros de DNA metiltransferases (Modificado de Siedlecki et al., 2006).

A primeira DNA metiltransferase eucariótica que foi purificada e clonada foi denominada DNMT1. Inicialmente sua habilidade de metilação de novo foi identificada (Leonhardt *et al.*, 1992) e, mais tarde, esta enzima foi identificada por possuir uma preferência de 5 a 30 vezes maior para DNA hemimetilado, dependendo da seqüência nucleotídica (Yoder *et al.*, 1997). Por causa desta preferência, a família de DNMT1 foi reconhecida como metiltransferase de manutenção. O termo “manutenção da metilação” se refere a um processo que reproduz o padrão de metilação do DNA parental para as fitas filhas de DNA. Este processo fornece a herdabilidade para os padrões de DNA genômico que são

copiados durante a replicação do DNA. De fato, a DNMT1 está intimamente associada com a maquinaria de replicação do DNA e tem a preferência por novas seqüências CpGs cujo complemento tem o grupo metil aderido.

Além disso, sabe-se que a atividade específica da DNMT1, em substratos de DNA não metilados, é maior que as enzimas DNMT3a e DNMT3b, reconhecidas como metiltransferases *de novo* (Okano *et al.*, 1998; Hsieh, 2005). Se esta atividade é inibida por alguns fatores celulares que reforçam a maioria da manutenção da metilação, ou se a DNMT1 também tem características de metilação para a realização da metilação *de novo in vivo*, ainda continua um mistério.

A DNA metiltransferase 1 eucariótica é uma proteína, aproximadamente, três vezes maior que a procariótica e foi sugerido que a eucariótica é resultado de uma fusão de três genes, um sendo uma metiltransferase procariótica ancestral (Margot *et al.*, 2000). Esta enzima é formada por dois domínios: a região N-terminal funcionando como um ligante do DNA e domínio regulatório e a parte C-terminal reconhecida como um domínio catalítico. Os primeiros 621 aminoácidos da região N-terminal não são essenciais para a atividade da DNMT1. Entretanto, o domínio N-terminal é essencial para a discriminação entre as fitas de DNA metiladas e hemimetiladas e é responsável pela diminuição na atividade de metilação *de novo*. O domínio N-terminal é formado por múltiplos domínios que realizam funções especializadas para eucariotos incluindo: importação para o núcleo, coordenação da replicação e metilação durante a fase S e a supressão parcial da metilação *de novo* (Leonhardt *et al.*, 1992). O domínio que posiciona a

DNMT1 nos pontos de replicação media uma dramática redistribuição da DNMT1 durante a fase S (Leonhardt *et al.*, 1992); a distribuição uniforme nucleoplasmática na fase G<sub>1</sub> é seguida na fase S pela união em pontos discretos que são organizados ao redor de agregações de DNA satélite  $\gamma$  em núcleos de fibroblastos de camundongo. Durante o meio e o final da fase S estes pontos toroidais são os principais sítios da replicação do DNA e no início da fase S há muitos pontos pequenos de replicação espalhados pelo núcleo (Leonhardt *et al.*, 1992).

O motivo rico em carga do domínio N-terminal da enzima DNMT1 interage com a DNMT1 e reprime a transcrição sem a participação de HDAC (histona desacetilase). O domínio N-terminal também pode interagir com outras proteínas, incluindo o antígeno nuclear de célula proliferante (PCNA), a enzima remodelante da cromatina dependente de ATP (hSNF2H), o inibidor de cinase dependente de ciclina (p21WAF1) e o fator de transcrição E2F1, HDAC1 ou HDAC2 (Zhang *et al.*, 1999; Pradhan e Esteve, 2003; Hermann *et al.*, 2004; Robertson *et al.*, 2004). O domínio N-terminal da DNMT1 também pode reconhecer as proteínas MBD1, MBD3, MeCP2 e HP1. A interação da DNMT1 com numerosas proteínas supressores de promotores sugere que esta DNA metiltransferase é também um elemento crucial do complexo de supressão da transcrição.

Os motivos ATXR Zinc Finger e o domínio ligante-PCNA (PBD) da DNMT1 também interagem respectivamente com o DNA e PCNA durante a replicação. Isto causa uma melhor apresentação das seqüências alvos (TS) e

domínios PBHD, que estabiliza os pontos de replicação e induz um aumento na taxa de biossíntese de novas fitas de DNA. A DNMT1, que forma o centro do complexo da maquinaria de replicação está também envolvida no sistema de reparo do DNA (Dharel *et al.*, 2008).

A função da DNMT1 em células de mamíferos tem sido intensivamente investigada com experimentos realizados em camundongos ou em células embrionárias de murinos. A perda de função dos alelos de *DNMT1* produz várias mudanças importantes na célula. A mudança mais visível é a desmetilação severa do genoma, embora a metilação ainda esteja presente em 5% comparado ao tipo selvagem (Leid *et al.*, 1992). Entre outras mudanças observadas foram o aumento (aproximadamente 10 vezes) nas taxas de mutação em células embrionárias e um pequeno defeito no sistema de reparo de DNA (Jinno *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2004). Outra observação importante foi que as células embrionárias que não possuem a enzima DNMT1 crescem normalmente em um estado indiferenciado, porém quando induzidas a se diferenciar morrem em consequência de apoptose (Robertson, 2005). A apoptose é também a causa da morte dos embriões que não possuem o gene *DNMT1*.

As enzimas DNA metiltransferases mais conservadas são aquelas pertencentes à família DNMT2. A DNMT2 é também a mais amplamente distribuída, pois seus homólogos estão presentes até mesmo em espécies que, de acordo com a literatura, não metilam o seu DNA (por exemplo, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*). Estas enzimas são as

mais enigmáticas pois as suas funções ou o seu substrato ainda não são compreendidos (Hermann *et al.*, 2004).

A DNMT2 humana é uma proteína relativamente pequena, com 391 aminoácidos, que não possuem os grandes domínios de reconhecimento N-terminais presentes na DNMT1 e DNMT3. A ausência da parte N-terminal faz da enzima DNMT2 uma DNA metiltransferase peculiar que mais se assemelha as enzimas bacterianas (Siedlecki e Zielenkiewicz, 2006).

A forte conservação das seqüências dos 10 motivos catalíticos sugere que a DNMT2 deveria ser uma DNA citosina metiltransferase. Porém, até agora, é incerto se esta enzima é uma citosina metiltransferase ativa. Alguns ensaios falharam em detectar qualquer atividade de DNA metiltransferase em DNMT2 (Okano *et al.*, 1998; Yoder e Bestor, 1998; Dong *et al.*, 1999). Por outro lado, dois sistemas de ensaios independentes mostraram que a proteína DNMT2 purificada tem uma fraca atividade de DNA metiltransferase (Hermann *et al.*, 2003) e, também, há resultados demonstrando que a DNMT2 é necessária e suficiente para a metilação do DNA em *Drosophila* sugerindo uma atividade DNA metiltransferase CpT/A-específica para as proteínas DNMT2 (Kunert *et al.*, 2003).

A enzima DNMT2 está presente na maioria dos tecidos adultos de humanos e camundongos (Yoder e Bestor, 1998; Goll e Bestor, 2005). Seus padrões de expressão são muito semelhantes àqueles da DNMT1. Os organismos que contêm membros das famílias DNMT1 e DNMT3 sempre contêm DNMT2. Entretanto, células tronco embrionárias homozigotas para a disrupção do gene

*DNMT2* não mostram anormalidades de metilação e apresentam um fenótipo normal (Okano *et al.*, 1998; Yoder e Bestor, 1998). Foi sugerido que os homólogos de *DNMT2* poderiam ter um papel na função do centrômero. A estrutura e função do centrômero são conservadas entre as espécies que tem uma homologia de *DNMT2*, sendo um pouco diferente das espécies que não possuem essas enzimas (Leonhardt *et al.*, 1992; Hermann *et al.*, 2004).

Goll e col. observaram que as enzimas *DNMT2* purificadas de humano e de *Drosophila melanogaster* podem metilar citosina em tRNA<sub>Asp</sub> e não em DNA (Goll e Bestor, 2005). Esses achados poriam a *DNMT2* entre as RNA metiltransferases apesar da forte conservação dos motivos catalíticos de *DNMT*. Embora a mais nova função atribuída a *DNMT2* possa explicar algumas das questões sobre esta enzima, há novas perguntas que ainda não foram respondidas e por isso a enzima *DNMT2* continua sendo enigmática e um desafio para a comunidade científica (Siedlecki e Zielenkiewicz, 2006).

A família *DNMT3* inclui duas enzimas *DNMTs de novo* ativas, *DNMT3a* e *DNMT3b* e um fator regulatório, *DNMT3-like* proteína (*DNMT3L*) (Leonhardt *et al.*, 1992). A *DNMT3a* e *DNMT3b* possuem arranjos de domínios similares: ambas contêm uma região variável no N-terminal seguida pelo domínio PWWP que pode estar envolvido na ligação não específica do DNA (Qiu *et al.*, 2002; Lukasik *et al.*, 2006), e, ainda, domínios ligante 3-Zn rico em cisteína (compreendendo seis motivos CXXC) e um domínio catalítico C-terminal. A sequência de aminoácidos de *DNMT3L* é muito semelhante a das *DNMT3a* e *DNMT3b* no domínio ligante 3-Zn rico em cisteína, mas ela não possui os

resíduos conservados necessários para a atividade metiltransferase no domínio C-terminal.

As DNMT3a e DNMT3b exibem um alto grau de homologia de estrutura primária, mas estas enzimas são codificadas por dois genes diferentes mapeados no cromossomo 2p33 e 20q11.2 respectivamente (Xie *et al.*, 1999). Estas metiltransferases metilam dinucleotídeos CpG sem preferência por DNA hemimetilado e são responsáveis pela metilação *de novo* do DNA, particularmente durante a embriogênese. As atividades de DNMT3a e DNMT3b são reduzidas até a diferenciação de células troncos e permanecem baixas em células somáticas adultas. A expressão de DNMT3a é onipresente enquanto que a DNMT3b está expressa em níveis baixos na maioria dos tecidos com exceção dos testículos, tireóide e medula óssea (Xie *et al.*, 1999). O nível de DNMT3b está profundamente aumentado em várias linhagens celulares de tumores indicando que a enzima desempenha uma papel importante na tumorigênese (Robertson *et al.*, 1999; Hermann *et al.*, 2004).

A arquitetura das enzimas DNMT3a e DNMT3b é consistente com a estrutura geral das DNMTs. Os domínios PWWP das DNMT3a e DNMT3b podem interagir com a cromatina e então estas regiões regulatórias destas enzimas são capazes de se ligar a vários repressores transcricionais (Qiu *et al.*, 2002). A DNMT3a pode se ligar ao co-repressor RP58, fator oncogênico PML-RAR ou proteína HP1 $\beta$  enquanto que a DNMT3b pode ser associado com Sin3a, cocondensina, KIF4A, SUMO-1/Ubc9 e enzima remodelante de cromatina dependente de ATP (hSWNF2H) (Pradhan e Esteve, 2003; Geiman *et al.*, 2004).

As DNMT3a e DNMT3b podem também interagir com a DNMT1 e ativar HDAC1 que desacetila histonas e reprime a transcrição gênica. Isto indica que a DNMT3a e DNMT3b podem estar envolvidas na remodelação da cromatina associada com a modulação da transcrição gênica. Kelly e Trasler observaram que a DNMT3a é responsável pela aquisição de padrões de metilação *de novo* durante o desenvolvimento pré natal de células germinativas masculinas enquanto que a DNMT3b está envolvida na manutenção de metilação *de novo* em estágios iniciais da mitose de células germinativas masculinas (Kelly e Trasler, 2004). Os diferentes papéis da DNMT3a e DNMT3b na gametogênese masculina sugere que ambas as enzimas são essenciais neste processo e não podem ser substituídas uma pela outra (Kelly e Trasler, 2004).

A DNMT3a exibe um nível mais baixo de atividade metiltransferase quando comparado com a DNMT1. Isto pode indicar que a DNMT3a requer uma proteína pequena ou co-fatores para uma atividade ótima. Além disso, a DNMT3a exibe uma preferência por sítios de metilação que são flanqueados por pirimidinas (Hermann *et al.*, 2004). Embora a DNMT3a seja altamente específica para a metilação de dinucleotídeo CpG, esta enzima também é capaz de metilar citosinas em dinucleotídeos CpA e CpT embora a função desta modificação do DNA ainda seja desconhecida (Ramsahoye *et al.*, 2000).

A DNMT3b é especializada para a metilação de dinucleotídeos CpG dentro de seqüências repetidas das regiões satélites pericentroméricas dos cromossomos. As mutações dentro do gene DNMT3b podem estar associadas a imunodeficiência genética humana, instabilidade cromossômica e síndrome de

anomalias da face (síndrome ICF) (Gowher *et al.*, 2005). Indivíduos com a síndrome ICF frequentemente carregam alelos com uma mutação no domínio C-terminal da DNMT3b. As anormalidades na cromatina de pacientes com ICF incluem DNA completamente desmetilado dentro de regiões pericentroméricas dos cromossomos 1, 9 e 16 (Leonhardt *et al.*, 1992; Geiman *et al.*, 2004; Kelly e Trasler, 2004).

O RNA mensageiro da enzima DNMT3b pode ter numerosas formas de splicing alternativo que apresentam uma variação de grau de ligação de DNA que vai do baixo até o alto. A existência de isoformas de DNMT3b sugere que outros fatores podem estar envolvidos na ligação do DNMT3b a uma região particular do DNA (Robertson *et al.*, 1999).

A proteína da DNA metiltransferase DNMT3l não possui motivos do sítio ativo de metiltransferase ativa e deve cooperar com outras DNMTs *de novo* (Deplus *et al.*, 2002; Margot *et al.*, 2003). O gene DNMT3l está localizado no cromossomo 21q22.3 e é principalmente expresso em linhagem germinativa pós natal feminina durante a aquisição de padrões de metilação do DNA. A DNMT3l contém uma seqüência sinal de localização de núcleo ativo (NLS) e o motivo zing finger ATRX que, respectivamente, possibilita a translocação desta proteína para o núcleo e a ligação da mesma ao DNA. As mesmas seqüências NLS e ATRX foram encontradas nas enzimas DNMT3a e DNMT3b (Aapola *et al.*, 2002).

O motivo conservado PHD-like da DNMT3l interage com HDAC1 e a ativa. O papel de DNMT3l na ativação de HDAC1 indica que esta proteína também está envolvida na desacetilação de histona, remodelamento de cromatina

e repressão da transcrição. Este dado também sugere que estas DNMTs são proteínas epigenéticas multifuncionais que também ativam a modificação de histona e a reconstrução da estrutura da cromatina (Turek-Plewa e Jagodzinski, 2005).

A DNMT3l se liga a parte carboxi-terminal de DNMT3a e DNMT3b e aumenta o nível de atividade destas enzimas. A interação de DNMT3l de camundongo com DNMT3a induz mudanças conformacionais com aumento da afinidade de ligação de AdoMet ao sítio ligante do substrato. A DNMT3l humana aumenta de 1,5 a 3 vezes a atividade de DNMT3a e DNMT3b mas não afeta a atividade de DNMT1. Adicionalmente, o complexo DNMT3a /DNMT3l exibe uma maior afinidade de ligação com o DNA quando comparado com a DNMT3a sozinha. Isto sugere que a DNMT3l é translocada para o núcleo, se liga ao DNA e pode servir como um fator de troca de substrato para as metiltransferases funcionais DNMT3a e DNMT3b (Turek-Plewa e Jagodzinski, 2005).

### ***III. Mecanismos de regulação da transcrição gênica***

A unidade básica de cromatina é o nucleossomo, que é um dímero de 2 complexos iguais, cada um consistindo de 4 proteínas histônicas: H2A, H2B, H3 e H4 (Pruss *et al.*, 1995). As caudas N-terminais das histonas H3 e H4 são altamente carregadas e estão associadas ao DNA. A cromatina foi vista no passado como uma entidade estática, que empacotava o DNA em uma forma condensada e mantinha a integridade do DNA. Entretanto, estudos estabeleceram que a histona passa por diversas modificações covalentes, que incluem acetilação,

metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação (Zhang e Reinberg, 2001). Estas modificações formam um código que regula a função da cromatina, pela influência da dinâmica do cromossomo, ditando as expressões dos genes pela definição do acesso da maquinaria de transcrição aos genes, assim como controlando o acesso do genoma a outras maquinarias como reparo, replicação do DNA e segregação cromossômica (D'alessio e Szyf, 2006).

A acetilação das caudas terminais das histonas H3 e H4 é um sinal predominante para a cromatina ser ativada pelo aumento do acesso à maquinaria de transcrição. O sinal é removido pela ação de histonas desacetilases (HDAC). A metilação da histona na lisina 9 catalisada pela Suv39 recruta a proteína da heterocromatina HP-1, que condensa a cromatina em uma estrutura inativa. A metilação de histona na lisina 4, por outro lado, está associado à ativação gênica. Embora acreditasse que a metilação das histonas fosse um processo irreversível, foram identificadas que as desmetilases de histonas podem remover marcas repressoras ou ativadoras de metilação de histonas (Metzger *et al.*, 2005).

A metilação do DNA interfere na expressão gênica por mecanismos diretos e indiretos. Primeiro, a metilação de um sítio CpG e o reconhecimento de seqüências de fatores de transcrição obstrui sua interação com seqüências de reconhecimento de DNA. Segundo, a metilação de uma região em volta de um sítio regulatório de transcrição atrai proteínas com domínio ligante ao DNA metilado, como MeCP2, que recruta corepressores e histonas desacetilases que inativam a configuração da cromatina ao redor do gene. Este paradigma do silenciamento do gene pela metilação do DNA é um dos mais finos exemplos da

estreita relação entre a metilação do DNA e a estrutura da cromatina (D'alessio e Szyf, 2006).

Originalmente, a atenção foi focada na relação entre a metilação do DNA e a estrutura de cromatina inativa. Estudos iniciais demonstraram que, quando o DNA metilado é transfectado em células, ele assumia uma estrutura de cromatina inativa. Isto levou a uma noção de uma relação unidirecional entre a metilação do DNA e a estrutura da cromatina. Portanto, acreditou-se que embora o silenciamento gênico envolva ambas a metilação do DNA e inativação da cromatina, a metilação do DNA leva a um silenciamento gênico e, portanto um gene metilado poderia somente ser ativado se a metilação fosse removida. Geralmente era demonstrado que os inibidores de HDAC somente ativariam genes metilados em cooperação com o inibidor de metilação do DNA. A noção de que a metilação do DNA é o sinal primário na inativação do gene recebeu suporte experimental do descobrimento de proteínas ligantes ao DNA metilado e suas habilidades de recrutar proteínas modificantes de histonas para os genes metilados (D'alessio e Szyf, 2006).

Entretanto, dados recentes sugerem que essa visão unidirecional precisa ser revista e que a estrutura da cromatina poderia também ditar os padrões de metilação do DNA. Brenner e col. mostraram que as proteínas que estão envolvidas no silenciamento da cromatina recrutam DNA metiltransferases para os genes. Szyf e colaboradores, com base nos resultados de pesquisas sobre o assunto, sugeriram que a hipometilação do DNA poderia também ser ditada pela

cromatina e com isso propuseram que há uma relação bidirecional entre a metilação do DNA e a estrutura da cromatina (Szyf *et al.*, 2004).

A evidência genética para um possível papel de causa da cromatina no delineamento dos padrões de metilação do DNA veio dos estudos de Tamaru e Selker, que mostraram que a histona metiltransferase DIM-5 de *Neurospora crassa* é importante para a metilação normal do DNA (Tamaru *et al.*, 2003).

Há evidência genética em mamíferos de que a disrupção da cromatina influencia a metilação do DNA. Em camundongos, a deleção do gene *Lsh*, que codifica a helicase SNF2 envolvida no remodelamento da cromatina, produz uma perda substancial de metilação do DNA por todo o genoma (Fan *et al.*, 2003). Isto sugere que a atividade presumida de remodelamento da cromatina do *Lsh* é crucial para a organização dos padrões de metilação do DNA. Interessantemente, o gene *Lsh* está envolvido na mediação dos padrões de metilação *de novo* pela interação com DNMT3a e DNMT3b. O gene *Lsh* não afeta a manutenção de epissomos previamente metilados e a proteína *Lsh* não mostrou interagir com DNMT1 (Zhu *et al.*, 2003). Em humanos a mutação no gene *ATRX* codificante de um membro da família SWI/SNF de proteínas remodelantes de cromatinas leva a um certo déficit de metilação do DNA.

Um modelo atrativo de mecanismo no qual a cromatina poderia direcionar a metilação do DNA seria o modelo de D'Alesio *et al.* (2006) no qual enzimas modificantes de cromatina recrutam DNMTs para genes específicos (figura 4). A primeira linha de dados consistente com esta hipótese veio de estudos que examinaram a interação entre HDAC1 e DNMT1 (Fuks *et al.*, 2003). Foi

subseqüentemente mostrado que a DNMT1 também interage com a HDAC2 (Rountree *et al.*, 2000). Experimentos mostraram que as DNMTs interagem com as histonas metiltransferase SUV39 (Fuks *et al.*, 2000), que metila a histona H3 na posição lisina 9 e EZH2, um membro do complexo policomb de multiproteínas PRC2, que metila a histona H3 na posição lisina 27 (Vire *et al.*, 2006). Ambas as marcas de modificações inativam a cromatina (Cao *et al.*, 2002). Estes estudos mostram o significado de alvos de DNMTs em promotores para o estabelecimento e manutenção de um padrão de metilação do DNA específico. Uma segunda linha de dados mostra que a EZH2 não somente serve para recrutar a DNMT para cromatina, mas também posiciona a metilação do DNA-complexos multiprotéicos de modificação de histona para seqüências específicas no DNA (Vire *et al.*, 2006). Desde que o knock-down de *EZH2* resulta na perda de metilação do DNA de um gene alvo metilado, a marcação de DNMTs é necessária não meramente para a iniciação da metilação de novo, mas também para a segurança da manutenção deste padrão. Estes estudos corroboram com a hipótese de que esta marca de cromatina precede a metilação do DNA e predispõe o DNA a metilação.

A existência de uma programação de expressão gênica baseada em cromatina em organismos cujo genoma não contém citosinas metiladas sugere que, de uma perspectiva evolucionária, a modificação da cromatina precede a metilação do DNA. Por exemplo, não há evidência para metilação do DNA em *Saccharomyces cerevisiae*; entretanto este organismo possui um sofisticado silenciamento gênico baseado em cromatina homólogo àquele encontrado em vertebrados (D'alessio e Szyf, 2006).

Esta noção de inativação de cromatina anterior a metilação tem também o suporte da cronologia da inativação gênica em mamíferos. Por exemplo, um estudo cronológico demonstrou que a metilação do gene *HPRT* no cromossomo X inativo ocorre após a inativação do cromossomo (Lock *et al.*, 1987). Similarmente, o silenciamento da  $\gamma$ -globina fetal precede a metilação do DNA (Enver *et al.*, 1988). Um estudo de inativação epigenética do gene supressor de tumor *RASSF1A* em células epiteliais mamárias proliferantes demonstrou que, com o aumento do número de passagens, o gene *RASSF1A* era dramaticamente silenciado. A trimetilação da histona H3K9 ocorre ao mesmo tempo em que a inativação gênica e precede a metilação do DNA (Strunnikova *et al.*, 2005). Bachman e colaboradores (Bachman *et al.*, 2003) estudaram o silenciamento do gene *p16* em cultura celular seguido de metilação do DNA e mostraram que a metilação da histona H3 na posição lisina 9, que correspondeu ao silenciamento do gene, ocorreu antes da metilação do DNA.

Um possível modelo para a vantagem de possuir 2 níveis de informação epigenética é que o silenciamento gênico é um mecanismo de auto reforçamento no qual a metilação da histona H3 na posição lisina 9 leva a ligação de moléculas adaptadoras, como a HP1, que por sua vez recruta metilases de DNA. A metilação do DNA direciona a ligação do DNA metilado a proteínas ligantes, como o MeCp2, que por sua vez recruta as HDACs para desacetilar histonas e então adicionalmente precipitar a um estado fechado da cromatina. A informação do silenciamento epigenético passa da cromatina para o DNA e vice-versa. Este auto reforço pode ter evoluído para prevenir dispersão ou perda da informação

epigenética. A perda inadvertida de modificações de cromatina associadas com o DNA metilado seria rapidamente corrigida pelo recrutamento de enzimas modificantes de cromatina (Nan, Cross *et al.*, 1998; Nan, Ng *et al.*, 1998), enquanto a perda aberrante de metilação do DNA seria corrigida pelo recrutamento de DNMTs pela cromatina modificada.

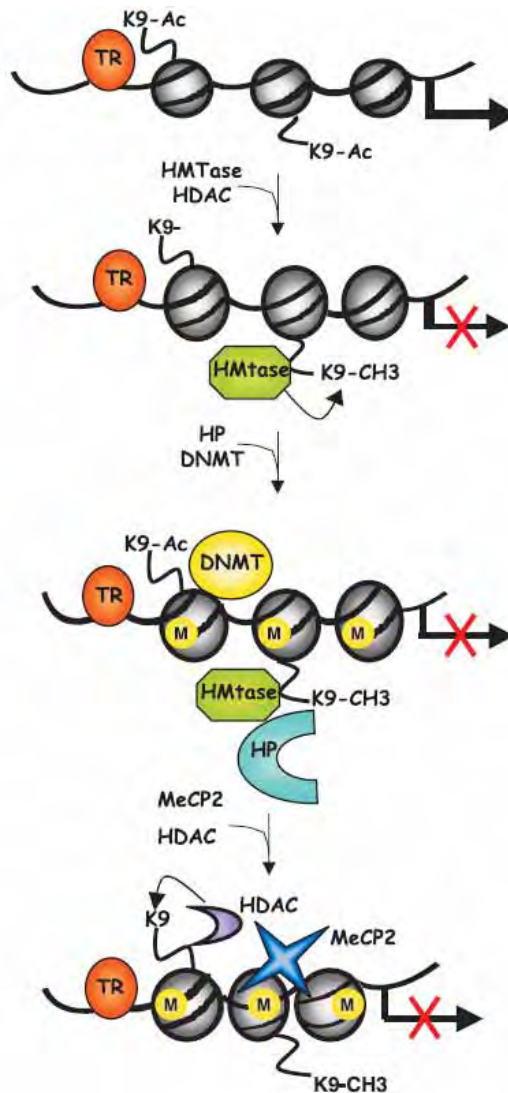


Figura 4 – A cromatina inativa atrai as DNA metiltransferases (DNMTs). Os repressores transcripcionais recrutam as metilases de histonas (ex: SUV39) para metilar a lisina 9 da histona 3 (H3K9), estabilizando o estado inativo pelo recrutamento da HP1 e DNMTs. O DNA metilado resultante serve para guardar o estado inativo pela tração de proteínas ligantes ao DNA metilado, como a MeCP2, que por sua vez recruta as desacetilases de histonas para condensar e inativar a cromatina (Modificado de D'alesio et al., 2006)

A cromatina pode afetar a metilação do DNA em ambas as direções, iniciando a metilação *de novo* do DNA ou a desmetilação. Esta conexão é extremamente importante para o estabelecimento de diferentes programas epigenéticos não somente na transformação celular, mas também nas áreas fisiológica, comportamental, e patológica. Entretanto, enquanto a metilação do DNA e a modificação da cromatina interagem uma com a outra, a metilação do DNA afeta mecanismo de fechamento de cromatina a longo prazo em muitas situações como, por exemplo, a repressão definitiva de retroelementos e transposons e a formação de cromatina facultativa. Dados recentes apontaram para o papel da programação epigenética no comportamento e na adaptação a diferentes comportamentos de interação.

#### ***IV. Metilação e câncer***

Na última década houve mudanças fundamentais dos determinantes do câncer. Isto se deveu principalmente ao acúmulo de evidências indicando que a desregulação epigenética em células contribuem e cooperam com as alterações genéticas em todos os estágios do desenvolvimento e progressão do câncer. Anteriormente, a maioria dos esforços em pesquisas na área de câncer ocorreu sobre a premissa que as alterações genéticas ocorrem em genes que possuem um papel chave em diferentes processos celulares incluindo proliferação e diferenciação celular, apoptose, adesão entre outros. Entretanto, uma forte e crescente linha de evidência indica que as mudanças epigenéticas têm uma contribuição significativa nas perdas ou ganhos de funções em células cancerosas.

As mudanças genéticas e epigenéticas afetam a atividade dos genes. As alterações genéticas levam a uma marca permanente no genoma que podem afetar ou a função da proteína, quando localizada na região codificadora do gene ou sua expressão, quando ocorre em regiões regulatórias. As mudanças epigenéticas relevantes para o câncer ocorrem nas regiões regulatórias de genes codificadores de proteínas, resultando em uma expressão alterada, ou em seqüências repetitivas, onde eles têm sido propostos estarem associados com alterações cromossômicas. (Jacinto *et al.*, 2007).

O padrão da metilação da citosina influencia a formação do câncer em muitas formas. Primeiramente a citosina metilada pode alterar as regiões codificadoras dos genes pela adição de mutações pontuais; em segundo lugar a depleção de metilcitosina no genoma pode causar instabilidade no genoma e em terceiro lugar a hipermetilação focal dos promotores dos genes pode inativar a transcrição do gene.

#### ***IV.1. Metilação do DNA causando mutações pontuais***

A formação de mutações pontuais é facilitada pelos resíduos de metilcitosina em muitas formas. A citosina metilada pode sofrer desaminação espontânea para timina, que faz disto um mutagênico endógeno. Quando as transições C→T permanecem sem correção no genoma e ocorre na região codificadora dos genes, elas podem se transformar mutações pontuais causadoras de doenças. No câncer, estas mutações tipicamente causam mudanças na função dos genes que estão envolvidos na regulação do crescimento celular e

sobrevivência. Mais de 30% de todas as mutações pontuais na linhagem germinativa conhecidas relacionadas a doenças ocorrem em dinucleotídeos CpG, incluindo mutações “*hot spots*” de genes supressores de tumor. Além disso, muitas das maiorias das mutações comuns do gene *TP53*, que ocorre em células somáticas e incluem hot spots nos códons 248, 273 e 282 são causadas por transições C→T, e isto mostrou que os CpGs nestas regiões estão metilados em tecidos normais (Rideout *et al.*, 1990). Foi demonstrado que até 1/3 de todas as mutações na linhagem germinativa e aproximadamente metade de todas as mutações somáticas ocorrem em CpGs metilados.

Em um estudo recente, o seqüenciamento de múltiplos genes associados ao câncer em câncer coloretal e em câncer de mama revelou uma diferença na presença de mutações em sítios CpGs: em câncer coloretal 44% das mutações foram transições C→T enquanto somente 17% dos casos de câncer de mama apresentaram mutações C→T. Estes dados indicam que a freqüência de mutações induzidas por metilação variam entre os tecidos, que é provavelmente causado por diferentes habilidades de reparar os pareamentos errôneos G:T nos tipos celulares individuais (Sjoblom *et al.*, 2006).

A metilação também pode facilitar o efeito mutagênico de carcinogênicos exógenos. Foi mostrado que a metilcitosina favorece a formação de adutos no G adjacente com o carcinógeno benzopireno diol epóxido presente na fumaça produzida pelo cigarro. Isto causa as mutações transversionais G→T em sítios m<sup>5</sup>CpG no DNA em pulmões e no trato intestinal de fumantes (Yoon *et al.*, 2001). Mais recentemente, mostrou-se que mudanças estruturais similares em m<sup>5</sup>CpGs

no gene *TP53* foram causadas por acreolina, um abundante aldeído mutagênico presente na fumaça do cigarro. Além disso, a metilação de citosina altera a onda de absorção de luz da base em uma faixa incidente de luz do sol, que favorece a formação de dímeros de pirimidina (CC-TT) no DNA da pele sobre exposição à luz UV. Acredita-se que isto causa um aumento da taxa de mutações do *TP53* em peles expostas à luz solar (Pfeifer *et al.*, 2000).

#### ***IV.2. Hipometilação do DNA***

Em geral, as células cancerosas são caracterizadas pela hipometilação genômica global e hipermetilação focal de ilhas CpGs, que geralmente não estão metiladas em células normais. O baixo nível de metilação em tumores, quando comparados com o nível de metilação do DNA em suas contrapartes normais, foram uma das primeiras alterações epigenéticas a ser encontradas em câncer humano (Feinberg e Vogelstein, 1983). A perda de metilação deve-se principalmente a hipometilação de seqüências repetitivas de DNA e desmetilação de regiões codificadoras e íntrons, regiões do DNA que permitem versões alternativas de RNA mensageiro que é transcrito de um gene (Feinberg e Tycko, 2004). Um estudo recente de larga escala de metilação do DNA com o uso de microarrays genômicos detectou extensas regiões genômicas hipometiladas em áreas pobre em genes. Durante o desenvolvimento de um neoplasma, o grau de hipometilação do DNA genômico aumenta conforme a lesão progride de uma proliferação benigna de células a um câncer invasivo (Fraga *et al.*, 2004).

Três mecanismos foram propostos para explicar a contribuição da hipometilação do DNA para o desenvolvimento de uma célula cancerosa: geração de instabilidade cromossômica, reativação de elementos transponíveis e perda do imprinting genômico. O baixo nível de metilação pode favorecer a recombinação mitótica, levando a deleções e translocações (Eden *et al.*, 2003) e isto pode também promover rearranjos cromossômicos. Este mecanismo tem sido visto em experimentos no qual a depleção da metilação do DNA pela interrupção das DNMTs causaram aneuploidia (Karpf e Matsui, 2005). A hipometilação do DNA em células malignas pode reativar o DNA endoparasítico intragenômico, como o L1 (elementos nucleares longos intercalares) e repetições Alu (seqüências recombinantes) (Leonhardt *et al.*, 1992). Estes transposons com baixo nível de metilação podem ser transcritos ou translocados para outras regiões genômicas, interrompendo com isso o genoma.

A perda de grupos metil do DNA também pode interromper o imprinting genômico. Na síndrome Beckwith-Wiedemann (uma síndrome caracterizada por gigantismo e macroglossia), há a perda do imprinting do gene *IGF2* e um aumento do risco de câncer (Feinberg, 1999). A perda do imprinting do gene *IGF2* é também um fator de risco para o câncer coloretal e a interrupção do imprinting genômico contribui para o desenvolvimento do tumor de Wilms (Cui *et al.*, 2003; Kaneda e Feinberg, 2005). Em modelos animais, camundongos com a perda do imprinting de *IGF2* ou outros defeitos no imprinting têm um aumento no risco de desenvolvimento de câncer. Normalmente, certos genes específicos de testículos, genes que codificam antígenos de melanoma ou genes específicos relacionados à

proliferação estão silenciados em células somáticas porque as ilhas CpGs das regiões promotoras dos genes estão metiladas. Em algumas células cancerosas, ao contrário, estas regiões promotoras sofrem desmetilação e os genes freqüentemente reprimidos se tornam expressos. Dois exemplos notáveis do mecanismo de hipometilação são a ativação do gene *PAX2* (um gene que codifica o fator de transcrição envolvido na proliferação e em outras atividades importantes das células) e a ativação do mir-RNA *let-7a-3*, que estão envolvidos em câncer endometrial e de cólon (Wu *et al.*, 2005; Brueckner *et al.*, 2007).

A hipometilação do DNA pode ter efeitos imprevisíveis. A progênie de um camundongo deficiente em metilação do DNA e um camundongo *Min*, que tem um defeito genético no gene *APC* e com tendência a desenvolvimento de adenoma de cólon teve um número menor de tumores do que o esperado; ao contrário, outra linhagem de camundongo com defeito nas DNMTs teve um aumento no risco de linfoma. Além disso, a hipometilação suprime os estágios tardios da tumorigênese intestinal (Laird *et al.*, 1995) mas promove lesões iniciais pré-cancerosas no cólon e fígado através de deleções genômicas (Yamada *et al.*, 2005).

### ***IV.3. Hipermetilação do DNA***

Aproximadamente 200 genes estão mutados em câncer de mama e cólon, com uma média de 11 mutações por tumor (Sjoblom *et al.*, 2006). A vasta maioria dos genes identificados neste estudo não era conhecida por serem geneticamente alterados em tumores e eram preditos afetarem uma ampla faixa de funções celulares, incluindo transcrição, adesão e invasão com uma ampla faixa de

impactos potenciais para a contribuição do câncer. Similarmente, um número médio de ilhas CpGs hipermetiladas em um particular câncer é uma questão de grande interesse. A resposta poderia iluminar na contribuição de eventos genéticos e epigenéticos no desenvolvimento do câncer e a sinergia entre eles. Resultados obtidos usando várias abordagens indicam uma faixa entre 100 a 400 ilhas CpGs hipermetiladas na região promotora em um dado tumor, embora estes números estão propensos a mudanças conforme os estudos epigenômicos são realizados em uma faixa mais ampla de tipos tumorais. Similarmente, por causa das conseqüências variadas das alterações genéticas de diferentes genes, as conseqüências funcionais do silenciamento epigenético em certos genes serão mais desvantajosas que os genes com funções mais restritas ou específicas.

A inativação epigenética de certos genes tem um efeito específico em uma única atividade. Por exemplo, a inativação epigenética do gene *p15/INK4b* (Herman *et al.*, 1996) ou do gene *EXT1* (Jacinto *et al.*, 2007) são específicos para leucemias e afetam diretamente os níveis de expressão e função de um único gene. Entretanto, quando o gene que sofre a inativação epigenética é um regulador transcricional, como o gene *SFRP1* (Fukui *et al.*, 2005) ou *GATA4* (Akiyama *et al.*, 2003), seu silenciamento afeta os genes alvos para estes fatores e portanto o defeito epigenético resulta em uma cascata de amplificação epigenética.

#### ***IV.3.1. Silenciamento de genes supressores de tumor***

Acredita-se que as mudanças genéticas que resultam na inativação ou função alterada de genes supressores de tumor são essenciais no desenvolvimento

e progressão do câncer humano (Jones e Baylin, 2002; Feinberg e Tycko, 2004). As pesquisas estão se baseando profundamente na detecção de mudanças genéticas usando abordagens de genes candidatos e estudos genômicos. Entretanto, atualmente é amplamente aceito que os eventos epigenéticos também são mecanismos freqüentes que contribuem para o silenciamento de genes supressores de tumor. De fato, a hipermetilação de genes supressores de tumor, juntamente com a hipometilação global do DNA constituem alterações comuns em câncer humano. Em muitos casos, o silenciamento de genes supressores de tumor pela hipermetilação da região promotora pode afetar diferentes vias celulares contribuindo para a tumorigênese (Herman *et al.*, 1996).

A hipermetilação do DNA ocorre em ilhas CpGs e é tipicamente associada com o silenciamento gênico. De fato, muitos estudos demonstraram que genes com altos níveis de metilcitosina em suas regiões promotoras estão freqüentemente silenciados. Tais hipermetilações têm sido associadas com um grande número de malignidades humanas, além de doenças não cancerígenas e envelhecimento. Há uma lista crescente de genes supressores de tumor que são silenciados por meio de hipermetilação. A inativação do gene *p16 (CDKN2A)*, do gene retinoblastoma (*RB*) e do gene *VHL* são exemplos de genes supressores de tumor silenciados pela hipermetilação da região promotora. Um número de outros genes supressores de tumor e genes relacionados ao câncer, incluindo *p15*, *BRCA1*, *RASSF1A*, *LKB1*, *MTHFR* e *CDH1* também são silenciados por este mecanismo (Jacinto *et al.*, 2007). A lista de genes alterados por mecanismos epigenéticos está expandindo rapidamente e com o Projeto Epigenoma Humano

em preparação, mais genes alterados por mecanismos epigenéticos serão identificados (Jones e Martienssen, 2005).

Entretanto, apesar de pesquisas intensivas e as fortes evidências experimentais implicando a hipermetilação do DNA no silenciamento de genes supressores de tumor, o mecanismo que ativa a metilação *de novo* patológica ainda permanece pobremente entendida. Varias hipóteses têm sido discutidas: a superexpressão de DNMTs, a perda de atividade transcricional e a estabilização de DNMT na região promotora (Tycko, 2000). É provável que a inativação de genes supressores de tumor por meio de metilação aberrante do DNA tenha as mesmas conseqüências que a inativação destes genes por meio de mecanismos genéticos. As conseqüências incluem comprometimento da fidelidade da replicação do DNA, reparo do DNA e divisão mitótica, que podem gerar instabilidade genômica e aumento dos eventos mutacionais.

#### ***IV.3.2. Silenciamento de genes de reparo do DNA***

Mais recentemente, com estudos sobre o silenciamento dos genes, surgiu uma ligação interessante entre a inativação epigenética dos genes de reparo de DNA e a indução de mudanças genéticas. Uma observação intrigante sugere que as mudanças genéticas (como as mutações), uma marca registrada da maioria dos neoplasmas, pode ser simplesmente secundário e conseqüência do silenciamento epigenético de genes de reparo do DNA. Isto é uma questão importante já que muitos estudos genéticos estão limitados com relação a causalidade do câncer e a patogênese. A inativação transcricional por hipermetilação de CpGs das regiões

promotoras de uma grupo particular de genes envolvidos no reparo do DNA (*MLH1*, *MGMT* e *BRCA1*) e destoxificação de carcinógenos (*GSTP1*) pode causar mudanças genéticas levando ao câncer (Jones e Baylin, 2002; Jacinto *et al.*, 2007).

O reparo do DNA é uma parte importante de um arsenal de ferramentas elaborado pelas células para enfrentar lesões do DNA diárias e constantes provenientes do meio ambiente (radiação UV, radiação ionizante) e agentes endógenos (por produtos do metabolismo celular) (Lindahl *et al.*, 1993; Lindahl e Barnes, 2000). As células evoluíram diferentes mecanismos para reparar as lesões do DNA causadas por stress genotóxico e erros de replicação. O gene de reparo de pareamento errôneo *MLH1* possui um papel no reparo de erros de pareamento de bases do DNA na nova fita de DNA recém replicada (Jascur e Boland, 2006). Defeitos nesta via causam instabilidade de microsatélite, especialmente observados em câncer coloretal. Em tumores esporádicos, a principal causa de instabilidade de microsatélite ocorre devido ao defeito da via de reparo do pareamento errôneo do DNA e a inativação epigenética do gene *MLH1* pelo silenciamento do promotor e são encontrados em tumores coloretais, do endométrio e estômago (Boukerche *et al.*, 2007; Jacinto *et al.*, 2007). Interessantemente, os agentes desmetilantes são capazes de restaurar a atividade de reparo do pareamento errôneo do DNA em consequência da reativação do gene *MLH1*. A hipermetilação do promotor do gene *MLH1* parece ser uma alteração inicial em câncer coloretal. Além disso, o grau de metilação parece afetar a frequência de instabilidade do microsatélite (Fleisher *et al.*, 2000). O passo final da progressão maligna é marcado por instabilidade do microsatélite adicional

ativada pela inicial inativação epigenética do gene *MLH1* levando a mutações inativantes de múltiplos genes alvos, como os genes codificadores do APC e fator de crescimento transformante  $\beta$ RII (Parsons *et al.*, 1995; Malkhosyan *et al.*, 1996).

O gene *MGMT* é outro gene de reparo do DNA que ilustra perfeitamente a influência de eventos epigenéticos e genéticos anormais em câncer. A proteína MGMT desempenha um papel na remoção de adutos mutagênicos e citotóxicos da O<sup>6</sup>-metilguanina no DNA. Isto é feito pela transferência de um grupo metil da O<sup>6</sup>-metilguanina para uma cisteína ativa dentro da sua própria seqüência em uma reação que inativa uma molécula MGMT para cada lesão reparada. Se o DNA não é reparado, a O<sup>6</sup>-metilguanina pode induzir a mutação transicional G:C para A:T. O silenciamento transcricional do *MGMT* pela hipermetilação do promotor causa a transição de G para A no gene *K-ras* e do gene *p53* (Jacinto *et al.*, 2007). O silenciamento epigenético do *MGMT* é responsável por 72% dos eventos mutacionais no gene *p53* e por 40% dos casos de carcinomas coloretais devido à indução de mutações no gene *K-ras*. O silenciamento do *MGMT* também tem sido reportado em câncer de cólon e vesícula (Barbacid, 1987; Whitehall *et al.*, 2001; Kohya *et al.*, 2003).

Os genes *GSTP1* e *BRCA1* são outros dois genes que podem estar ligados ao aumento de lesões do DNA devido ao silenciamento epigenético pela hipermetilação do DNA. O promotor do *GSTP1* é encontrado hipermetilado principalmente em tumores de mama e renal e sua inativação epigenética resulta no acúmulo de produtos intermediários do metabolismo de estrogênios (Cavaliere

*et al.*, 1997; Jacinto *et al.*, 2007). A hipermetilação do promotor do *BRCA1* também parece estar envolvido no desenvolvimento de câncer primários de mama e ovário, devendo-se ao fato de que células faltando a proteína BRCA1 podem reparar as lesões do DNA pelos mecanismos alternativos com tendência a erros, levando a mutação do gene e instabilidade do cromossomo. Embora estes genes são estudados de uma maneira menos extensa no contexto de silenciamento epigenético, há uma ligação óbvia entre a hipermetilação dos promotores e o câncer (Jacinto *et al.*, 2007).

### ***VI.3.3. Possíveis mecanismos para hipermetilação de ilhas CpGs no promotor em células tumorais***

Uma das questões fundamentais para serem respondidas em epigenética do câncer se refere aos determinantes da hipermetilação de genes supressores de tumor e os mecanismos que definem a existência de perfis específicos de hipermetilação de ilhas CpGs no promotor de genes em células tumorais (Paz *et al.*, 2003; Jacinto *et al.*, 2007). Duas hipóteses possíveis foram propostas: (a) a hipermetilação da ilha CpG ocorre de maneira aleatória e a inativação epigenética de certos genes confere uma vantagem seletiva em um tipo particular de tumor e (b) um grupo de fatores nucleares marcam especificamente para diferentes subgrupos de genes em uma maneira específica ao tipo de tumor.

Evidentemente, ambas as hipóteses são compatíveis com a observação da especificidade dos perfis das alterações epigenéticas, que parece ser o resultado da seleção de clones com vantagens claras na proliferação e dispersão. Vários

mecanismos que previnem as ilhas CpGs da metilação não são hábeis para manter este processo em células cancerosas. Entretanto, não foi encontrada nenhuma evidência experimental que corrobora com esta hipótese. Alternativamente, pesquisas intensas estão sendo feitas com o objetivo de identificar os mecanismos que determinam a marcação da metilação do DNA. Para isso, é importante distinguir entre genes que se tornam naturalmente metilados em células normais e aqueles que são aberrantemente metilados em células cancerosas, assim como os mecanismos que aplicam a células normais estão provavelmente disruptos em células cancerosas.

A primeira evidência de mecanismos de marcação para metilação do DNA vem de estudos de células de plantas, que identificaram a existência de mecanismos baseados em RNA (Wassenegger *et al.*, 1994). Uma hipótese é através de metilação do DNA direcionada por RNA, que pode envolver um RNA sintetizado no núcleo ou no citoplasma. Uma segunda hipótese possível que ainda precisa ser confirmada experimentalmente é a transcrição de RNAs alterados a partir de um molde de DNA metilado. Estes RNAs alterados ativariam o transporte do RNA para o citoplasma e a metilação de cópias de DNA homólogos não ligados. A habilidade dos RNAs produzidos no citoplasma em responderem e induzirem mudanças epigenéticas de uma maneira seqüência-específica foi mostrada em plantas, onde os transgenes nucleares tornam-se metilados por um vírus de RNA construído com seqüências transgênicas (Jones *et al.*, 1998). Os RNAs dupla-fitas poderiam ser os reais indutores da metilação do DNA que tem sido sugerida pela habilidade de viróides, um patógeno da planta consistindo

unicamente de uma duplex de RNA não codificante, que ativa a metilação de DNA homólogos nucleares (Wassenegger *et al.*, 1994). Durante os últimos anos, muitas observações importantes sobre os mecanismos que guiam a metilação do DNA em plantas através da atividade de pequenos RNAs têm sido relatados em estudos (Chan *et al.*, 2005).

Em contraste, o potencial papel do RNA no direcionamento da metilação em mamíferos ainda é pouco compreendido, embora existam algumas evidências que moléculas de RNA antisense possam marcar a metilação de elementos regulatórios (Tufarelli *et al.*, 2003). Em um modelo transgênico de  $\alpha$ -talassemia e em células troncos embrionárias em diferenciação, a transcrição de RNA antisense media o silenciamento e a metilação da ilha CpG do promotor do gene  $\alpha$ -globina. Outros estudos indicam que a metilação mediada por RNA poderia ser um mecanismo na marcação da metilação do DNA em mamíferos; entretanto, a maioria destas vias precisa ser determinada.

Também foi proposto que os fatores de transcrição poderiam marcar para metilação. Um exemplo é fornecido pelo fator de transcrição Myc, um mediador essencial de crescimento celular e proliferação através de sua habilidade de regular a transcrição positivamente ou negativamente. Recentemente foi mostrado que o Myc se liga ao corepressor DNMT3a e associa com a atividade *in vivo* de DNA metiltransferase (Brenner *et al.*, 2005). Estes autores observaram que estas células com níveis reduzidos de DNMT3a exibem reativação específica do gene repressor do Myc, *p21Cip1*, enquanto as expressões dos genes *E-box* ativados por Myc estão inalterados. Em adição, a ligação seletiva do Myc e

marcação do DNMT3a para o promotor do *p21Cip1* foi observada. O Myc é conhecido por ser recrutado para o promotor do *p21Cip1* pelo fator Miz-1 ligante ao DNA. Consistente com isso, Brenner e col. observaram que o Myc e DNMT3a formam um complexo ternário com Miz-1 e que este complexo pode coreprimir o promotor do *p21Cip1* em uma maneira dependente da metilação do DNA. Estes achados estavam entre as primeiras sugestões que a marcação das DNA metiltransferases pelos fatores de transcrição poderia ser um mecanismo amplo e geral para a geração de padrões específicos de metilação de DNA dentro de uma célula.

Dados recentes implicam que proteínas do grupo Polycomb (PcG) na marcação de inativação epigenética (Figura 5). As proteínas PcG são uma classe de reguladores epigenéticos que funcionam como repressores transcricionais. Esta família de proteínas tem um papel chave no desenvolvimento. Especificamente, células troncos dependem das proteínas PcG para reprimir, de uma maneira reversível, genes codificadores de fatores de transcrição necessários para a diferenciação. Recentemente, Vire e col. (Vire *et al.*, 2006) mostraram que a proteína PcG EZH2 interage, dentro de um contexto de complexos repressivos Polycomb 2 e 3 (PRC2/3), com as DNMTs e se associam com a atividade *in vivo* da DNMT. A EZH2 é necessária para a metilação do DNA dos promotores alvos de EZH2. Várias evidências indicam que genes alvos de PcG nas células troncos têm uma maior probabilidade de ter hipermetilação do DNA no promotor específico pra câncer do que os genes que não são alvos. Este recrutamento de DNMTs dependente de PcGs e subsequente metilação *de novo* ocorre somente em

células cancerosas em oposição às células normais. Estes dados são relevantes não somente por que eles lançam alguma luz sobre os genes que são alvos potenciais para metilação aberrante mas também porque eles suportam a origem do câncer por meio de células tronco (Widschwendter *et al.*, 2007).

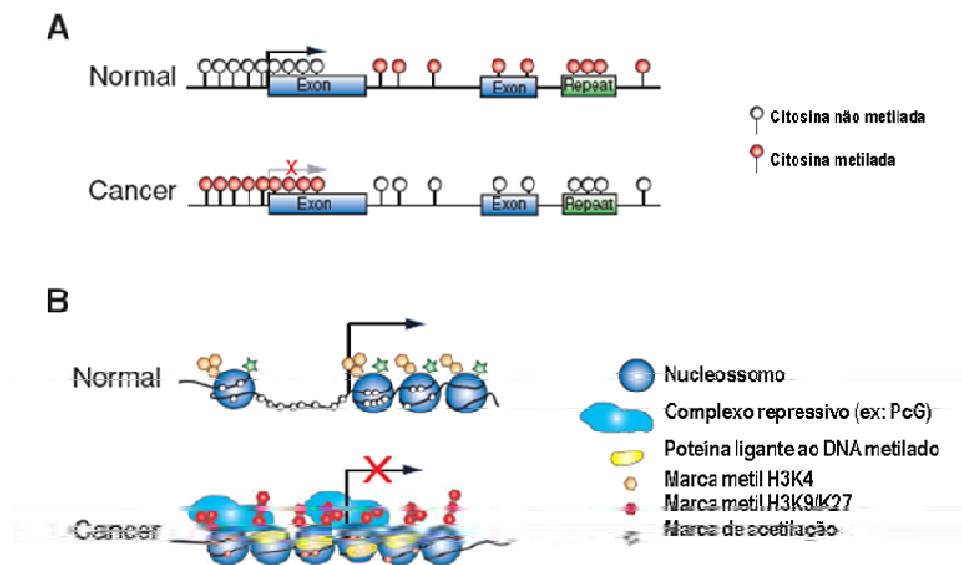


Figura 5 – Padrões epigenéticos em células normal e cancerosa (A) metilação do DNA em células normais, quase todos os dinucleotídeos CpGs estão metilados enquanto as ilhas CpGs que residem principalmente nas regiões regulatórias 5' dos genes não estão metiladas. Nas células cancerosas, muitas ilhas CpGs se tornam hipermetiladas em conjunção com o silenciamento dos seus genes relacionados., enquanto que ocorre a hipometilação global principalmente dos elementos repetitivos. (B) Modificação de histonas e de cromatina. Os genes ativos estão associados com a acetilação das caudas das histonas. Metilação da lisina 4 na histona 3 (H3K4), e a depleção dos nucleossomos nos seus promotores. Os promotores de genes silenciados (mostrados na figura acima em conjunção com a hipermetilação do DNA) se tornam associados com nucleossomos, perdem

as marcas de acetilação e metilação H3K4 e ganham marcas de metilação repressivas com na lisina 9 na histona 3, que recruta complexos repressores. As proteínas ligantes ao DNA metilado ligam o DNA metilado com as maquinarias de modificação de histonas e remodelante de nucleossomo (Modificado de Gal-Yam et al., 2008).

Outras linhas de evidências sugerem que pelo menos em certos contextos, os mecanismos alvo-dirigidos colaboram para as alterações epigenéticas. A leucemia aguda, por exemplo, tem sido uma fonte rica de informação sobre a interrupção marcada de modificações de histonas em câncer. As leucemias são bem caracterizadas para translocações cromossômicas aleatórias interrompendo genes que se localizam na região de ponto de quebra de translocação. Os genes que se localizam nestas regiões de pontos de quebra são freqüentemente reguladores importantes da diferenciação celular hematopoiética, apoptose ou proliferação. Muitas das translocações cromossômicas associadas com leucemia aguda interrompe genes que codificam fatores modificantes de histonas ou expressam fatores de transcrição que recrutam enzimas modificantes de histonas.

Embora muitas destas enzimas mostrem uma especificidade extraordinária, enzimas modificantes de histonas também podem modificar proteínas não histônicas, incluindo outros fatores de transcrição, tornando difícil descrever exatamente a ação das enzimas modificantes de histonas na leucemiogênese. Um exemplo típico é o gene leucemia de linhagem mista (MLL), uma metiltransferase específica pra a histona H3K4 que é um regulador positivo

da expressão de Hox. Os rearranjos em MLL e amplificação são comuns em leucemias mielóides e linfóides agudas e desordens mielodisplásicas e estão associadas com regulação positiva anormal da expressão do gene Hox (Hess, 2004). Em qualquer grau, estas translocações cromossômicas indicam como as alterações da função das enzimas que controlam a estrutura da cromatina podem causar alterações do padrão de histona e estrutura da cromatina para alterar a expressão gênica em um locus específico, eventualmente causando transformação celular. É provável que ambos a desregulação de processos fisiológicos que direcionam as DNA metiltransferases para seus alvos normais e o direcionamento das enzimas modificantes de histonas para alvos errados através de rearranjos cromossômicos ocorram nas células cancerosas.

### ***V. Agentes desmetilantes e câncer de cabeça e pescoço***

As modificações epigenéticas são alvos atrativos para intervenções terapêuticas em consequência de sua reversibilidade. Em contraste a mutações genéticas, que são herdadas passivamente através da replicação do DNA, as modificações epigenéticas devem ser ativamente mantidas. Conseqüentemente, as inibições farmacológicas de certas modificações epigenéticas poderiam corrigir padrões defeituosos de modificações e então mudar diretamente os padrões de expressão gênica e as características celulares correspondentes.

O progresso no desenvolvimento de inibidores difere amplamente entre as famílias de enzimas. O desenvolvimento de inibidores de metiltransferase de histonas está ainda em um estágio pré clínico inicial. Vários inibidores de

desacetilase de histona estão sendo testados atualmente em testes clínicos de fase I e fase II. Entretanto, muitas outras proteínas são acetiladas, incluindo reguladores-chaves do crescimento celular do tumor, e então não é claro se a inibição do crescimento induzida pelos inibidores de desacetilase de histona é o resultado de alterações nos padrões de acetilação de histona ou de alterações nas vias de sinalização que regulam a proliferação celular. Os inibidores de DNA metiltransferase estão em um estágio de desenvolvimento clínico mais avançado que os inibidores de desacetilase de histona ou de metiltransferase de histona, sendo extensivamente testados clinicamente nas fases I-III. Em adição, o protótipo do inibidor de metiltransferase 5-azacitidina (ex:Vidaza) foi recentemente aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como um agente antitumorigênico para o tratamento de síndrome mielodisplásica (Lyko e Brown, 2005).

Os inibidores de DNA metiltransferases representam uma nova promessa para terapias epigenéticas contra o câncer (Egger *et al.*, 2004). Devido a sua longa disponibilidade, a maioria das atenções tem sido focada nos análogos de citosina azanucleosídeos 5-azacitidina (azacitidina) e 2'-deoxi-5-azacitidina (decitabina). Estas duas drogas têm sido utilizadas em vários testes clínicos e tem provado serem eficientes contra uma variedade de desordens hematológicas, especialmente quando administradas em concentrações baixas (Issa *et al.*, 2004; Issa *et al.*, 2005). Mais recentemente, outros componentes têm sido descritos como inibidores de DNA metiltransferases, mas suas eficiências não têm sido caracterizadas ainda de uma maneira sistemática. Em adição, a quantidade

limitada de dados disponíveis tem dificultado a compreensão de características particulares destas drogas.

Os inibidores de DNA metiltransferases são divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui as drogas inibidoras de nucleosídeo DNA metiltransferase e são representadas pelos azanucleosídeos 5-azacitidina (azacitidina) e 2'-deoxi-5-azacitidina (decitabina) e zubarina. O segundo grupo inclui os inibidores não nucleosídeos de DNA metiltransferase e são representados por (-)-epigallocatequina-3-gallato (EGCG) e RG108, sendo que este grupo ainda possui três classes adicionais de compostos que não estão bem caracterizados ainda.

Alguns compostos não nucleosídeos podem também inibir a atividade da DNA metiltransferase. Estas substâncias bloqueiam diretamente a atividade da DNA metiltransferase e portanto não parecem ter uma toxicidade inerente causada pelo bloqueio da enzima. Um inibidor não nucleosídeo de DNA metiltransferase é a (-)-epigallocatequina-3-gallato (EGCG), o principal composto polifenol do chá verde. O EGCG afeta várias vias biológicas (Moyers e Kumar, 2004) e inibe a atividade da DNA metiltransferase em extratos de proteína e em linhagens celulares humanas (Fang *et al.*, 2003). Após a análise da estrutura química da EGCG, Fang e col. (Fang *et al.*, 2003) propuseram que a EGCG se liga e bloqueia o sítio ativo da DNA metiltransferase 1 humana. Entretanto, a degradação de EGCG gera uma quantidade substancial do agente oxidante peróxido de hidrogênio (Nakagawa *et al.*, 2004) e a oxidação de DNA metiltransferases e outras proteínas poderiam contribuir para a inibição da metilação do DNA pelo EGCG *in vitro* e para sua citotoxicidade em linhagens celulares humana. A

oxidação de DNA metiltransferases pode também estar envolvida no mecanismo de ação dos compostos de organoselênio, como o benzil selenocianato (Fiala *et al.*, 1998). Entretanto, nenhum composto de organoselênio mostrou-se inibir a metilação do DNA sobre condições *in vivo*.

Outro composto não nucleosídeo inibidor da atividade da DNA metiltransferase, identificado por meio um ensaio de rastreamento *in silico*, é o RG108, uma molécula de tamanho pequeno, que é inibidora de DNA metiltransferase (Siedlecki *et al.*, 2003; Brueckner *et al.*, 2005). O RG108 parece bloquear o sítio ativo da DNA metiltransferase, como indicado pelos dados de modelamento e sua habilidade de inibir a atividade catalítica de DNA metiltransferase purificada recombinante. O mecanismo inibitório do RG108 parece também ser direto e específico para DNA metiltransferases, no qual a RG108 tem comparativamente baixa toxicidade em linhagens celulares. Então, a RG108 é um candidato atrativo para análises futuras para o desenvolvimento de novas drogas (Brueckner *et al.*, 2005).

Ha mais de 40 anos atrás, os azanucleosídeos 5-azacitidina (azacitidina) e 2'-deoxi-5-azacitidina (decitabina) foram desenvolvidos como agentes citostáticos clássicos (Sorm *et al.*, 1964). Vários anos mais tarde observaram-se que estes compostos inibiam a metilação do DNA em linhagens celulares humanas, que forneceu uma explicação mecânica para as suas atividades moduladoras de diferenciação (Jones e Taylor, 1980). Em adição, esta observação também iniciou o desenvolvimento de azanucleosídeos como drogas epigenéticas. Após um refinamento substancial em suas dosagens clínicas, ambas a azacitidina e a

decitabina tem mostrado benefícios clínicos significantes no tratamento da síndrome mielodisplásica (MDS), uma disordem pré leucêmica da medula (Silverman *et al.*, 2002; Kantarjian *et al.*, 2006). Como consequência, estas drogas receberam a aprovação do FDA para o tratamento de MDS. Há fortes tentativas para identificar e desenvolver novos inibidores de DNA metiltransferases. Entretanto, os atuais compostos disponíveis parecem ter um potencial mais fraco de reativação de genes quando comparados com os azanucleosídeos (Chuang *et al.*, 2005; Stresemann *et al.*, 2006) e nenhuma das drogas candidatas tem atingido um estágio avançado de testes clínicos para indicação epigenética ainda. Isto tem estabelecido a azacitidina e a decitabina como drogas arquetípicas para terapias epigenéticas de câncer (Egger *et al.*, 2004).

Os inibidores de metilação do DNA rapidamente reativam a expressão de genes que tinham sofrido silenciamento epigenético, particularmente se este silenciamento ocorreu em uma situação patológica. Os inibidores protótipos 5-azacitidina (5-aza-CR) e 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-Cdr), foram desenvolvidos inicialmente como agentes citotóxicos (Sorm *et al.*, 1964), mas subsequentemente descobriu-se que eles são inibidores potentes de metilação do DNA e induz expressão gênica e diferenciação em culturas celulares são convertidos em deoxinucleotídeos trifosfatos e são então incorporados no lugar da citosina no DNA replicante (Constantinides *et al.*, 1977). Eles são então ativos somente em células em fase S, onde eles servem como potentes inibidores da metilação do DNA (Jones e Taylor, 1980).

Após os azanucleosídeos terem sido metabolizados em 5-aza-2'-deoxicidina trifosfato, eles podem se transformar em substratos para a maquinaria de replicação do DNA e serão incorporados ao DNA, onde a azacitosina pode substituir a citosina. Os dinucleotídeos azacitosina-guanina são reconhecidos pelas DNA metiltransferases como um substrato natural e as enzimas iniciarão a reação de metilação pelo ataque nucleofílico. Isto resulta no estabelecimento de uma ponte covalente entre o átomo de carbono 6 do anel da citosina e a enzima. A ponte é normalmente quebrada por beta-eliminação através do átomo do carbono 5, mas a reação é bloqueada com azacitosina, onde o carbono 5 é substituído por nitrogênio. Então, a enzima permanece covalentemente ligada ao DNA e a sua função de DNA metiltransferase é bloqueada. Em adição, a adição da proteína covalente também compromete a funcionalidade do DNA e ativa a sinalização de dano no DNA, resultando na degradação das DNA metiltransferases bloqueadas. Assim, como consequência, as marcas da metilação são perdidas durante a replicação do DNA (Stresemann e Lyko, 2008).

O 5-azacitidina (5-aza-CR) é uma ferramenta molecular para a indução da desmetilação do DNA em sistemas de modelos celulares. Entretanto, também é conhecido que altas doses desta droga pode induzir um alto nível de toxicidade nos pacientes. Quando as dosagens são adaptadas para otimizar os efeitos epigenéticos torna-se altamente importante fornecer provas dos dados do mecanismo, isto é, demonstrar a desmetilação do DNA nos pacientes. A decitabina pode ser mais específica e menos tóxica que a 5-azacitidina e, de fato,

esta droga mostra uma grande inibição da metilação e atividade antitumoral em modelos experimentais (Mompalmer *et al.*, 1984). Entretanto, a decitabina também tem efeitos tóxicos substanciais, em particular a mielosupressão com febre neutropênica (Issa *et al.*, 2005), que pode ser ligada a formação de adutos covalentes entre o DNA e as proteínas metiltransferases bloqueadas.

*In vivo*, vários fatores adicionais limitam a estabilidade e a biodisponibilização dos azanucleosídeos. Refinamentos nas dosagens e na administração têm melhorado a performance clínica destas drogas. Por exemplo, mostrou-se que a administração subcutânea de azacitidina resulta em um aumento de 2 vezes na meia-vida beta (eliminação da substância) quando comparado com a administração intravenosa (Marcucci *et al.*, 2005).

Os picos de concentrações no plasma observado em pacientes são comparáveis as concentrações que estão sendo usadas para atingir a desmetilação do DNA *in vitro* (Stresemann *et al.*, 2006). Entretanto, a meia vida para eliminação da substância em pacientes é substancialmente menor que a incubação da droga usada para experimentos *in vitro* (frequentemente 48 ou 72 horas). Streseman *et al.* (2008) realizaram uma série de experimentos com a linhagem celular de cólon HCT116 e mostraram que o máximo de desmetilação foi observado após 48 horas, que confirmou que a exposição prolongada a drogas causa uma resposta mais pronunciada de desmetilação (Bender *et al.*, 1999; Stresemann e Lyko, 2008).

Por causa da associação entre o tempo de exposição à droga e a desmetilação do DNA, vários estudos clínicos têm tentado maximizar as respostas

de desmetilação em pacientes pela infusão contínua de azanucleosídeos por vários dias. As análises do nível de metilação do DNA mostraram que a administração contínua de decitabina causou uma desmetilação pronunciada, mas o delineamento do estudo não permitiu as análises de correlações entre a desmetilação e as respostas clínicas.

Uma preocupação em consequência da desmetilação contínua do DNA é o aumento de indução de eventos transcricionais ilegítimos. Modelos de camundongos com níveis de metilação do DNA fortemente reduzidos e permanentes mostraram amplificação genética e ativação insercional de loci oncogênico (Gaudet *et al.*, 2003; Howard *et al.*, 2008). Estes eventos estão provavelmente ligados a reativação epigenética de elementos de DNA móveis e precisa ser monitorado e minimizado durante a terapia de desmetilação. Neste contexto, é interessante notar que planejamentos de administração de decitabina com doses relativamente altas têm mostrado uma melhor resposta que planejamentos que continuamente mantêm níveis baixos de drogas no plasma (Kantarjian *et al.*, 2007). Então, os efeitos posteriores da desmetilação poderiam também ser importantes para a atividade clínica da droga e planejamentos clínicos otimizados provavelmente causarão um equilíbrio entre a desmetilação do DNA e a indução de apoptose.

A base racional por trás das terapias de desmetilação é a habilidade dos inibidores de DNA metiltransferase de reverterem os genes silenciados por consequência da metilação do promotor. O silenciamento por metilação de genes supressores de tumor e de outros genes relacionados ao câncer tem um papel

fundamental na tumorigênese humana. As reversões destas alterações epigenéticas podem então restabelecer o controle da proliferação e da sensibilidade a apoptose. A identificação destes eventos em pacientes que passaram pela terapia de desmetilação tem sido notadamente difícil. A maioria dos estudos neste contexto tem focado no gene supressor de tumor *p15*, que pode estar hipermetilado em pacientes com MDS e AML e podem ser desmetilados e reativados em pacientes que passaram por terapia com decitabina. Observações semelhantes também foram feitas em outros estudos clínicos com azacitidina, mas uma conexão entre a desmetilação e a reativação do *p15* e respostas clínicas não puderam ser confirmadas.

Tsunoda et al. analisaram o perfil de metilação em 19 genes selecionados após tratamento com o agente desmetilante 5-azacitidina em linhagens celulares de cabeça e pescoço e observaram que 6 genes tiveram um aumento de expressão em linhagens celulares tratadas com o agente desmetilante e estes genes também mostraram uma maior frequência de metilação nos tumores que nas margens proximais de ressecção. Eles observaram uma diferença significativa na frequência de metilação e na extensão da metilação entre o tumor e as margens para os genes *CLDN6*, *FBN2*, *TFPI2* e *TMEFF2* (Tsunoda et al., 2009).

Kong e col. analisaram se a hipermetilação na região promotora do gene *DAPK* ocorre também em tumores de laringe como já foi observado em tumores de outros sítios anatômicos. Eles trataram linhagem celular Hep-2 e xenotransplante de Hep-2 com o agente desmetilante 5-azacitidina-2'-deoxicidina e não observaram uma expressão do mRNA deste gene antes do

tratamento, além da hipermetilação do gene *DAPK*. Entretanto houve expressão do mRNA deste gene após o tratamento. Eles observam uma restauração na expressão do mRNA do gene *DAPK* na linhagem celular Hep-2 e nos xenotransplantes após o tratamento. Além disso, eles observaram que 67,2% das amostras de tumor de laringe analisadas apresentaram hipermetilação do promotor de *DAPK* e notaram também que nenhuma amostra normal analisada apresentou hipermetilação deste gene (Kong *et al.*, 2005).

Cui e col. analisaram o perfil de metilação do gene *NGALR* em linhagens celulares de carcinoma de esôfago e observaram metilação na região promotora deste gene em três linhagens celulares que também não apresentavam expressão do mRNA deste gene. Em contrapartida eles também observaram que outras três linhagens não apresentavam metilação deste gene e apresentavam expressão do mRNA deste gene. Após o tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina, as três linhagens recuperaram a expressão do mRNA deste gene. Além disso, eles observaram que 40,3% dos tumores primários de esôfago e 50,7% dos tecidos normais adjacentes aos tumores apresentaram hipermetilação deste gene, concluindo que neste caso, a hipometilação deste gene e conseqüente ativação transcricional têm um importante papel no desenvolvimento deste tipo de tumor (Liu *et al.*, 2005).

Bennett e col. selecionaram os genes *SEPT9*, *SLC5A8*, *FUSSEL18*, *EBF3* e *IRX1* por meio de um rastreamento genômico usando RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning). Eles observaram uma freqüência de hipermetilação nas regiões promotoras dos genes entre 27 a 67% nas amostras de

tumores de cabeça e pescoço analisadas. Bennett e col. também observaram que o tratamento com o agente 5-aza-2'-deoxicitidina foi capaz de restabelecer a expressão de todos os genes em pelo menos duas das cinco linhagens celulares tratadas (Bennett *et al.*, 2008).

A identificação de genes hipermetilados que sofreram desmetilação e reativação pelo tratamento de droga e o estabelecimento de associações estatisticamente robustas entre eventos de reativação epigenética e repostas de pacientes serão uma área importante para pesquisas futuras.

## ***VI. Hipermetilação em câncer de cabeça e pescoço***

O câncer de cabeça e pescoço é uma doença complexa que é caracterizada por heterogeneidade clínica, patológica, fenotípica e biológica. A evolução e a progressão deste câncer é o resultado de múltiplas alterações das vias celulares e moleculares do epitélio escamoso. As evidências sugerem um modelo de progressão molecular de lesões pré-malignas a doença invasiva. 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 se caracterizam por um processo herdado durante a divisão celular, sem a ocorrência de alterações na seqüência do DNA (Jacinto *et al.*, 2007). 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 à metilação. Atualmente,

sabe-se que os fatores epigenéticos são igualmente importantes nesse processo de muitos passos (Jones e Baylin, 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; Ogi *et al.*, 2002). A presença da metilação na região dos promotores gênicos tem sido considerada como um potencial marcador para os cânceres em geral, principalmente para os cânceres esporádicos, podendo ser considerada um marcador para vários tumores.

A alteração do padrão de metilação da região promotora de gene é um evento epigenético associado com as fases iniciais da carcinogênese. Sua frequência em tumores de cabeça e pescoço tem sido reportada entre uma faixa de 21% a 47%. A hipermetilação do gene supressor de tumor pode ser usada para a detecção de uma quantidade mínima de DNA específico de tumor em um microambiente de DNA normal de tecidos não tumorais. Sinha e col. observaram, por meio de MSP-PCR, uma frequência de 86,5% de hipermetilação da região promotora do gene *p16* em indivíduos com carcinoma de células escamosas de língua e 43,3% dos pacientes com margens negativas histologicamente para o câncer apresentaram pelo menos 1 margem positiva para hipermetilação do gene *p16* (Sinha *et al.*, 2009). Rosas e col. observaram uma frequência de hipermetilação do gene *p16* em 47% dos tumores e a hipermetilação foi observada em todos os estadiamentos. Já para o gene *DAPK*, a incidência foi de 33% e para o gene *MGMT* a incidência de hipermetilação foi observada em 23% das amostras

analisadas. Neste estudo também foi observado que 65% dos pacientes que apresentaram hipermetilação no DNA do tumor também apresentaram metilação anormal no DNA da saliva, detectando uma frequência de hipermetilação de 79%, 60% e 50% para os genes *p16*, *DAPK* e *MGMT* respectivamente (Rosas *et al.*, 2001).

Tan e col. realizaram um estudo para determinar se a presença de genes hipermetilados em margens cirúrgicas poderia prever recorrências locais para câncer de cabeça e pescoço. Por meio de MSP-PCR quantitativa foi observado que 64.3% das amostras estavam hipermetiladas para os genes *CDKN2A*, *CCNA1* e *DDC* e este grupo de indivíduos foram associados com uma sobrevida livre de doença mais longa e um tempo mais longo para mortes em consequência da doença. A análise por meio de QMSP de 24 margens revelaram que 11 pacientes que possuíam margens molecularmente positiva e dos quais cinco desenvolveram eventos específicos da doença (três recorrências locais e duas metástases) (Dharel *et al.*, 2008).

De Schutter e col. investigaram a incidência e valor de prognóstico da hipermetilação da região promotora dos genes *TIMP3*, *CDH1*, *DAPK*, *RASSF1A*, *p16INK4A* e *MGMT* em pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço tratados somente com radioterapia. As frequências de hipermetilação dos genes *TIMP3*, *CDH1*, *DAPK*, *RASSF1A*, *p16INK4A* e *MGMT* nas amostras analisadas foram de 40.5%, 13.2%, 11.4%, 2.4%, 4.8%, 42.5% respectivamente. A hipermetilação da região promotora dos genes *TIMP3* e *CDH1* foi significativamente relacionada com melhor controle locoregional, sobrevida geral,

sobrevida livre de doença e sobrevida específica da doença. Então, para os pacientes analisados o silenciamento destes dois genes prediz um melhor resultado (De Schutter *et al.*, 2009).

Misawa e col. observaram por meio de MSP-PCR a hipermetilação na região promotora do gene *GALR1* em 52.7% das linhagens celulares analisadas e em 38% das amostras de tumores de cabeça e pescoço analisadas. Além disso, a hipermetilação deste gene foi correlacionada com a diminuição da expressão do gene, estadiamento de tumor, sobrevivência, metilação do *p16*, expressão da *ciclina D1* e status do linfonodo. Também foi observada uma supressão do crescimento da linhagem celular após a reexpressão do gene, sugerindo que este gene pode ser um gene supressor de tumor em tumores de cabeça e pescoço (Misawa *et al.*, 2008). Chen e col. analisaram o perfil de metilação da região promotora de 22 genes por meio de MS-MLPA e observaram que os genes *RARB*, *APC* e *CHFR* apresentaram as maiores frequências de hipermetilação nas 28 amostras de tumores de cabeça e pescoço analisadas, sendo que a hipermetilação da região promotora do gene *CHFR* somente foi observada em amostras com estadiamento IV (Jinno *et al.*, 2002). Calmon e col. analisaram o perfil de metilação dos genes *p14*, *p16*, *CDH1*, *DAPK1* e *ADAM23* e observaram que 100% das amostras de tumores de cabeça e pescoço analisados apresentavam hipermetilação da região promotora de pelo menos um gene. Além disso também foi observada uma associação significativa entre a hipermetilação do gene *DAPK1* e a ocorrência de metástases linfonodais em tumores na orofaringe e na laringe foi

observada uma associação significativa entre a hipermetilação do gene ADAM23 e tumores de estadiamento avançado (Calmon *et al.*, 2007).

Há um crescente interesse na habilidade de detectar pequenas quantidades de material derivado do tumor com o intuito de uma detecção precoce ou monitoramento um resíduo mínimo da doença após o tratamento. Geralmente a identificação de biomarcadores é inteferida pela presença de tecido normal contaminante, que, por exemplo, complica o uso de microscopia de luz, imunistoquímica e muitos métodos de detecção baseados em PCR. Entretanto, a presença de alelos metilados de genes associados ao câncer fornece uma excelente possibilidade para o monitoramento de doença. Os tumores sólidos liberam células malignas circulantes e DNA de células necróticas ou apoptóticas na corrente sanguínea e nos fluidos corpóreos. Em casos onde os tumores possuem marcadores de metilação conhecidos, o DNA isolado do fluido corpóreo correspondente pode ser utilizado para o monitoramento da doença durante e após o tratamento. Os métodos de detecção deveriam possuir a habilidade de distinguir pequenas quantidades de DNA metilado (alta sensibilidade) e discriminar claramente entre o DNA metilado e não metilado (alta especificidade). Obviamente, os genes que possuem uma alta frequência de metilação em certos tumores são os marcadores mais apropriados. No caso do câncer de cabeça e pescoço, os exemplos de genes marcadores de metilação são *LHX6*, *RASSF1A*, *DAPK* e *RARβ2* que apresentaram uma frequência de metilação de >60%, >80%, >70% e >70% respectivamente; e os exemplos de marcadores de prognóstico para o câncer de cabeça e pescoço são *RPRM*, *MGMT* e *MINT31*. Além disso,

pequenas quantidades de alelos metilados tem sido detectados em lesões pré cancerosas e a metilação de certos promotores é característico destes tecidos e pode ajudar na identificação de tumores em estágio inicial. Por exemplo, a metilação do gene *p16* tem sido documentado no esôfago de Barret e vários supressores de tumor têm-se mostrados hipermetilados nos pulmões de fumantes crônicos. Portanto, a descoberta de pequenas quantidades de alelos de supressores de tumor metilados pode ser indicativo de lesões pré malignas ou malignas e deveriam ser utilizados como procedimentos complementares para um diagnóstico sistemático (Gronbaek *et al.*, 2007). Até o momento, não há nenhum kit disponível de teste molecular baseado em metilação do DNA para diagnóstico que esteja aprovado pela FDA (Mulero-Navarro e Esteller, 2008).

A metilação do DNA tem provado ser um marcador valioso para estratégias de detecção de câncer e no prognóstico da doença. Ainda, muitas das oportunidades fornecidas pela metilação do DNA para detecção precoce e monitoramento cuidadoso da doença ainda não foi transformado em uma prática clínica. A lista crescente de marcadores de metilação facilmente aplicáveis pode encorajar os médicos clínicos a desenvolverem um rastreamento de câncer baseado em metilação e programas de monitoramento da doença como parte de testes clínicos futuros (Gronbaek *et al.*, 2007).

## ***OBJETIVOS***

---

Os objetivos gerais do presente trabalho foram identificar biomarcadores candidatos para diagnóstico e prognóstico dos tumores em cabeça e pescoço, validar e investigar o perfil de metilação de ilhas CpG neste tipo de tumor e analisar a associação da expressão da proteína dos genes candidatos com os parâmetros clínico-patológicos.

Seus objetivos específicos foram:

1. Analisar a expressão dos marcadores candidatos selecionados por meio das técnicas de RaSH e *microarray* nas linhagens derivadas de câncer de cabeça e pescoço tratadas e não tratadas com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina por meio da técnica PCR em tempo real, que quantifica a expressão de genes alvo.
2. Analisar o padrão de metilação dos dinucleotídeos CpGs da região promotora dos genes validados por meio de Real Time nas linhagens derivadas de câncer de cabeça e pescoço.
3. Validar o padrão de metilação do DNA dos marcadores através da utilização da técnica MSP, que proporciona uma avaliação qualitativa do estado de metilação das regiões promotoras dos genes alvos nas amostras de câncer de cabeça e pescoço.
4. Analisar a expressão da proteína CRABP2 nos tecidos tumorais em diferentes estágios da doença e em suas respectivas margens, os marcadores moleculares selecionados por MSP e PCR em tempo real.

***Artigo original: Epigenetic silencing of  
CRABP2 and MX1 in head and neck  
tumors***

Artigo aceito no periodico Neoplasia (ISSN 1522-8002)

---

## Epigenetic Silencing of *CRABP2* and *MX1* in Head and Neck Tumors<sup>1,2</sup>

Marília F. Calmon<sup>\*,3</sup>, Rodrigo V. Rodrigues<sup>†,3</sup>,  
Carla M. Kaneto<sup>‡</sup>, Ricardo P. Moura<sup>§</sup>,  
Sabrina D. Silva<sup>¶</sup>, Louise Danielle C. Mota<sup>¶</sup>,  
Daniel G. Pinheiro<sup>¶</sup>, Cesar Torres<sup>¶</sup>,  
Alex F. de Carvalho<sup>¶</sup>, Patricia M. Cury<sup>¶</sup>,  
Fabio D. Nunes<sup>\*\*</sup>, Ines Nobuko Nishimoto<sup>¶</sup>,  
Fernando A. Soares<sup>¶</sup>, Adriana M.A. da Silva<sup>††</sup>,  
Luis P. Kowalski<sup>¶</sup>, Helena Brentani<sup>¶</sup>,  
Cleslei F. Zanelli<sup>††</sup>, Wilson A. Silva Jr.<sup>‡</sup>,  
Paula Rahal<sup>\*</sup>, Eloiza H. Tajara<sup>†,‡</sup>, Dirce M. Carraro<sup>¶</sup>,  
Anamaria A. Camargo<sup>¶</sup> and Sandro R. Valentini<sup>††</sup>

<sup>\*</sup>Department of Biology, IBILCE-UNESP, São José do Rio Preto-SP, 15091-450, Brazil; <sup>†</sup>Department of Molecular Biology, School of Medicine-FAMERP, São José do Rio Preto-SP, 15090-000, Brazil; <sup>‡</sup>Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences-USP, São Paulo-SP, 05508-000, Brazil; <sup>§</sup>Department of Genetics, School of Medicine-USP, Ribeirão Preto-SP, 14051-140, Brazil; <sup>¶</sup>Ludwig Institute for Cancer Research at Oswaldo Cruz Hospital, São Paulo-SP, 01323-903, Brazil; <sup>¶</sup>A.C. Camargo Cancer Hospital-Medical and Research Center, São Paulo-SP, 01509-000, Brazil; <sup>\*\*</sup>School of Dentistry-USP, São Paulo-SP, 05508-000, Brazil; <sup>††</sup>Heliópolis Hospital, São Paulo-SP, 04231-030, Brazil; <sup>††</sup>Department of Biological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences-UNESP, Araraquara-SP, 14801-902, Brazil

### Abstract

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a heterogeneous disease affecting the epithelium of the oral cavity, pharynx and larynx. Conditions of most patients are diagnosed at late stages of the disease, and no sensitive and specific predictors of aggressive behavior have been identified yet. Therefore, early detection and prognostic biomarkers are highly desirable for a more rational management of the disease. Hypermethylation of CpG islands is one of the most important epigenetic mechanisms that leads to gene silencing in tumors and has been extensively used for the identification of biomarkers. In this study, we combined rapid subtractive hybridization and microarray analysis in a hierarchical manner to select genes that are putatively reactivated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5Aza-dC) in HNSCC cell lines (FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A, UM-SCC-38A). This combined analysis identified 78 genes, 35 of which were reactivated in at least 2 cell lines and harbored a CpG island at their 5' region. Reactivation of 3 of these 35 genes (*CRABP2*, *MX1*, and *SLC15A3*) was confirmed by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR; fold change,  $\geq 3$ ). Bisulfite sequencing of their CpG islands

Abbreviations: 5Aza-dC, 5-aza-2'-deoxycytidine; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; MSP, methylation-specific polymerase chain reaction; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RaSH, rapid subtractive hybridization; TSS, transcription start site; TMA, tissue microarray

Address all correspondence to: Sandro R. Valentini, Faculdade de Ciências Farmacéuticas – UNESP, Rodovia Araraquara-Jaú, km 01, Araraquara, SP 14801-902, Brazil.

E-mail: valentini@fca.unesp.br

<sup>†</sup>This work was supported by grants from FAPESP and CNPq.

<sup>‡</sup>This article refers to supplementary materials, which are designated by Tables W1 to W4 and are available online at [www.neoplasia.com](http://www.neoplasia.com).

<sup>§</sup>These authors contributed equally.

Received 26 June 2009; Revised 5 August 2009; Accepted 7 August 2009

Copyright © 2009 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/09/\$25.00  
DOI: 10.1593/neo.91110

revealed that they are indeed differentially methylated in the HNSCC cell lines. Using methylation-specific PCR, we detected a higher frequency of *CRABP2* (58.1% for region 1) and *MX1* (46.3%) hypermethylation in primary HNSCC when compared with lymphocytes from healthy individuals. Finally, absence of the *CRABP2* protein was associated with decreased disease-free survival rates, supporting a potential use of *CRABP2* expression as a prognostic biomarker for HNSCC patients.

*Neoplasia* (2009) 11, 1329–1339

## Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) comprises a heterogeneous disease, which arises from the epithelium of the oral cavity, pharynx, and larynx [1], and is associated with tobacco and alcohol abuse [2]. According to worldwide cancer statistics, approximately 450,000 new oral and laryngeal carcinomas are diagnosed annually, and the incidence varies between countries, probably as a result of environmental risk factors [3]. For example, the incidence rates for oral cancer in males are high in France and comparatively low in the United States and Brazil [4–6].

Although detection of HNSCC in early stages improves the survival rate, most patients present advanced stages of the disease at the time of diagnosis, and no sensitive and specific predictors of aggressive behavior have been identified. Lymph node status is still the most powerful prognostic factor, but the routine histopathologic examination of neck dissection specimens is unable to detect all micrometastases [7]. Therefore, the identification of early detection and prognostic biomarkers is highly desirable for planning an efficient and appropriate treatment procedure.

Evidence for a fundamental role for epigenetic modifications in head and neck cancer cells has been widely reported in the literature, including DNA methylation and histone deacetylation [8,9]. Both promoter hypermethylation of specific genes [10–12] and global hypomethylation are implicated in head and neck tumorigenesis [13,14].

Aberrant DNA methylation, such as regional gains or global loss, is an early event that occurs as a nonrandom signature in almost all tumors [15] and may be used for the identification of biomarkers. Strategies for assessing genome-wide methylation changes include genomic scanning after methylation-specific cleavage of the DNA and two-dimensional electrophoresis, amplification of intermethylated sites by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR), and microarray gene expression analysis after treatment with DNA demethylating agents such as the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine (5Aza-dC) [16,17]. 5Aza-dC is incorporated into genomic DNA during replication, where it acts as an irreversible inhibitor of methyltransferase by forming a covalent complex with methyltransferase active sites. This suicide inhibition depletes methyltransferase activity, resulting in generalized DNA demethylation and release of specific genes from methylation-mediated transcriptional silencing [18].

In the present study, we carried out a genome-wide screening of 5Aza-dC-reactivated genes in four human squamous cell carcinoma cell lines derived from different topographical sites, using a combination of rapid subtractive hybridization (RaSH) and complementary DNA (cDNA) microarray analysis. This analysis revealed two genes reactivated by 5Aza-dC (*CRABP2* and *MX1*), and they were frequently hypermethylated in primary HNSCCs. Furthermore, the ab-

sence of *CRABP2* protein was associated with decreased disease-free survival rates, supporting a potential use of *CRABP2* expression as a prognostic biomarker for HNSCC.

## Materials and Methods

### Tumor Cell Lines and 5Aza-dC Treatment

Four HNSCC cell lines derived from distinct topographical sites, pharynx (FaDu), floor of the mouth (UM-SCC-14A), supraglottis (UM-SCC-17A), and tonsil (UM-SCC-38A), were used in this study. UM-SCC-14A, UM-SCC-17A, and UM-SCC-38A cell lines were kindly provided by Dr. Thomas E. Carey of the University of Michigan, USA, and FaDu (HTB-43) was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Cell lines were routinely cultured as monolayers in minimum essential medium (Eagle) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% L-glutamine, and 1% penicillin/streptomycin, at 37°C and 5% carbon dioxide. Cells were seeded at a density of  $10^6$  cells/10-cm dish, cultured for 48 hours, and treated for 4 days with freshly prepared 2.5  $\mu$ M 5Aza-dC (Sigma, St Louis, MO) dissolved in 50% acetic acid.

### Tumor Samples

For methylation-specific PCR (MSP) analysis, 140 HNSCC samples and 10 lymphocyte samples from normal individuals were used. The samples were obtained from the Tumor Tissue Biobank of the Medical and Research Center – A.C. Camargo Hospital, São Paulo, and from the Head and Neck Genome Project/Gencapo – Brazil after Institutional Ethics Committee approval. Tumor samples were microdissected to enrich for tumor cells. Five-micrometer-thick sections from the frozen tumors were cut onto glass slides, fixed, and stained with hematoxylin and eosin. The hematoxylin and eosin-stained section was used as a guide for manual dissection, and only samples with more than 70% of tumor area were used in this study. All samples were reviewed by two independent pathologists. The main clinicopathological characteristics corresponding to these samples are shown in Table W3. None of the patients received preoperative treatment, and 41.3%, 42.0%, and 16.7% of patients were treated by surgery alone, surgery + radiotherapy, or surgery + radiotherapy + chemotherapy, respectively. The mean follow-up for these patients was approximately 31 months.

For the tissue microarray (TMA) analysis, an independent set of 75 HNSCC samples was used. These samples were obtained from the archives of the Department of Anatomic Pathology, A.C. Camargo Hospital, São Paulo, Brazil, and were reviewed by two independent pathologists. The main clinicopathological characteristics corresponding to these samples are also shown in Table W3. None of the patients received preoperative treatment, and 41.3%, 42.0%, and

6.7% of patients were treated by surgery alone, surgery + radiotherapy, or surgery + radiotherapy + chemotherapy, respectively. The average follow-up period was approximately 56 months.

#### DNA and RNA Extraction

Genomic DNA from tumor cell lines was purified using a Super Quick Gene DNA Isolation kit (Analytical Genetic Testing Center) following the protocol instructions. Total RNA was isolated using TRIzol Reagent for Molecular Biology (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA). Genomic DNA from tumor samples was purified by standard phenol/chloroform purification. DNA quality was verified by electrophoresis through agarose gel on visualization with ethidium bromide. For microarray experiment, total RNA was further purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). For quantitative real-time PCR (qRT-PCR), 5 µg of total RNA was previously treated with the RQ1 RNase-free DNase (Promega, Madison, WI). The RNA integrity after the purification procedure was evaluated using the Agilent 2100-Bioanalyser revealing a minimal RIN value of 7.9.

#### Rapid Subtractive Hybridization

RaSH cDNA libraries were prepared by a modified protocol taken from Jiang et al. [19]. The cDNA were initially digested with *Mbol* (Gibco, Gaithersburg, MD) at 37°C for 1 hour. The fragments were inserted into *Xba*I-digested pZERO plasmid (1 µg/µl) at 16°C for 3 hours. The constructs were introduced into the DH10-B competent cells. Two RaSH cDNA libraries were prepared: one using cDNA from the FaDu cell line treated with 5Aza-dC as tester and the mock-treated FaDu cell line as driver and the other using cDNA from the mock-treated FaDu cell line as tester and cDNA from the FaDu cell line treated with 5Aza-dC as driver.

Bacterial colonies were selected randomly and PCR amplified, using M13 forward and reverse primers. Inserts were sequenced with forward and reverse M13 primers using a DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and a MegaBACE 1000 sequencer (Amersham Biosciences). The sequences were analyzed, using an annotation pipeline that consists of four steps: 1) quality checking, phred base-calling, cutoff 0.05 [20,21]; 2) vector trimming and removal of undesirable sequences such as bacterial, mitochondrial, and rRNA sequences; 3) masking of repetitive elements and screening of low-complexity regions by Repeat Masker, using the default settings [22]; and 4) annotation against existing databases, using BLASTN with default parameters. Significant hits were determined by using an *E*-value threshold of  $10^{-15}$  for searches against nucleotide sequence databases [23].

#### cDNA Microarray

A total of 151 RaSH cDNA clones were amplified by PCR, purified, and spotted onto glass slides (Corning, Corning, NY) with a Flexys Robot (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI). A total of 2352 spots, including 151 RaSH cDNA clones, 496 negative controls (pure H<sub>2</sub>O or DMSO), 48 positive controls (*Q* gene fragment from phage lambda), and 1657 cDNA fragments derived from other projects were arranged on this customized cDNA platform. Positive hybridization signals from all spots were considered for evaluation of hybridization quality, normalization, and statistical analysis. However, for the purpose of this study, only differences in the expression levels of RaSH cDNA clones were used.

Total RNA extracted from HNSCC cell lines was further purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) before the RNA amplification procedure. A two-round RNA amplification procedure was carried out as previously described [24]. Amplified RNA was used in a reverse transcription reaction in the presence of random hexamer primer (Invitrogen/Life Technologies), Cy3- or Cy5-labeled dCTP (Amersham Biosciences), and SuperScript II (Invitrogen/Life Technologies). Equal amounts of Cy3- or Cy5-labeled cDNA derived from cell lines treated or not with 5Aza-dC were mixed and cohybridized to the customized platform. Dye swap was performed, and hybridizations were carried out in duplicates, resulting in four independent hybridizations for each cell line. Self-self hybridization experiments were performed by pooling the cDNA derived from the four untreated cell lines, labeling them with Cy3 and Cy5 independently. Labeled cDNA were then cohybridized to the customized platform. Dye swap was also performed, and hybridizations were carried out in duplicates, resulting in four independent hybridizations for self-self experiments. Arrays were scanned and extracted as previously described [25]. Self-self experiments-based statistical test for low-replication microarray studies was performed to select genes reactivated by 5Aza-dC treatment. This strategy has been used to derive intensity-dependent cutoffs to classify a gene as differentially expressed in microarray studies [26]. The cutoff for all comparisons between treated and untreated samples was 99%.

#### Selection of Genes for Validation by qRT-PCR

Genes that were reactivated by 5Aza-dC in at least two of the four cell lines and that possessed a CpG island in their 5' region were selected for qRT-PCR validation. Genomic sequences corresponding to 5' regions of reactivated genes were analyzed for the presence of a CpG island using the UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). Criterion for a CpG island was based on those of Gardiner-Garden and Frommer [27], as a GC content of 50% or greater, length greater than 200 bp, and a ratio greater than 0.6 of the observed number of CG dinucleotides to the expected number for the total number of Gs and Cs in the segment. Repeat Masker (<ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/Repeat-Masker>) was used to determine whether selected CpG islands contained repetitive elements.

#### Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

qRT-PCR amplification was performed with Power SYBR Green and an ABI 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA). The PCR total volume was 20.0 µl containing 10.0 µl of PCR Power SYBR Green Master Mix, 2.0 µl of diluted cDNA, and optimized primer concentrations for each primer pair (Table W4). Conditions were set as an initial polymerase activation step for 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C for template denaturation, 1 minute at 60°C for extension and fluorescence measurement. Afterward, a dissociation protocol was used for each primer pair to verify the specificity of the qRT-PCR reaction and the absence of primer dimer. All samples were amplified in triplicates and the mean was used for qRT-PCR analysis, and a no-template control was also included. Primers were located in different exons and designed for optimal hybridization kinetics with Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). Relative quantification of gene expression was carried out with the mathematical model developed by Pfaffl [28]. All PCR efficiencies were greater than 95%. Nontreated cell lines were used as reference samples, and *TUBA1C* (*TUBA6*) was selected as endogenous control gene after GcNorm [29].

### Bisulfite Sequencing

Genomic DNA was subjected to sodium bisulfite treatment to modify unmethylated cytosine to uracil, as previously described [30]. Hypermethylation in HNSCC cell lines was determined by the bisulfite sequencing. Bisulfite-treated DNA was amplified by a nested-PCR protocol, using primers designed to amplify CpG-rich regions located at the 5' regions of *CRABP2* (-450 to -117 relative to transcription start site [TSS] encompassing 22 CpG dinucleotides), *MX1* (-71 to +845 relative to TSS encompassing 78 CpG dinucleotides), and *SLC15A3* (+351 to +845 relative to TSS encompassing 58 CpG dinucleotides; Figure 2). Primer sequences and PCR amplification conditions are available on request. Amplified products were cloned using the InsTAclone PCR Cloning Kit (Fermentas, Hanover, MD). Five positive clones were sequenced for each cell line using the Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit and an ABI3130 sequencer, in accordance with manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The methylation percentage for each sample was calculated as the proportion of unconverted CpG dinucleotides among all the CpGs analyzed in all five positive clones.

### Methylation-Specific PCR

Hypermethylation in head and neck tumors was determined by the MSP method as reported by Herman et al. [30], but amplified fragments were analyzed on silver-stained 8% polyacrylamide gels. Bisulfite-modified DNA was PCR amplified with primers specific for methylated versus unmethylated DNA. Two primer pairs were designed for MSP analysis of the *CRABP2* gene, and a single primer pair was used for the *MX1* gene, as indicated in Figure 2. Primer sequences and PCR amplification conditions are available on request.

### Tissue Microarray

To construct the TMA, core biopsies were taken from previously defined areas, with a Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Springs, MD). Tissue cores with a dimension of 1.0 mm were punched from each specimen and arrayed in duplicate on a recipient paraffin block. Each core was spaced 0.2 mm apart. After cutting (3  $\mu$ m) on the recipient block and transferring with an adhesive tape to coated slides for subsequent UV cross-linkage (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ), the slides were dipped in a layer of paraffin to prevent oxidation and kept in a -20°C freezer.

For immunostaining, the sections were deparaffinized and rehydrated in graded ethanol solutions, treated with peroxide to quench endogenous peroxidase (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 min), and blocked for avidin/biotin (Biotin Blocking System; DAKO, Carpinteria, CA) and for protein (Protein Block Serum-Free; DAKO). Antigenic recovery was performed by wet heating in a pressure cooker. Slides were incubated with anti-CRABP2 (MAB5488, 1:2000; Chemicon, Inc, Temecula, CA). The immunohistochemical reaction was carried out in duplicate at different TMA levels, representing four-fold redundancy for each case. Positive and negative controls were included in all reactions. Positive controls were obtained using normal breast slides incubated with the CRABP2 antibody. CRABP2 binding was assessed by two kinds of negative controls: 1) omitting the primary antibody and incubating slides with phosphate-buffered saline; 2) replacing the primary antibody with normal mouse serum.

After scanning each tumor specimen in low power field to choose the most stained area, at least five fields were evaluated under high power. The presence of a clearly visible dark brown precipitation was

considered an immunoreaction. Evaluation of CRABP2 included the proportion of reactive cells within the tumors and the staining intensity. The proportion score described the fraction of positively stained tumor cells (<10% of positive cells;  $\geq$ 10% of tumors cells stained).

The immunostaining intensities were assessed visually by two pathologists using blind analysis by determining the color intensity of stained cells. The samples were classified as negative (no visible reaction or positivity in <10% of positive cells) or positive reaction (weak and strongly positive present in  $\geq$ 10% of tumors cells stained). For statistical analysis, the samples were categorized into two groups: negative and weakly/strongly positive cases.

### Statistical Analysis

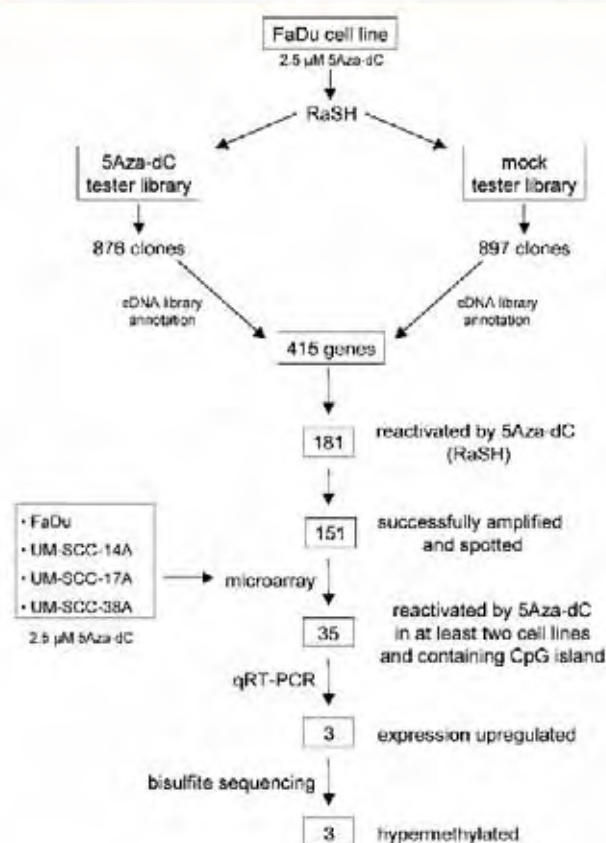
For frequency analysis in contingency tables, statistical analyses of associations between variables were performed by the  $\chi^2$  test or Fisher's exact test (with significance set at  $P < .05$ ). The overall survival was defined as the interval between the beginning of treatment and the date of death or the last information for censored observations. The disease-free interval was measured from the date of the treatment to the date when locoregional recurrence or distant metastasis was diagnosed. Overall survival and disease-free survival probabilities were estimated by the Kaplan-Meier method, and the log-rank test was applied to assess the significance of differences among actuarial survival curves. Multivariate analysis was carried out using Cox proportional hazards model (stepwise forward selection). All variables presenting  $P < .20$  on the univariate analysis were selected for building a multiple model. For all tests, type I error ( $\alpha$ ) was established as 0.05, and results were considered statistically significant when  $P < .05$ . All statistical analyses were performed with the STATA software (Intercooled Stata release 7.0; Stata Corporation, College Station, TX).

## Results

### Identification of Genes Reactivated by 5Aza-dC

To identify novel methylation-silenced genes in HNSCC cell lines, we treated the FaDu cell line with the demethylating agent 5Aza-dC and used a combination of RaSH and cDNA microarray analysis to identify genes reactivated on treatment. Initially, two RaSH cDNA libraries were constructed: one using cDNA prepared from the FaDu cell line treated with 5Aza-dC as tester and the mock-treated FaDu cell line as driver (5Aza-dC tester library) and the other using cDNA prepared from mock-treated FaDu cell line as tester and cDNA from the FaDu cell line treated with 5Aza-dC as driver (mock tester library; Figure 1). A total of 1773 cDNA clones were sequenced, corresponding to 876 and 897 clones derived from the 5Aza-dC tester and mock tester libraries, respectively. After similarity searches in public databases, we found that these sequences correspond to 415 known genes of which 65 were present in both RaSH libraries. A total of 181 and 169 genes were found exclusively in the 5Aza-dC tester and mock tester libraries, respectively. Of the 181 cDNA clones reactivated by the 5Aza-dC, 151 were successfully amplified and spotted onto glass slides (Figure 1; Table W1).

Microarray analysis was then carried out with RNA extracted from FaDu and three additional HNSCC cell lines (UM-SCC-14A, UM-SCC-17A, and UM-SCC-38A) derived from distinct topographical sites and treated with 5Aza-dC. Self-self experiments based on a statistical test for low-replication microarray studies were performed to



**Figure 1.** Flowchart for the identification of differentially methylated genes in HNSCC cell lines. FaDu cell line was treated with 5Aza-dC, and purified mRNA was used to construct RaSH cDNA libraries. A set of 151 nonredundant genes was used to prepare an enriched cDNA platform for microarray analysis. A total of 48 genes were reactivated in at least two cell lines. From them, 35 genes harboring a CpG island located at their 5' region were submitted to qRT-PCR. Up-regulation of gene expression by 5Aza-dC was confirmed for three genes. Bisulfite sequencing revealed three differentially methylated genes.

identify genes reactivated on treatment. A total of 78 reactivated genes were identified using this combined approach, of which 31, 18, 47, and 46 were identified in the FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A, and UM-SCC-38A cell lines, respectively. A total of 48 genes were reactivated in at least two cell lines and used for further investigation. We reasoned that commonly reactivated genes, inactivated in at least two HNSCC, were more likely to represent genes frequently inactivated in tumors.

**Validation Analysis by qRT-PCR of Genes Reactivated by 5Aza-dC in HNSCC Cell Lines**

Of the 48 genes selected by the microarray analysis, 35 harbored a bona fide CpG island in the 5' region and were further selected for qRT-PCR quantification of gene expression in the same cell lines used in the microarray analysis (Table W2). Three genes (*CRABP2*, *MXI*, and *SLC15A3*) were confirmed to be reactivated at least three-fold in at least one of the cell lines after 5Aza-dC treatment. All these genes were upregulated in the FaDu cell line. In addition, the *CRABP2* and *MXI* genes were also upregulated in the UM-SCC-14A and UM-SCC-38A cell lines, respectively (Table 1).

**DNA Methylation Analysis in HNSCC Cell Lines**

The methylation status of the CpG island at the 5' region site of the *CRABP2*, *MXI*, and *SLC15A3* genes was then investigated by bisulfite sequencing in HNSCC cell lines that showed induction of gene expression after 5Aza-dC treatment.

A significant reduction in the global methylation level (from 40.00% to 5.50%) of the 5' region of *CRABP2* was observed in the FaDu cell line after treatment with the demethylating agent, which is in agreement with the 4.6-fold increase in the *CRABP2* messenger RNA (mRNA) level observed in this cell line treated with 5Aza-dC. Corroborating this result (Figure 2), reduction in the methylation levels was observed for almost all CpG dinucleotides analyzed.

A less pronounced reduction in the DNA methylation level of the *MXI* 5' region was observed in the FaDu (from 27.70% to 12.70%) and UM-SCC-14A (from 7.80% to 1.02%) cell lines (Figure 2). The reduction was limited to dinucleotides 39 to 56 located within the first exon of the *MXI* gene. Reduction in the methylation levels of these specific dinucleotides was directly correlated with induction of gene expression on treatment observed in these cell lines, as measured by qRT-PCR (22.4-fold for FaDu and 4.5-fold for UM-SCC-14A), suggesting that these dinucleotides play a critical role in transcription regulation.

In the case of *SLC15A3* gene, an increase of 7.3- and 3.0-fold in its expression level was observed in the FaDu and UM-SCC-38A cell lines, respectively. However, a significant reduction (from 96.6% to 5.5%) in the DNA methylation level of the *SLC15A3* 5' region was exclusively observed in the UM-SCC-38A cell line. These results suggest that other epigenetic mechanisms, such as histone modification, may also play a critical role in regulating the expression of the *SLC15A3* gene.

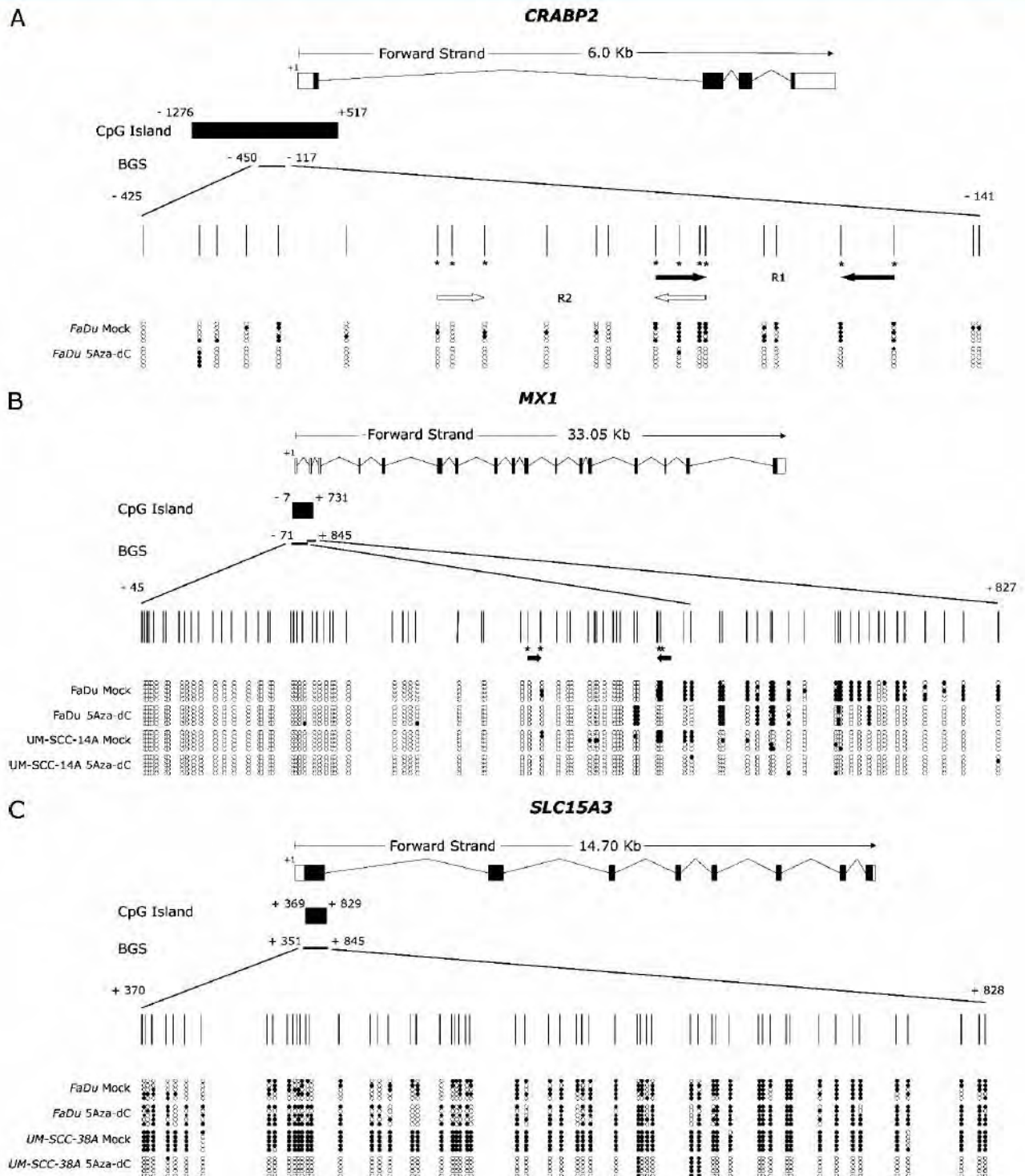
**DNA Methylation Analysis in Primary HNSCC**

We next sought to determine whether *CRABP2* and *MXI* hypermethylation, identified in the preceding experiments using cell lines, was also present in primary HNSCC. The methylation status of *SLC15A3* was not further investigated in primary tumors because

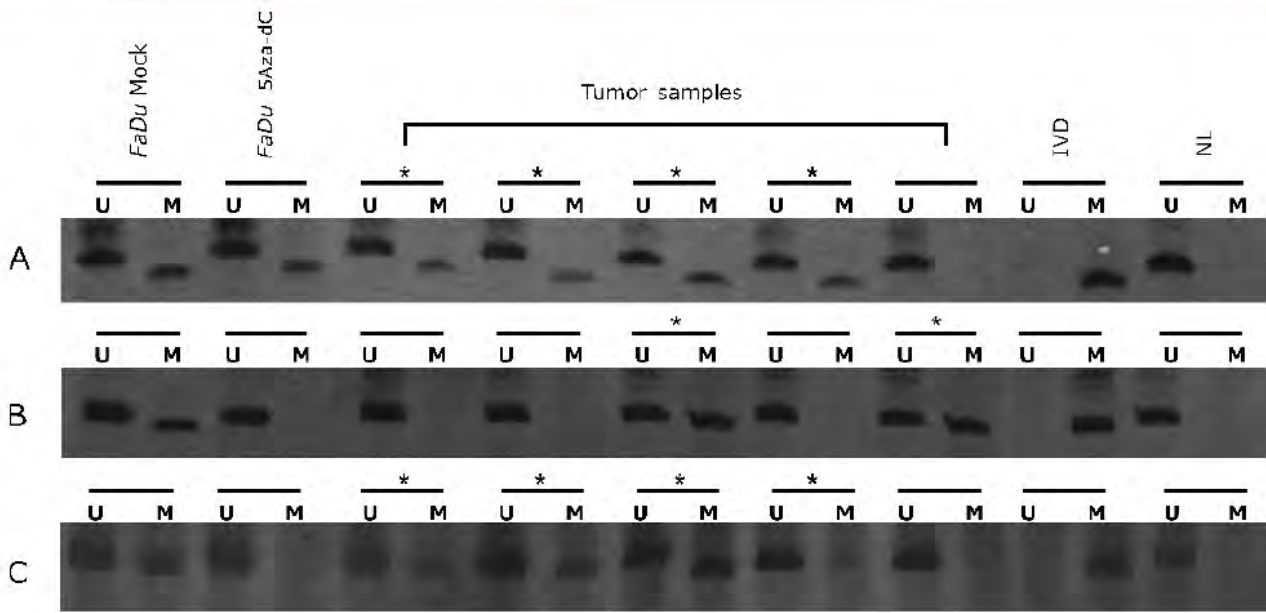
**Table 1.** Validation of Gene Expression Reactivation by Microarray Analysis and qRT-PCR in 5Aza-dC-Treated HNSCC Cell Lines.

Official Symbol	Microarray				qRT-PCR (Fold Change)			
	FaDu	UM-SCC-14A	UM-SCC-17A	UM-SCC-38A	FaDu	UM-SCC-14A	UM-SCC-17A	UM-SCC-38A
<i>CRABP2</i>	Up	Up	Up	—	4.6	1.9	1.7	ND
<i>MXI</i>	Up	Up	—	Up	22.4	4.5	ND	0.2
<i>SLC15A3</i>	Up	Up	Up	Up	7.3	2.2	1.0	3.0

ND indicates not determined; Up, upregulated.



**Figure 2.** A representative result of bisulfite sequencing. Each panel represents a schematic representation of the genome structure of each gene including their 5' CpG islands. Exons and untranslated regions are represented by filled or open boxes, respectively. The transcription initiation site is represented by +1. Expanded view shows the position of CpG islands and the region analyzed by bisulfite sequencing. Vertical marks represent individual CpG dinucleotides and their spacing accurately reflects the CpG density of the region. MSP primers are represented by horizontal arrows in the panels. Primer sets M and U were designed for the same CpG dinucleotide (indicated by an asterisk). Methylation profiles of the treated (5Aza-dC) and untreated (mock) cell lines are indicated in the lower part of the panels. Each row represents one sequenced clone, and open and filled circles represent unmethylated and methylated CpG dinucleotides, respectively. (A) Bisulfite sequencing of *CRABP2* in the FaDu cell line. (B) Bisulfite sequencing of *MX1* in the FaDu and UM-SCC-14A cell lines. (C) Bisulfite sequencing of *SLC15A3* in the FaDu and UM-SCC-38A cell lines.



**Figure 3.** MSP analysis of *CRABP2* and *MX1* genes. Representative results of MSP analysis of *CRABP2* and *MX1* genes in the FaDu cell line and five different HNSCC samples. Methylated tumors are indicated with asterisks. The lanes indicated by M and U correspond to the products amplified by MSP primer sets specific for methylated and unmethylated DNA, respectively. *In vitro* methylated DNA (IVD) and normal human peripheral lymphocytes (NL) were used as positive and negative methylation controls, respectively. (A) MSP of *CRABP2* R1. (B) MSP of *CRABP2* R2. (C) MSP of *MX1*.

we were unable to detect a direct correlation between DNA methylation level and gene expression. MSP analysis of *CRABP2* and *MX1* was carried out in 140 HNSCC samples and 10 lymphocyte samples from normal individuals. The main clinicopathological characteristics of the HNSCC patients are shown in supplementary data (Table W3), and representative MSP results are shown in Figure 3. MSP primers were designed to target the most frequently methylated CpG dinucleotides and those with a direct correlation with mRNA expression as revealed by bisulfite sequencing of the tumor cell lines. Two primer pairs were designed for MSP analysis of the *CRABP2* (one

pair for region 1 – R1 and one pair for region 2 – R2) and a single primer pair was used for the *MX1* gene, as indicated in Figure 2.

*CRABP2* hypermethylation was detected in 56.4% (79/140) of the samples when primers for R1 were used and in 10.0% (14/140) of the samples when reactions were carried out with R2 primers. For 13 patients (9.3%), hypermethylation was detected with both primer pairs. No *CRABP2* hypermethylation was detected in normal lymphocytes for both primer pairs. We then investigated the association between *CRABP2* hypermethylation and well-established clinicopathological parameters used for HNSCC. As shown in Table 2,

**Table 2.** Relationship between Methylation Analyses of *CRABP2* and *MX1* and Clinicopathological Variables in HNSCC Patients.

Variables	Category	<i>CRABP2</i> R1,* n (%)			<i>CRABP2</i> R2,* n (%)			<i>MX1</i> ,* n (%)		
		Unmethylated	Methylated	P	Unmethylated	Methylated	P	Unmethylated	Methylated	P
Age	≤53	26 (44.07)	23 (29.49)	.078	47 (38.52)	2 (14.29)	.074	29 (40.85)	20 (30.30)	.198
	>53	33 (55.93)	55 (70.51)		75 (61.48)	12 (85.71)		42 (59.15)	46 (69.70)	
Tumor site	Oral cavity	29 (49.16)	34 (43.04)	.010 <sup>†</sup>	58 (47.15)	4 (28.57)	.097	39 (54.17)	24 (36.36)	.095
	Larynx	15 (25.42)	8 (10.13)		22 (17.89)	1 (7.14)		9 (12.50)	14 (21.21)	
	Hypopharynx	15 (25.42)	37 (46.84)		43 (34.96)	9 (64.29)		24 (33.33)	28 (42.43)	
Tumor size	T1 + T2	14 (25.00)	20 (26.32)	.864	30 (25.42)	4 (30.77)	.676	13 (18.31)	21 (34.43)	.035 <sup>†</sup>
	T3 + T4	42 (75.00)	56 (73.68)		88 (74.58)	9 (69.23)		58 (81.69)	40 (65.57)	
Lymph nodes	N0	10 (17.54)	16 (21.33)	.588	21 (17.80)	5 (38.46)	.076	15 (21.13)	11 (18.03)	.656
	N+	47 (82.46)	59 (78.67)		97 (82.20)	8 (61.54)		56 (78.87)	50 (81.97)	
Grade	1	11 (19.64)	25 (34.25)	.184	34 (29.57)	2 (15.38)	.595	21 (31.34)	15 (24.19)	.563
	2	36 (64.29)	39 (53.42)		65 (56.52)	9 (69.23)		36 (53.73)	39 (62.90)	
	3	9 (16.07)	9 (12.33)		16 (13.91)	2 (15.38)		10 (14.93)	8 (12.90)	
Vascular invasion	No	35 (60.34)	51 (68.92)	.305	76 (64.41)	10 (76.92)	.367	40 (57.14)	45 (72.58)	.055
	Yes	23 (39.66)	23 (31.08)		42 (35.59)	3 (23.08)		30 (42.86)	17 (27.42)	
Lymphatic permeation	No	49 (84.48)	64 (87.67)	.599	100 (84.75)	12 (100)	.145	57 (82.61)	56 (90.32)	.200
	Yes	9 (15.52)	9 (12.33)		18 (15.25)	0		12 (17.39)	6 (9.68)	
Perineural infiltration	No	27 (46.55)	42 (57.53)	.211	60 (51.28)	9 (69.23)	.219	38 (55.07)	31 (50.00)	.562
	Yes	31 (53.45)	31 (42.47)		57 (48.72)	4 (30.77)		31 (44.93)	31 (50.00)	

R1 indicates region 1; R2, region 2.

\*Percentages considering cases with complete information.

<sup>†</sup>Statistically significant.

a statistically significant association was found between tumor site and *CRABP2* hypermethylation in region 1 ( $P = .010$ ). It was observed that hypopharynx tumors showed a higher frequency of methylation (37/52 or 71.2%) when compared with the other tumor sites. Kaplan-Meier analysis was then used to estimate the relationship between the methylation status of the *CRABP2* gene with overall and disease-free survival. No difference in terms of overall or disease-free survival was observed between patients with or without *CRABP2* hypermethylation in their primary tumors.

Hypermethylation in the 5' region of the *MX1* gene was detected in 45.0% (63/140) of the HNSCC patients. Similar to what was observed for *CRABP2*, no *MX1* hypermethylation was detected in normal lymphocytes. A statistically significant association was observed between *MX1* hypermethylation and tumor size ( $P = .035$ ) and a marginal association with vascular invasion ( $P = .055$ ; Table 2). However, as for *CRABP2*, no difference in terms of overall or disease-free survival was observed between patients that did or did not show *MX1* hypermethylation in primary tumors.

#### *CRABP2* Protein Expression in HNSCC Primary Tumors

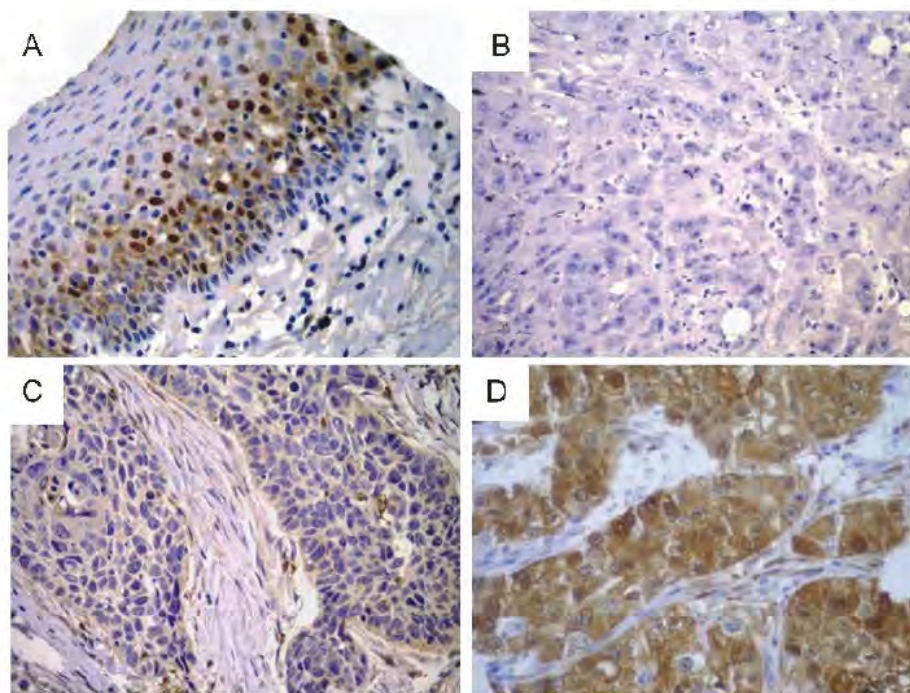
*CRABP2* protein expression was then analyzed in HNSCC tumors by immunohistochemistry using a TMA containing 75 HNSCC samples. As shown in Figure 4A, *CRABP2* protein immunostaining was detected in the morphologically normal epithelium samples used as controls, more intense staining being detected in the suprabasal (post-mitotic) epithelial cells. Among the 75 HNSCC samples, 8 cases (11%) were negative, 37 cases (51%) were weakly positive, and 28 cases (38%) were strongly positive (Figure 4, B–D). Two samples did not con-

tain representative sections of the tumor tissue and were not considered in the analysis. For all further analysis, weakly and strongly positive tumors were treated as a single group with positive *CRABP2* protein expression.

We then analyzed the possible association between the expression of *CRABP2* protein and clinicopathological variables. As shown in Table 3, a statistically significant association was observed between *CRABP2* staining and increased tumor size (T3 + T4;  $P = .029$ ) and absence of lymphatic permeation ( $P = .014$ ). Univariate analysis was used to estimate the association between *CRABP2* protein expression and overall or disease-free survival. No difference in terms of overall survival was observed with *CRABP2* protein expression. Interestingly, our data show that an absence of *CRABP2* expression was associated with a worse disease outcome because patients whose tumors were negative for *CRABP2* expression had a higher risk of locoregional recurrence or distant metastasis than patients with *CRABP2*-positive tumors (log-rank test,  $P = .0531$ ; Figure 5). In the Cox regression univariate model, *CRABP2* protein expression showed a protective hazard ratio of 0.40 (95% confidence interval, 0.1–1.0). However, in the multivariate analysis, *CRABP2* protein expression was not shown to be an independent prognostic factor for disease-free survival owing to the small number of *CRABP2*-negative tumors or to the presence of confounding variables such as tumor size and site and the occurrence of lymphatic permeation.

#### Discussion

Treatment with 5Aza-dC in combination with histone deacetylase inhibitors has been widely used to reactivate epigenetically silenced



**Figure 4.** *CRABP2* protein immunostaining patterns. Representative immunostainings of (A) morphologically normal epithelium and (B–D) HNSCC samples for *CRABP2*. Chromogenic detection (brown precipitate) counterstained with hematoxylin. Original magnifications: A,  $\times 200$  (A); B–D,  $\times 400$ . Staining was scored as negative (B), weakly positive (C), or strongly positive (D).

**Table 3.** Relationship between CRABP2 Protein Expression and Clinicopathological Variables in HNSCC Patients.

Variables	Category	CRABP2,* n (%)		P
		Negative	Positive	
Age	≤53	1 (50.00)	13 (55.38)	.999
	>53	7 (50.00)	52 (44.62)	
Tumor site	Oral cavity	3 (37.50)	20 (30.77)	NA
	Larynx	4 (50.00)	26 (40.00)	
Tumor size	Hypopharynx	1 (12.50)	19 (29.23)	.029 <sup>†</sup>
	T1 + T2	5 (71.43)	17 (29.82)	
Lymph nodes	T3 + T4	2 (28.57)	40 (70.18)	.075
	N0	5 (62.50)	56 (91.80)	
Histologic grade	N+	3 (37.50)	5 (8.20)	NA
	1	3 (37.5)	22 (33.85)	
Vascular invasion	2	5 (62.5)	36 (55.38)	.707
	3	0	7 (10.77)	
Lymphatic permeation	No	6 (75.00)	50 (80.65)	.014 <sup>†</sup>
	Yes	2 (25.00)	12 (19.35)	
Perineural infiltration	No	2 (25.00)	43 (69.35)	.278
	Yes	6 (75.00)	19 (30.65)	
	No	6 (75.00)	34 (54.84)	
	Yes	2 (25.00)	28 (45.16)	

NA indicates not applied.

\*Percentages considering cases with complete information.

<sup>†</sup>Statistically significant.

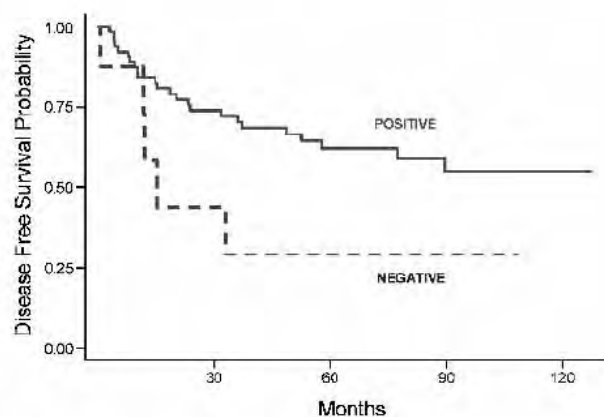
genes in cell lines from several types of tumor [31–35]. Although this approach can lead to secondary effects on gene expression, it seems to be very efficient compared with alternative strategies in which CpG island arrays are hybridized with genomic DNA digested with methylation-sensitive restriction enzyme [15,36] because it relies directly on the reactivation of gene expression rather than on the presence of a CpG island.

In the present study, we have used 5Aza-dC to identify genes putatively silenced by DNA hypermethylation. Histone deacetylase inhibitors were not used because previous studies using similar strategies have demonstrated that most genes are reactivated by high-dose 5Aza-dC treatment, and only a small subset of genes is induced by the synergistic treatment with demethylating agents and deacetylase inhibitors [32,33].

To evaluate changes in gene expression induced by 5Aza-dC treatment, we used a combination of RaSH and cDNA microarray analysis. The RaSH methodology has been extensively used in the identification of differentially expressed genes, and in our study, it was used in an attempt to enrich the cDNA microarray for 5Aza-dC reactivated genes and not limit our analysis to a set of predefined genes represented in commercial arrays. Two RaSH cDNA libraries were constructed: 5Aza-dC tester and mock tester. The mock tester library was constructed in an attempt to identify false-positive genes that were found in both cDNA libraries and as a control of the subtraction efficiency. We identified 415 known genes of which only 65 were present in both RaSH libraries, indicating a high subtraction efficiency. In addition, we were able to identify 181 genes putatively induced by 5Aza-dC in the FaDu cell line, and 151 of these genes were spotted on the microarray platform and analyzed for gene reactivation in three additional HNSCC cell lines. Using this combined approach, we identified 78 genes induced on treatment and selected 35 genes, induced in at least two of the cell lines and which contained a CpG island at the 5' region for technical validation by qRT-PCR. Gene expression increased at least three-fold on 5Aza-dC treatment in 3 of the 35 genes analyzed (*CRABP2*, *MX1*, and *SLC15A3*) and 2 of them (*CRABP2* and *MX1*) were indeed hypermethylated in the cell lines used in this study. MSP

was then used to examine the DNA methylation status of *CRABP2* and *MX1* in a set of 140 primary HNSCCs. MSP primers were designed to target the most frequently methylated CpG dinucleotides and those with a direct correlation with mRNA expression as revealed by bisulfite sequencing of the tumor cell lines. Because the CpG-rich region located at the 5' region of *CRABP2* contains 22 CpG dinucleotides, two primer pairs (R1 and R2) were designed for MSP analysis of *CRABP2* in primary tumors. Unfortunately, owing to the higher GC content of the 5' region of the *MX1* gene, we were able to design a single primer pair for MSP analysis of *MX1*. *CRABP2* hypermethylation was specifically detected in 56.4% and in 10.0% of the tumors when reactions were carried out with R1 and R2 primers, respectively. The difference in the methylation frequencies observed for different primer pairs is expected because MSP primers were placed at different CpG dinucleotides. *MX1* hypermethylation was specifically detected in 45.0% of primary HNSCCs. Taken together, these results suggest that *CRABP2* and *MX1* mRNA expression is regulated by DNA methylation and that *CRABP2* and *MX1* hypermethylation is frequent among HNSCCs. Interestingly, *CRABP2* (R1) or *MX1* hypermethylation showed statistically significant association with tumor site or tumor size, respectively. In the case of *CRABP2*, hypopharynx tumors showed a higher frequency of promoter methylation when compared with the other tumor sites.

The human *MX1* (myxovirus resistance 1) gene, also named IFI78 (interferon-inducible protein p78), encodes a member of the dynamin superfamily of large GTPases, which mediates vesicle trafficking and organelle homeostasis [37]. Similarly to other Mx proteins, human *MX1* has antiviral activities against several RNA viruses and is transcriptionally induced by interferon through the JAK/STAT pathway [38]. *MX1* is upregulated in cells of some Fanconi anemia complementation groups, which may be related to phenotypic features of this disease, particularly bone marrow failure [23]. *MX1* is downregulated in prostate carcinomas [39] and methylated in acute myeloid leukemia cells [40], which provide a potential link between *MX1* silencing and tumorigenesis. Supporting this link are the observations by Mibayashi et al. [41] that *MX1* promotes cell death induced by apoptotic stimuli. Therefore, low levels of *MX1* protein might contribute to apoptosis resistance during cancer development.



**Figure 5.** Kaplan-Meier disease-free survival estimates from 73 patients for CRABP2 expression. Continuous and dashed lines depict patients with positive (weak and strong) or negative CRABP2 expression ( $P = .0531$ ), respectively.

CRABP2 (cellular retinoic acid binding protein 2) encodes a small protein (15 kDa) harboring a lipocalin domain involved in retinoic acid (RA) binding [42,43]. CRABP2 binds to all-*trans* RA in the cytoplasm, which triggers its nuclear targeting to associate with RA receptors (RARs). Owing to the poor water solubility of RA, its binding by CRABP2 allows the intracellular RA levels and availability to increase [44]. The association between CRABP2 and RAR in the nucleus enables direct channeling of RA and increases the RAR-RXR heterodimer transcriptional activity at RA-responsive sites [44].

RA and its derivatives (retinoids) are responsible for the regulation of multiple biologic processes, such as embryogenesis, apoptosis, cell proliferation, and differentiation [45]. Several authors have described retinoids as useful pharmaceuticals for the prevention and treatment of various types of human cancer. These studies demonstrated their efficiency in the treatment of tumors of head and neck [46,47], lung [48], skin [49], breast [50], and also of acute promyelocytic leukemia [51]. However, development of RA resistance frequently occurs [52]. Importantly, two major RA pathways were described as responsible for the antiproliferative and proliferative effects observed, respectively: the classic CRABP2/RAR and, more recently described, the FABP5/PPAR $\beta/\delta$  [53]. Therefore, both endogenous and exogenous retinoids may only inhibit tumor growth if the RAR pathway is predominant in the tumor cells, and this idea is supported by data showing that diverting RA from PPAR $\beta/\delta$  to RAR is sufficient to overcome RA resistance of mammary carcinomas [54]. In a related manner, abnormalities in the expression or in the function of retinoid receptors, particularly the suppression of RARB expression, have been found in several types of cancer, including premalignant oral lesions [55] and HNSCC [56,57]. Interestingly, CRABP2 mRNA and protein levels were shown to be downregulated in carcinoma cells, relative to normal glandular cells, in the prostate [58,59]. Also, CRABP2 was identified as downregulated in an oligomicroarray analysis of genes related to lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma [60]. More recently, CRABP2 expression was demonstrated to be suppressed as a result of promoter DNA methylation in non-small cell lung tumor [61].

Finally, in confirmation that CRABP2 is an important component of the antiproliferative effects of the RAR pathway in response to RA, it was shown that CRABP2 induces apoptosis in MCF-7 mammary carcinoma cells because of the induction of transcription of cell cycle-regulating genes [62,63] and that overexpression of CRABP2 in the HaCaT keratinocyte cell line significantly increased tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced apoptosis [53]. The correlation of CRABP2 protein with the antiproliferative effect of RA and the induction of apoptosis in various cells are in agreement with the results of our study showing that CRABP2 expression loss leads to survival disadvantage.

In the present study, we have demonstrated for the first time that CRABP2 and MX1 mRNA expression is regulated by DNA methylation and that hypermethylation of both genes is frequent among HNSCC. Although a direct correlation between CRABP2 hypermethylation and absence of protein expression was not directly evaluated in the present work, we observed similar frequencies for both CRABP2 hypermethylation (region 2 – 10.2%) and absence of CRABP2 protein (11.0%) in different sets of HNSCC samples, suggesting that DNA hypermethylation might also affect CRABP2 protein levels. Moreover, a statistically significant association between absence of CRABP2 protein and lower survival rates was observed in our study, suggesting that CRABP2 could be used as a prognostic biomarker for patients with HNSCC.

## Acknowledgments

The authors thank the members of the GENCAPO (Head and Neck Genome) Project for sample collection, initial on-site sample processing, and for providing the epidemiological and pathological data on the cases. The authors also thank FAPESP, CNPq and CAPES for fellowships awarded to M.F.C., R.V.R. and C.M.K.

## References

- McMahon S and Chen AY (2003). Head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22, 21–24.
- Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, and Moon CS (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131, 986–993.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, and Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74–108.
- Moriniere S (2006). Epidemiology of head and neck cancer [in French]. *Rev Prat* 56, 1637–1641.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, and Thun MJ (2007). Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57, 43–66.
- Brasil (2007). Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Brasil: Instituto Nacional do Câncer.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, and Sidransky D (2005). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon, France: IARC Press.
- Ha PK and Califano JA (2006). Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol* 7, 77–82.
- Shaw R (2006). The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35, 101–108.
- Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, and Kelsey KT (2002). Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 21, 4231–4236.
- Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EF, Camargo AA, Caballero OL, Tajara EH, Cordóro JA, et al. (2007). Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 173, 31–37.
- Kowaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, and Inazawa J (2008). Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 68, 2094–2105.
- Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, and Califano JA (2007). DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *Int J Cancer* 121, 1724–1728.
- Richards KL, Zhang B, Baggerly KA, Colella S, Lang JC, Schuller DE, and Krahe R (2009). Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS ONE* 4, e4941.
- Costello JF, Fuhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Ferrisio JD, Peltoniemi P, Lang JC, et al. (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24, 132–138.
- Esteller M (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286–298.
- Shames DS, Minna JD, and Gazdar AF (2007). Methods for detecting DNA methylation in tumors: from bench to bedside. *Cancer Lett* 251, 187–198.
- Jones PA and Buckley JD (1990). The role of DNA methylation in cancer. *Adv Cancer Res* 54, 1–25.
- Jiang H, Kang DC, Alexandre D, and Fisher PB (2000). RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12684–12689.
- Ewing B, Hillier L, Wendt MC, and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8, 175–185.
- Ewing B and Green P (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8, 186–194.
- Smit AF (1999). Interspersed repeats and other remnants of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 9, 657–663.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, and Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389–3402.
- Gomes IJ, Silva RL, Stolf BS, Cristo EB, Hirata R, Soares FA, Reis LE, Neves EJ, and Carvalho AF (2003). Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. *Anal Biochem* 321, 244–251.

- [25] Maschietto M, de Camargo B, Brentani H, Grundy P, Sredni ST, Torres C, Motz LD, Cunha IW, Parron DF, Costa CM, et al. (2008). Molecular profiling of isolated histological components of Wilms tumor implicates a common role for the Wnt signaling pathway in kidney and tumor development. *Oncology* **75**, 81–91.
- [26] Vencio RZ and Koide T (2005). HTSelf: self-self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res* **12**, 211–214.
- [27] Gardiner-Garden M and Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**, 261–282.
- [28] Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- [29] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Praepe A, and Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**; RESEARCH10034.
- [30] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, and Baylin SB (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9821–9826.
- [31] Liang G, Gonzales FA, Jones PA, Orntoft TF, and Thykjaer T (2002). Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **62**, 961–966.
- [32] Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Ambushagan R, van Engeland M, Weijnenberg MP, Herman JG, and Baylin SB (2002). A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet* **31**, 141–149.
- [33] Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, Sato F, Meltzer SJ, and Sidransky D (2002). Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Cell* **2**, 485–495.
- [34] Sato N, Fukushima N, Maitra A, Matsubayashi H, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, and Goggins M (2003). Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res* **63**, 3735–3742.
- [35] Lodjyn D, Epanchintsev A, Menssen A, Diebold J, and Hermeking H (2005). Functional epigenomics identifies genes frequently silenced in prostate cancer. *Cancer Res* **65**, 4218–4227.
- [36] Wei SH, Chen CM, Strathdee G, Harnsomburana J, Shyu CR, Rahmatpanah E, Shi H, Ng SW, Yan PS, Nephew KP, et al. (2002). Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clin Cancer Res* **8**, 2246–2252.
- [37] Haller O, Staehli P, and Kochs G (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie* **89**, 812–818.
- [38] Holzinger D, Jorns C, Stertz S, Boisson-Dupuis S, Thimme R, Weidmann M, Casanova JL, Haller O, and Kochs G (2007). Induction of *MxA* gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J Virol* **81**, 7776–7785.
- [39] Schultz WA, Alexa A, Jung V, Hader C, Hoffmann MJ, Yamataka M, Fritzsche S, Wlazlinski A, Muller M, Lengauer T, et al. (2007). Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. *Mol Cancer* **6**, 14.
- [40] Desmond JC, Raynaud S, Tung E, Hofmann WK, Haferlach T, and Koefler HP (2007). Discovery of epigenetically silenced genes in acute myeloid leukemias. *Leukemia* **21**, 1026–1034.
- [41] Mibayashi M, Nakad K, and Nagata K (2002). Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. *Microbiol Immunol* **46**, 29–36.
- [42] Astrom A, Tavakoli A, Pettersson U, Cromie M, Elder JT, and Voorhees JJ (1991). Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). Retinoic acid-induced expression of CRABP-II but not CRABP-I in adult human skin *in vivo* and in skin fibroblasts *in vitro*. *J Biol Chem* **266**, 17662–17666.
- [43] Banaszak I, Winter N, Xu Z, Bernlohr DA, Cowan S, and Jones TA (1994). Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv Protein Chem* **45**, 89–151.
- [44] Budhu AS and Noy N (2002). Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol* **22**, 2632–2641.
- [45] De Luca LM (1991). Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *Faseb J* **5**, 2924–2933.
- [46] Hong WK, Lippman SM, Itri LM, Karp DD, Lee JS, Byers RM, Schantz SP, Kramer AM, Lotan R, Peters LJ, et al. (1990). Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **323**, 795–801.
- [47] Jetten AM, Kim JS, Sacks PG, Rearick JI, Lotan D, Hong WK, and Lotan R (1990). Inhibition of growth and squamous-cell differentiation markers in cultured human head and neck squamous carcinoma cells by  $\beta$ -all-*trans* retinoic acid. *Int J Cancer* **45**, 195–202.
- [48] Pastorino U, Infante M, Maioli M, Chiesa G, Buysse M, Firket P, Rosmentz N, Clerici M, Soresi E, Valente M, et al. (1993). Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *J Clin Oncol* **11**, 1216–1222.
- [49] Kraemer KH, DiGiovanna JJ, Moshell AN, Tarone RE, and Peck GL (1988). Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *N Engl J Med* **318**, 1633–1637.
- [50] Jing Y, Waxman S, and Mira-y-Lopez R (1997). The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells. *Cancer Res* **57**, 1668–1672.
- [51] Chomienne C, Fenaux P, and Degos I (1996). Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB J* **10**, 1025–1030.
- [52] Garattini E, Gianni M, and Terao M (2007). Retinoids as differentiating agents in oncology: a network of interactions with intracellular pathways as the basis for rational therapeutic combinations. *Curr Pharm Des* **13**, 1375–1400.
- [53] Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, and Noy N (2007). Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* **129**, 723–733.
- [54] Schug TT, Berry DC, Toslikov IA, Cheng L, Nikitin AY, and Noy N (2008). Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR $\beta$  to RAR. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 7546–7551.
- [55] Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, and Gudas LJ (1991). Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* **51**, 3972–3981.
- [56] Zou CP, Clifford JL, Xu XC, Sacks PG, Chambon P, Hong WK, and Lotan R (1994). Modulation by retinoic acid (RA) of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* **54**, 5479–5487.
- [57] Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, Hassan K, Feng L, Lee JJ, Lippman SM, et al. (2004). Hypermethylation of the retinoic acid receptor- $\beta$ 2 gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**, 1733–1742.
- [58] Oluodu AF, Janzen V, Ko Y, Hahne JC, Lu H, Ma ZL, Albers P, Sahin A, Wellmann A, Scheinert P, et al. (2005). Cellular retinoic acid-binding protein 2 is down-regulated in prostate cancer. *Int J Oncol* **27**, 1273–1282.
- [59] Thompson M, Lapointe J, Choi YL, Ong DE, Higgins JP, Brooks JD, and Pollack JR (2008). Identification of candidate prostate cancer genes through comparative expression-profiling of seminal vesicle. *Prostate* **68**, 1248–1256.
- [60] Uchikado Y, Inoue H, Haraguchi N, Mimori K, Natsugoe S, Okumura H, Aikou T, and Mori M (2006). Gene expression profiling of lymph node metastasis by oligomicroarray analysis using laser microdissection in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **29**, 1337–1347.
- [61] Park JC, Chae YK, Son CH, Kim MS, Lee J, Ostrow K, Sidransky D, Hoque MO, and Moon C (2008). Epigenetic silencing of human T (brachyury homologue) gene in non-small-cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 221–226.
- [62] Donato LJ and Noy N (2005). Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* **65**, 8193–8199.
- [63] Donato LJ, Suh JH, and Noy N (2007). Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene *Big2* is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* **67**, 609–615.

**Table W1.** List of the 181 Reactivated Genes after 5Aza-dC Treatment Identified by RaSH cDNA Library.

Sequence	Official Symbol	CpG Island	Spotted in Array
CV341138	—	Yes	Yes
NM_000700	<i>ANXA1</i>	No	Yes
NM_001008897	<i>TCP1</i>	Yes	Yes
NM_002462	<i>MX1</i>	Yes	Yes
NM_005562	<i>LAMC2</i>	No	Yes
NM_005347	<i>HSPA5</i>	Yes	Yes
NM_004509	<i>SP110</i>	Yes	No
NM_005610	<i>RBBP4</i>	Yes	Yes
NM_001001977	<i>ATP5E</i>	Yes	Yes
NM_022073	<i>EGLN3</i>	Yes	Yes
NM_006476	<i>ATP5L</i>	Yes	Yes
NM_002893	<i>RBBP7</i>	Yes	No
NM_001799	<i>CDK7</i>	Yes	Yes
NM_016237	<i>ANAPC5</i>	Yes	Yes
NM_002463	<i>MX2</i>	Yes	Yes
NM_001852	<i>COL9A2</i>	Yes	No
NM_022121	<i>PERP</i>	Yes	Yes
NM_001012456	<i>SEC61G</i>	Yes	Yes
NM_002535	<i>QAS2</i>	Yes	No
NM_015013	<i>AOF2</i>	Yes	Yes
NM_006135	<i>CAPZA1</i>	Yes	Yes
NM_018835	<i>RC3H2</i>	Yes	No
NM_144596	<i>TTC8</i>	Yes	No
NM_002227	<i>JAK1</i>	No	Yes
NM_014352	<i>POU2F3</i>	Yes	Yes
NM_004923	<i>MTL5</i>	Yes	Yes
NM_003406	<i>YWHAZ</i>	Yes	Yes
NM_001007074	<i>RPL32</i>	Yes	Yes
NM_033407	<i>DOCK7</i>	Yes	No
NM_001686	<i>ATP5B</i>	Yes	Yes
NM_017688	<i>BSPRY</i>	Yes	Yes
NM_000979	<i>RPL18</i>	Yes	No
NM_005056	<i>JARID1A</i>	No	Yes
NM_020675	<i>SPC25</i>	Yes	Yes
NM_004371	<i>COPA</i>	Yes	No
NM_012420	<i>IFT5</i>	Yes	Yes
NM_019606	<i>MEPCE</i>	Yes	Yes
NM_015091	<i>EAM179B</i>	Yes	Yes
NM_014612	<i>FAM120A</i>	Yes	No
NM_139266	<i>STAT1</i>	Yes	Yes
NM_014969	<i>WDR47</i>	Yes	Yes
NM_006004	<i>UQCRRH</i>	Yes	Yes
NM_006819	<i>STIP1</i>	Yes	Yes
NM_004487	<i>GOLGB1</i>	Yes	Yes
NM_002421	<i>MMP1</i>	No	No
NM_006603	<i>STAG2</i>	Yes	Yes
NM_015340	<i>LARS2</i>	Yes	Yes
NM_000602	<i>SERPINE1</i>	No	Yes
NM_198076	<i>FAM36A</i>	Yes	Yes
NM_003746	<i>DYNLL1</i>	Yes	Yes
NM_005782	<i>THOC4</i>	Yes	Yes
NM_018660	<i>ZNF395</i>	Yes	Yes
NM_003792	<i>EDF1</i>	Yes	Yes
NM_005381	<i>NCL</i>	Yes	Yes
NM_005762	<i>TRIM28</i>	Yes	Yes
NM_002231	<i>CD82</i>	Yes	Yes
NM_002797	<i>PSMB5</i>	No	Yes
NM_001748	<i>CAPN2</i>	Yes	No
NM_001009925	<i>C20orf30</i>	Yes	Yes
NM_000646	<i>AGL</i>	Yes	Yes
NM_183356	<i>ASNS</i>	Yes	Yes
NM_005100	<i>AKAP12</i>	Yes	Yes
NM_006421	<i>ARFGEF1</i>	Yes	No
NM_198829	<i>RAC1</i>	Yes	Yes
NM_006931	<i>SLC2A3</i>	No	Yes
NM_000366	<i>TPM1</i>	Yes	Yes
NM_005365	<i>MAGEA9</i>	No	Yes
NM_006815	<i>TMED2</i>	Yes	Yes
NM_022754	<i>SFXN1</i>	Yes	Yes
NM_004755	<i>RPS6KA5</i>	Yes	Yes
NM_015382	<i>HECTD1</i>	Yes	No
NM_005243	<i>EWSR1</i>	Yes	Yes

**Table W1.** (continued)

Sequence	Official Symbol	CpG Island	Spotted in Array
NM_004130	<i>GYG1</i>	Yes	Yes
NM_153649	<i>TPM3</i>	Yes	Yes
NM_021101	<i>CLDN</i>	Yes	Yes
NM_006549	<i>CAMKK2</i>	Yes	Yes
NM_001175	<i>ARHGDI1B</i>	No	Yes
NM_002673	<i>PLXNB1</i>	Yes	Yes
NM_198147	<i>LOC116236</i>	Yes	Yes
NM_014758	<i>SNX19</i>	Yes	Yes
NM_016565	<i>CHCHD8</i>	Yes	Yes
NM_020914	<i>RNF213</i>	Yes	No
NM_000576	<i>IL1B</i>	No	Yes
NM_005388	<i>PDCL</i>	Yes	No
NM_001080	<i>ALDH5A1</i>	Yes	Yes
NM_014611	<i>MDN1</i>	Yes	No
NM_015509	<i>NECAP1</i>	Yes	Yes
NM_003932	<i>STI3</i>	Yes	Yes
NM_002274	<i>KRT13</i>	No	Yes
NM_005789	<i>PSME3</i>	Yes	Yes
NM_182972	<i>IRF2BP2</i>	Yes	No
NM_004859	<i>CLTC</i>	Yes	Yes
NM_133337	<i>FER1L3</i>	Yes	Yes
NM_178868	<i>CMTM8</i>	Yes	Yes
NM_018043	<i>ANO1</i>	Yes	Yes
NM_003405	<i>YWHAH</i>	Yes	Yes
NM_016816	<i>OAS1</i>	Yes	Yes
NM_001457	<i>FLNB</i>	Yes	Yes
NM_003670	<i>BHLHB2</i>	Yes	Yes
NM_014014	<i>ASCC3L1</i>	Yes	No
NM_002094	<i>GSPT1</i>	Yes	No
NM_002080	<i>GOT2</i>	Yes	Yes
NM_005113	<i>GOLGA5</i>	Yes	Yes
NM_032547	<i>SCOC</i>	Yes	Yes
NM_000526	<i>KRT14</i>	No	No
NM_203459	<i>CAMSAP1L</i>	Yes	Yes
NM_030920	<i>ANP32E</i>	Yes	Yes
NM_015575	<i>GIGYF2</i>	Yes	Yes
NM_005744	<i>ARIH1</i>	Yes	Yes
NM_032565	<i>EBPL</i>	Yes	Yes
NM_177423	<i>PPFIA1</i>	Yes	Yes
NM_000989	<i>RPL30</i>	Yes	Yes
NM_014752	<i>SPCS2</i>	Yes	Yes
NM_201517	<i>H2AFV</i>	Yes	Yes
XM_031689	—	Yes	Yes
NM_031430	<i>RILP</i>	Yes	No
NM_213646	<i>WARS</i>	Yes	No
NM_001975	<i>ENO2</i>	Yes	No
NM_032940	<i>POLR2C</i>	Yes	Yes
NM_032366	<i>C16orf13</i>	Yes	Yes
NM_024881	<i>SLC35E1</i>	Yes	Yes
NM_005389	<i>PCMT1</i>	Yes	Yes
NM_020899	<i>ZBTB4</i>	Yes	Yes
NM_002822	<i>TWFI</i>	Yes	Yes
NM_016582	<i>SLC15A3</i>	Yes	Yes
NM_016286	<i>DCXR</i>	Yes	Yes
NM_001614	<i>ACTG1</i>	Yes	Yes
NM_001878	<i>CRABP2</i>	Yes	Yes
NM_144570	<i>HN1L</i>	Yes	Yes
NM_002272	<i>KRT4</i>	No	Yes
NM_001539	<i>DNAJAI</i>	Yes	Yes
NM_018156	<i>VPS13D</i>	Yes	Yes
NM_001005340	<i>GPNMB</i>	Yes	Yes
NM_003039	<i>SLC2A5</i>	Yes	Yes
NM_003467	<i>CXCR4</i>	Yes	Yes
NM_000661	<i>RPL9</i>	Yes	Yes
NM_014831	<i>LBA1</i>	Yes	No
NM_017830	<i>OCLAD1</i>	Yes	Yes
NM_007146	<i>VEZF1</i>	Yes	Yes
NM_016091	<i>EIF3EIP</i>	Yes	Yes
NM_001331	<i>CTNND</i>	Yes	No
NM_013230	<i>CD24</i>	Yes	Yes
NM_005556	<i>KRT7</i>	Yes	Yes
NM_002211	<i>ITGB1</i>	Yes	No
NM_031899	<i>GORASP1</i>	Yes	Yes

Table W1. (continued)

Sequence	Official Symbol	CpG Island	Spotted in Array
NM_003972	<i>BTAF1</i>	Yes	Yes
NM_016284	<i>CNOT1</i>	Yes	Yes
NM_006362	<i>NOX1</i>	Yes	Yes
NM_006018	<i>GPR109B</i>	No	Yes
NM_181777	<i>UBE2A</i>	Yes	Yes
NM_006306	<i>SMC1A</i>	Yes	Yes
NM_013236	<i>ATXN10</i>	Yes	Yes
NM_015384	<i>NIPBL</i>	Yes	Yes
NM_002828	<i>PTPN2</i>	Yes	No
NM_018127	<i>ELAC2</i>	Yes	Yes
NM_002880	<i>RAF1</i>	Yes	Yes
NM_001008493	<i>ENAH</i>	Yes	Yes
NM_025137	<i>SPG11</i>	Yes	Yes
BC038574	—	Yes	Yes
NM_003376	<i>VEGFA</i>	Yes	No
NM_001025	<i>RIS21</i>	Yes	No
CV571660	—	Yes	Yes
CV411881	—	Yes	Yes
AL523333	—	Yes	Yes
NM_005121	<i>MED13</i>	Yes	Yes
NM_016072	<i>GOLT1B</i>	Yes	Yes
NM_004966	<i>HNRPF</i>	Yes	Yes
NM_015630	<i>EPC2</i>	Yes	Yes
NM_001002857	<i>ANXA2</i>	Yes	Yes
NM_016520	<i>C9orf78</i>	Yes	Yes
NM_006472	<i>TXNIP</i>	No	Yes
NM_003324	<i>TULP3</i>	Yes	Yes
NM_201281	<i>MTMR2</i>	Yes	Yes
NM_006796	<i>AFG3L2</i>	Yes	Yes
NM_005358	<i>LMO7</i>	Yes	Yes
BC027471	—	Yes	Yes
BM685726	—	Yes	Yes
NM_182926	<i>KTNI</i>	Yes	Yes
NM_001087	<i>AAMP</i>	Yes	Yes
NM_001008844	<i>DSP</i>	Yes	Yes
AW105461	—	Yes	Yes

Table W2. Validation of Gene Expression Reactivation by qRT-PCR in 5Aza-dC-Treated HNSCC Cell Lines.

Official Symbol	Cell Lines			
	FuDu	UM-SCC-14A	UM-SCC-17A	UM-SCC-38A
<i>AAMP</i>	1.7	1.7	ND	ND
<i>ACTG1</i>	ND	ND	0.8	0.6
<i>AFG3L2</i>	ND	ND	1.0	0.5
<i>ASNS</i>	ND	ND	1.1	0.3
<i>AIP5E</i>	0.8	1.7	1.6	ND
<i>ATXN10</i>	ND	ND	0.9	0.4
<i>CAPZA1</i>	ND	2.5	1.7	ND
<i>CLDN1</i>	1.9	2.4	ND	ND
<i>CRABP2</i>	4.6	1.9	1.7	0.4
<i>DCNR</i>	ND	ND	1.3	1.1
<i>EFE3FIP</i>	ND	ND	1.0	0.8
<i>EPC2</i>	1.3	ND	ND	0.7
<i>MEPCE</i>	0.9	ND	1.5	1.7
<i>GOT2</i>	0.6	1.1	ND	ND
<i>HNRPF</i>	ND	ND	0.8	0.5
<i>KTNI</i>	ND	ND	1.2	2.7
<i>MED13</i>	1.3	1.8	ND	ND
<i>MDC1</i>	22.4	4.5	ND	0.2
<i>OCJAD1</i>	1.1	ND	1.4	0.7
<i>PCMT1</i>	0.9	ND	1.2	ND
<i>PERP</i>	2.1	1.7	ND	ND
<i>PLXNB1</i>	1.8	ND	ND	0.3
<i>PSME3</i>	ND	ND	1.0	0.6
<i>RAC1</i>	1.3	ND	1.1	ND
<i>RAF1</i>	ND	ND	1.2	1.1
<i>RPL30</i>	ND	1.3	1.1	0.6
<i>SFXN1</i>	0.7	ND	1.3	0.6
<i>SLC15A3</i>	7.3	2.2	1.0	3.0
<i>SPG11</i>	1.0	2.0	1.0	ND
<i>STAG2</i>	1.4	ND	1.9	1.8
<i>THOC4</i>	ND	ND	0.8	0.8
<i>TNRC15</i>	0.8	ND	ND	0.7
<i>UQCRI1</i>	ND	1.6	1.3	ND
<i>WDR47</i>	1.5	ND	1.6	0.4
<i>YWHAH</i>	ND	ND	0.9	1.0

ND indicates not determined.

**Table W3.** Distribution of the HNSCC Cases According to Demographic, Lifestyle, and Clinicopathological Variables.

Variables	Category	TMA, n (%)	MSR, n (%)
Age	≤53	14 (19.18)	51 (36.43)
	>53	59 (80.82)	89 (63.57)
Tumor site	Oral cavity	23 (30.67)	64 (45.71)
	Larynx	31 (41.33)	24 (17.14)
	Hypopharynx	21 (28.00)	52 (37.14)
Tumor size	T1 + T2	22 (33.85)	34 (25.37)
	T3 + T4	43 (66.15)	100 (74.63)
Lymph nodes	N0	8 (11.43)	26 (19.40)
	N+	62 (88.57)	108 (80.60)
Grade	1	25 (34.24)	36 (27.48)
	2	41 (56.16)	77 (58.78)
	3	7 (9.60)	18 (13.74)
Vascular invasion	No	57 (79.17)	115 (86.47)
	Yes	15 (20.83)	18 (13.53)
Lymphatic permeation	No	46 (65.89)	87 (64.93)
	Yes	26 (36.11)	47 (35.07)
Perineural infiltration	No	40 (55.56)	69 (51.88)
	Yes	32 (44.44)	64 (48.12)

**Table W4.** Sequence and Concentration of the Primer Pairs Used in the qRT-PCR Validation of Gene Induction.

Official Symbol	Sense	Sequence (5' → 3')	μM
<i>AAMP</i>	Forward	CACCTTTGCATTGCACTCAG	0.4
	Reverse	TATGGCTTGACACATCAAG	
<i>ACTG1</i>	Forward	AGCCTTCTTCTGGGTATG	0.5
	Reverse	TGTTGGGGTACAGGTCTTTG	
<i>AFGJL2</i>	Forward	ACGAGGTGGCAAGAAAGATG	0.4
	Reverse	ATGACTCCACCCAGAACAG	
<i>ASNS</i>	Forward	AAGACAGCCCGATTACTG	0.5
	Reverse	AGAGCCTGAATGCCCTTCTC	
<i>ATP5E</i>	Forward	TGGCAGCAAGTAAAAATTG	0.4
	Reverse	ACATGTGCCCACACATCTTC	
<i>ATXN10</i>	Forward	GCGAGTGGAACAGGAATCTC	0.5
	Reverse	AGTTCTGGGAAAGCATGCAC	
<i>CAPZA1</i>	Forward	TCGGATGAGGAGAAGGTACG	0.5
	Reverse	CCCTTCCCTGAGGAGATTG	
<i>CLDN1</i>	Forward	GGTGCAGAGATGAGGATGG	0.4
	Reverse	CATTGACTGGGGTCATAGGG	
<i>CRABP2</i>	Forward	GACCTCGTGGACCAGAGAACTG	0.4
	Reverse	CCTGGTGCACAAACGTCAT	
<i>DCXR</i>	Forward	GGCCTTTGACAGATCCCTTTG	0.5
	Reverse	AGCACTGGCTGGAGACATTC	
<i>EIF3E1P</i>	Forward	ACTACCAGGCATCAAGGTG	0.5
	Reverse	GATGCAATCTGGTAAACGAC	
<i>EPC2</i>	Forward	GCAAGGACATGCCTGATCTC	0.4
	Reverse	TTGCTGTGCTGAAATTGCTC	
<i>GOT2</i>	Forward	AATGTTTGCTCTGCCAATC	0.4
	Reverse	CATCCGATCTTTGCAGAC	
<i>HNRPF</i>	Forward	GCCTGGTAGCAACAGAAACC	0.5
	Reverse	CAGGTGATCTTGGGTGTGG	
<i>KTNI</i>	Forward	GTTTCCOCAGAAACGGAGTC	0.5
	Reverse	TGTGAGCTGTGGTTTACC	
<i>MED13</i>	Forward	TGAAGAGCATATCAACCCTTGC	0.4
	Reverse	TTGAATGGCTGTCCCTGAGAG	
<i>MEPCE</i>	Forward	CAACCCTGGTGGTGTGTATG	0.4
	Reverse	CTGGCTTCAATTTGGATTTG	
<i>MX1</i>	Forward	CAATCAGCTGTGACATTG	0.4
	Reverse	TGTCTCCTGCTCTGGATG	
<i>OCLAD1</i>	Forward	GAATGGAGGGCTGATTTTC	0.4
	Reverse	TGCATCTGGGAAGACTCTC	
<i>PCMT1</i>	Forward	CTACAGACCCTCCACTATG	0.6
	Reverse	GGAGCACTGATTGTGCTTG	
<i>PERP</i>	Forward	TACGAGGAGGGCTGTGAGAG	0.4
	Reverse	GGCGAAGAAGGAGAGGATG	
<i>PLXNB1</i>	Forward	TGGTTGCAAGCCATCAGAG	0.4
	Reverse	CTCTTGAGGAGGGTCTGG	
<i>PSME3</i>	Forward	CCAAGGAACCAAGGTGTTTG	0.5
	Reverse	TGGGAATCAGGAGCTGTACC	
<i>RAC1</i>	Forward	TGCTTTTCCTCTGTGAGTCC	0.4
	Reverse	ATGGAGTGTGGGACAGTG	
<i>RAF1</i>	Forward	GCCGAAGAAGCAAGAACAG	0.5
	Reverse	AACACTGCACAGCACTCTGG	
<i>RPL30</i>	Forward	CCTGGGGTACAGCAGACTC	0.4
	Reverse	TGATGGACACCAGTTTAGCC	
<i>SFXN1</i>	Forward	GCAAGTTGTGTTGCCAGGATT	0.6
	Reverse	TTTCCAAAGTGTTCATAATGAATGG	
<i>SLC15A3</i>	Forward	AAGCTCGCTTCCAAAACCTG	0.4
	Reverse	GCACATGACGGTCTCTGG	
<i>SPG11</i>	Forward	TCTCCCAGGATAAGTCCAG	0.4
	Reverse	GAGGGCTTCAGGGGAAIATG	
<i>STAG2</i>	Forward	AAACCAAAGCAAGGCAAAG	0.4
	Reverse	GGTTTTCCTCTCCATTTCC	
<i>THOC4</i>	Forward	CTCAGACGCGATATTCAGG	0.5
	Reverse	CTCAAAGTGACAGTCTGCTG	
<i>TNRC15</i>	Forward	CTCCAGGAGGAACCCCTTC	0.6
	Reverse	TCCTCCTGTCCTGTCAATC	
<i>UQCRH</i>	Forward	CGGAGGAGCTCTTTGACTTG	0.5
	Reverse	TGOCAGATGATGAAGACTG	
<i>WDR47</i>	Forward	CCAGGGGTACAAAACCTCAG	0.4
	Reverse	GATAGGCCTCTGTGCATCAAC	
<i>YWHAH</i>	Forward	GCCGTGACAGAGCTGAATG	0.5
	Reverse	TGGTTTCTGCTCAATGCTG	

## ***DISCUSSÃO***

---

## DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum, representando 6% de todos os casos e sendo responsável por uma estimativa de 650.000 novos casos e 350.000 mortes por câncer mundialmente todos os anos (Parkin *et al.*, 2005). Apesar dos avanços na cirurgia, radiação e quimioterapia, a taxa de sobrevivência de 5 anos para o câncer de cabeça e pescoço não tem melhorado significativamente ao longo das últimas décadas, sendo que a taxa permanece em torno de 60% (Howe *et al.*, 2006). Um reconhecimento precoce dos sintomas e sinais de câncer de cabeça e pescoço é importante para um rápido diagnóstico. Elucidações adicionais dos eventos moleculares no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço poderiam acelerar o desenvolvimento de novos agentes potencialmente eficientes e identificação de biomarcadores, que poderia otimizar o tratamento. A metilação do DNA tem provado ser um marcador valioso para estratégias de detecção de câncer e no prognóstico da doença. Ainda, muitas das oportunidades fornecidas pela metilação do DNA para detecção precoce e monitoramento cuidadoso da doença ainda não foi transformado em uma prática clínica.

O tratamento com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina em combinação com inibidores de desacetilases tem sido amplamente utilizado para reativar genes epigeneticamente silenciados em linhagens celulares de vários tipos de tumores. Embora esta abordagem possa levar a efeitos secundários na expressão dos genes, parece ser bem eficiente comparado a estratégias alternativas na qual *arrays* de ilhas CpGs são hibridizados com digestão do DNA genômico

com enzimas de restrição sensíveis a metilação, uma vez que isto sugere diretamente a ativação da expressão dos genes em vez da presença de uma ilha CpG.

Neste estudo foi utilizado 5'-AZA-dC para identificar genes supostamente silenciados por metilação do DNA. Os inibidores de desacetilases de histonas não foram utilizados uma vez que estudos anteriores que empregaram estratégias similares demonstraram que a maioria dos genes são reativados por um tratamento com altas concentrações de 5'-AZA-dC e somente um pequeno subgrupo de genes são induzidos pelo tratamento sinérgico com agentes desmetilantes e inibidores de desacetilases.

Para avaliar mudanças na expressão gênica induzidas por 5'-AZA-dC, foi realizado uma combinação de análises de *RaSH* e *cDNA microarray*. A metodologia de *RaSH* (*Rapid Subtraction Hybridization*) tem sido utilizada na identificação de genes diferencialmente expressos em diversos tipos de tumores (Jiang *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2005; Boukerche *et al.*, 2007) e no presente estudo, ela foi utilizada com o intuito de enriquecer o *cDNA microarray* para genes reativados e não limitar as análises para um grupo de genes pré-definidos representados em *arrays* comerciais. Foram identificados, por meio da técnica de *RaSH*, 415 genes conhecidos nos quais somente 65 estavam presentes em ambas as bibliotecas de *RaSH* (linhagem celular FaDu tratada e não tratada com 5'-AZA-dC), o que indicou uma alta eficiência de subtração.

Também foi identificado 181 genes supostamente induzidos por 5'-AZA-dC na linhagem FaDu, sendo 151 destes genes foram espotados na plataforma de

*microarray* e analisados para a reativação gênica em mais três linhagens de câncer de cabeça e pescoço. Não houve a possibilidade de esgotar os 181 genes nas membranas de *microarrays*, pois alguns genes apresentaram problemas em alguma das etapas do procedimento para a construção das membranas de *microarrays*. Portanto, utilizando uma abordagem de combinação dos resultados por meio de *RaSH* e *microarrays*, foram identificados 78 genes com expressão induzida após o tratamento com 5'-AZA-dC e 35 destes genes foram selecionados para validação técnica por meio de PCR em tempo real por serem induzidos em, pelo menos, duas das linhagens celulares analisadas e por apresentarem ilhas CpG na região 5'.

Após validação, foram selecionados três genes (*CRABP2*, *MXI* e *SLC15A3*) que, analisados por meio da técnica de PCR em tempo real, apresentaram um maior nível de expressão, de pelo menos três vezes, nas linhagens FaDu, UM-SCC-14A e UM-SCC-38A após o tratamento com o agente desmetilante quando comparadas as mesmas antes do tratamento com o agente desmetilante, sugerindo que a metilação poderia estar atuando na regulação da expressão destes genes. Entretanto, apenas os genes *CRABP2* e *MXI* confirmaram a hipótese de que, de fato, a hipermetilação estava atuando na regulação da expressão destes genes nas linhagens celulares analisadas.

No presente estudo, observou-se que o gene *CRABP2* apresentou uma expressão aumentada na linhagem celular FaDu após o tratamento com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitina, indicando que este gene poderia ter sua expressão regulada por metilação. Foi realizada a análise do perfil de metilação da

região promotora do gene por meio de seqüenciamento da ilha CpG presente em sua região promotora e por meio da análise das temperaturas da curva de dissociação do PCR em tempo real. Observou-se a hipermetilação da região promotora do gene *CRABP2* na linhagem FaDu antes do tratamento com uma porcentagem de metilação global da ilha CpG na região promotora de 40% comparado a 5% após o tratamento com o agente desmetilante. A ilha CpG da região promotora do gene *CRABP2* possui 1796 pares de bases e foi analisado o perfil de metilação de 22 dinucleotídeos CpG contidos em 333 pares de bases seqüenciados na linhagem FaDu antes e após o tratamento. Por meio das ferramentas de bioinformática TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=WELCOME>) e AliBaba2.1 (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html?>) pode-se prever que esta região possui mais de 35 sítios de ligação a fatores de transcrição, entre eles o sítio de ligação para o fator de transcrição Sp1.

Interessantemente, os dinucleotídeos CpGs correspondentes aos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 tornaram-se desmetilados após o tratamento com 5'-AZA-2'-deoxicitidina. Um dos mecanismos propostos para explicar como a metilação do DNA poderia inibir a transcrição gênica sugere que a metilação dos resíduos de citosina poderia impedir a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios de ligação (Comb e Goodman, 1990; Prendergast *et al.*, 1991). Como muitos fatores de transcrição dos mamíferos (*E2F*, *GATA1*, *GATA4*, *CREB*, *USF*, por exemplo) apresentam sítios de ligação no DNA ricos em CpG, a metilação ocorreria nestes sítios e impediria a ligação destes fatores ao DNA e dessa forma

inibiria a transcrição. Kitasawa e col. e Mancini e col. mostraram que a metilação de CpG presentes nos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 ou adjacentes ao mesmo diminuem a eficiência de ligação deste fator ao DNA e a atividade deste fator (Kitazawa *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 2003). Entretanto, outros trabalhos mostraram que a metilação presentes nos sítios de ligação do fator Sp1 não interferem na ligação deste fator ao gene (Holler *et al.*, 1988; Ohtani-Fujita *et al.*, 1993). Assim, parece que o mecanismo de silenciamento por metilação depende do tipo de célula, do fator de transcrição ou do estímulo recebido.

Também foi realizada análise de hipermetilação na linhagem FaDu antes e após o tratamento por meio da técnica de MSP-PCR onde foram utilizados dois pares de primers (R1 e R2) que amplificavam regiões diferentes da região promotora do gene *CRABP2*. Notou-se a presença de hipermetilação na linhagem FaDu antes do tratamento quando utilizados os dois pares de primers. Já na linhagem FaDu após o tratamento com o agente desmetilante foi detectado hipermetilação na região promotora do gene *CRABP2* apenas quando utilizou-se o par de primers R1. Este resultado é um pouco discrepante quando comparado com o seqüenciamento da linhagem FaDu antes e após o tratamento. Porém, provavelmente detectou-se a hipermetilação da região promotora do gene *CRABP2* na linhagem FaDu após o tratamento quando foi empregada a técnica de MSP-PCR pois esta técnica é muito sensível, permitindo a detecção de uma cópia gênica metilada em 1000 cópias não metiladas (Herman *et al.*, 1996).

A hipermetilação do gene *CRABP2* foi detectado em 56.4% das amostras quando analisadas com o primer R1 e 10% das amostras quando analisadas com o primer R2. Este é um dado muito interessante, pois não há dados prévios na literatura sobre metilação do gene *CRABP2* em tumores, sendo encontrado apenas um estudo de Park e col. que observaram a hipermetilação do gene *CRABP2* em linhagem celular de pulmão (Park *et al.*, 2008).

É interessante notar que a frequência de metilação na região promotora do gene *CRABP2* é quase seis vezes maior quando utilizado o primer R1 quando comparado com a frequência de metilação utilizando-se o primer R2. Esta observação corrobora com estudo de Homma e col. que observaram frequências de metilação diferentes quando analisados a metilação por meio da técnica de MSP-PCR em regiões diferentes do promotor do gene *RUNX3* (Homma *et al.*, 2006).

O primer R1 do promotor do gene *CRABP2* localiza-se em uma região mais próxima ao sítio de início de transcrição, com mais de três sítios de ligação ao fator de transcrição Sp1 e foi a região que apresentou um maior número de dinucleotídeos CpGs metilados quando foi seqüenciada a região promotora do gene *CRABP2* na linhagem celular FaDu sem o tratamento com o agente desmetilante. Sugere-se que esta região apresentou uma maior densidade de CpGs metilados pois segundo Leonhardt (1992) uma vez que os sítios CpGs dentro de sinais cis-atuantes são metilados, eles podem atuar como pontos para uma segunda forma de metilação de novo, que se espalha para os sítios distais. Depois de um sítio CpG se tornar metilado via “espalhamento”, esta modificação

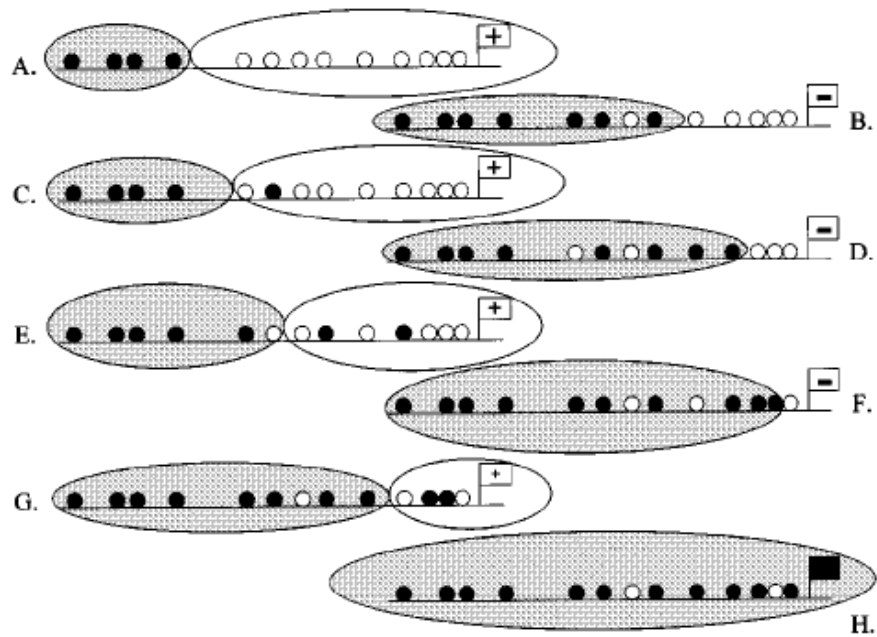
é preservada via manutenção da metilação que envolve a marcação da DNMT1 ao DNA hemimetilado logo após a replicação (Leonhardt *et al.*, 1992). Enquanto o fenômeno do “espalhamento” não tem sido definido mecanicamente e nem se sabe ainda como este fenômeno inicia-se, sugere-se que isto representa uma interação auto-perpetuante entre as proteínas modificantes de cromatina e a metilação do DNA. De acordo com esta visão, a metilação do DNA fecha a cromatina via atração de complexos repressivos. A presença deste complexo, por sua vez, irá alterar a cromatina próxima tornando-a acessível ao espalhamento da metilação. O efeito de rede desta interação é o espalhamento gradual da metilação ao longo da molécula de DNA até isto tornar-se uma força oponente a forma da cromatina aberta e ativa (Bird e Wolffe, 1999).

Turker especula que o silenciamento inicia-se com um descréscimo dramático, embora incompleto e ainda indefinido, na transcrição que poderia resultar de perturbações espontâneas na expressão atuando ao nível de alelos individuais, induzidas pelo meio ambiente ou relacionadas a malignidades. O silenciamento então progride por meio de uma série de passos mutualmente reforçantes que gradualmente reduzem a probabilidade de ligação do fator de transcrição. Por causa da barreira que atua para prevenir a metilação do “espalhamento” em direção ao promotor ser um produto da ligação do fator de transcrição, um cenário caótico se sucede no qual a barreira para o espalhamento da metilação alternadamente desaparece e reaparece. Como resultado a metilação se espalha em direção ao promotor em um processo hesitante, devagar ou até mesmo reverso ocasionalmente quando a ligação ao fator de transcrição ocorre e a

barreira é formada mais uma vez. Ao mesmo tempo, por causa da inter-relação entre a modificação de histona e a metilação do DNA, modificações repressivas se moverão em direção ao promotor, também em um processo reversível e hesitante (Turker, 2002). Ainda, por causa da localização da barreira ser o resultado de uma força e longevidade da ligação do fator de transcrição, que por sua vez pode ser afetado pela proximidade da metilação do DNA, a barreira se desenvolverá cada vez mais perto do promotor cada vez que ela é reformada.

Esta situação gradual criará circunstâncias interessantes, como quando a barreira se forma antes dos sítios CpG metilados. Como um evento temporário permitiria os sítios metilados se tornarem não metilados se a transcrição e o domínio aberto fossem restaurados e mantidos durante a replicação. Entretanto, visto que as barreiras se formam e desaparecem continuamente, não há nenhuma certeza de que um sítio CpG não metilado que está localizado fora do domínio protetor se tornará metilado, ou alternativamente, que um sítio metilado localizado fora do domínio protetor se tornará desmetilado. Ao contrário, visto que a barreira está sendo formada, perdida e formada novamente, há probabilidades crescentes para cada sítio CpG estar sendo metilado quando a barreira é empurrada gradualmente em direção ao promotor, mas isto não é uma garantia. O resultado da rede deste processo contínuo é o avanço gradual da metilação do DNA em direção ao promotor e a formação de alelos com padrões de metilações variados (Figura 7). Durante a progressão do câncer este processo é acelerado pela seleção para alelos com baixos níveis de expressão progressivos por causa da perda da

regulação normal do crescimento celular e, às vezes, as vias de reparos de DNA são críticas para o desenvolvimento de células cancerosas (Turker, 1998).



Legenda: ● CpG metilado    ○ CpG não metilado

Figura 7- O silenciamento como um processo. Um alelo expresso (A) com uma barreira entre o espalhamento da metilação do DNA e a região de cromatina aberta do promotor expressando o gene (bandeira com sinal "+") sofre uma perda dramática na transcrição (bandeira com sinal "-"), que elimina a barreira permitindo que a metilação se espalhe em direção cada vez mais perto do promotor. Uma série de restaurações e perdas da expressão do promotor se sucede (c-g), com o decréscimo dos níveis de transcrição conforme a metilação avança. Finalmente, uma densidade de metilação suficiente e/ou metilação de sítios CpG críticos ocorrem levando a estabilização do silenciamento (h). O produto deste processo é a formação de padrões variados de metilação (Modificado de Turker, 2002).

Também foi observado que a ausência da expressão da proteína CRABP2 foi associada com um pobre prognóstico, uma vez que pacientes cujos tumores foram negativos para expressão da proteína CRABP2 tiveram um risco maior de recorrência loco-regional ou metástases à distância do que aqueles pacientes com tumores positivos para CRABP2. Estes dados sugerem que a ausência da expressão do gene *CRABP2* compromete a ativação da transcrição de vários genes envolvidos com a regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular entre outras funções que quando alteradas conferem as células cancerígenas um perfil invasivo e metastático.

A vitamina A e seus derivados, retinol, retinaldeído e ácido retinóico (RA), conhecidos coletivamente como retinóides, desempenham papéis importantes na embriogênese, diferenciação e homeostase. O retinol, a forma principal da vitamina A, é principalmente armazenada no fígado. Ela é recrutada do fígado através de proteínas ligantes ao retinol do plasma (RBP) e é levada até as células via uma membrana receptora para RBP. Dentro das células, o retinol é oxidado para retinaldeído e subsequentemente para ácido retinóico. Isto é uma forma ativa da vitamina em tecidos não oculares e funciona com um ligante para a família de receptores nucleares controlados por ligantes (Leid *et al.*, 1992; Stunnenberg, 1993; Giguere, 1994).

Os retinóides são hidrofóbicos na natureza e são, portanto, pobremente solúveis em um ambiente aquoso. Para a certificação de um armazenamento apropriado, transporte e aquisição celular dos retinóides, um número de proteínas

ligantes ao retinóide aumentou. O transporte no plasma de retinóide é realizado pela RBP. Em tecidos não oculares, duas classes de proteínas ligantes ao retinóide aumentaram, as proteínas 1 e 2 ligantes ao retinol (*CRBP1/2*) e as proteínas 1 e 2 ligantes ao ácido retinóico celular (*CRABP1/2*) (Donovan *et al.*, 1995).

Os efeitos do ácido retinóico são mediados via duas classes de receptores de ácido retinóico, os RARs ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e os RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Estas proteínas formam complexos heterodiméricos e atuam como fatores de transcrição controlados por ligantes. Na presença do ácido retinóico, estes heterodímeros podem ativar ou suprimir a transcrição de genes que contém um elemento de resposta ao ácido retinóico (RARE) (Stunnenberg, 1993; Giguère, 1994). As relações entre os processos que governam a aquisição celular de retinol e a síntese de ácido retinóico e os receptores de ácido retinóico nuclear são desconhecidos. Entretanto, desde que ambos os *CRABP1* e *2* podem ligar-se ao ácido retinóico eles são candidatos para regular os efeitos do ácido retinóico por controlar a disponibilidade do ácido retinóico para os receptores nucleares.

O ácido retinóico endógeno é sintetizado pela oxidação do retinol pela retinaldeído desidrogenases (RALDHs). Em uma reação reversível, o retinal é sintetizado a partir do retinol (vitamina A) ou pelas aldeído desidrogenases (ADHs) ou redutases/desidrogenases de cadeia curta (RDHs/SDRs). As proteínas ligantes ao retinol celular (CRBPs) se ligam ao retinol, enquanto que as proteínas ligantes ao ácido retinóico (CRABPs) se ligam ao ácido retinóico. Finalmente o ácido retinóico endógeno é degradado pelas enzimas CYP26. O heterodímero RAR/RXR media os efeitos do ácido retinóico; na ausência do ligante (ácido

retinóico), o complexo RAR/RXR é ligado ao DNA e a co-repressores. Este complexo induz a repressão transcricional por meio da desacetilação de histonas. Quando o ligante (ácido retinóico) está presente, o mesmo induz mudanças conformacionais e a ligação de co-ativadores que levam a acetilação de histona e a ativação da transcrição(Marletaz *et al.*, 2006)(Figura 8).

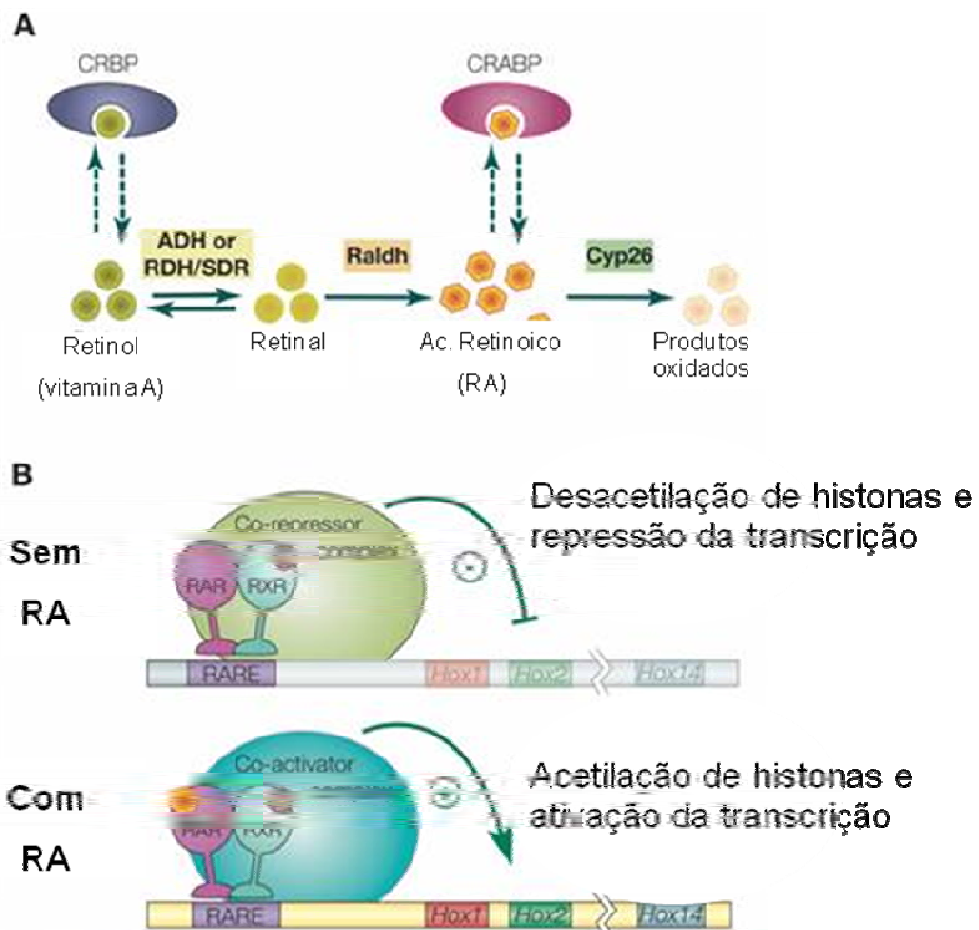


Figura 8 - (A) Síntese, degradação e modo de ação do ácido retinóico (RA). (B) O complexo RAR/RXR é mediado pelos efeitos do RA. (Modificado de Marletaz *et al.*, 2006)

Os *CRABP1* e *2* pertencem a uma família de proteínas ligantes a lipídeos celulares que incluem *CRBP tipo 1 e 2*, *a proteína mielina P2*, *adipócito P2* e várias outras proteínas ligantes aos ácidos graxos. Ambas as CRABPs são proteínas pequenas, cada uma consistindo de 136 aminoácidos com um peso molecular de, aproximadamente, 15-16 kDa. Elas são encontradas em todos os vertebrados e são proteínas altamente conservadas durante a evolução. A seqüência de aminoácido da proteína CRABP1 de camundongo é idêntica a seqüência bovina. Ela é também essencialmente idêntica a seqüência CRABP1 humana com apenas uma reposição nos 136 aminoácidos (Astrom *et al.*, 1991). A proteína CRABP2 é também conservada evolutivamente, com a seqüência humana tendo 94% de identidade com a seqüência do camundongo (Giguere *et al.*, 1990; Astrom *et al.*, 1991). As reposições nos aminoácidos entre duas proteínas CRABP2s de mamíferos são freqüentemente encontradas em resíduos com as cadeias hidrofóbicas, provavelmente virados para o interior das proteínas enquanto que os resíduos hidrofílicos, que estão expostos na superfície, são conservados. As superfícies distintas, mas ainda altamente conservadas das duas proteínas CRABPs implica que ambas as proteínas estão sob forte pressão seletiva e que as duas CRABPs interagem com diferentes proteínas celulares (Donovan *et al.*, 1995).

O gene *CRABP2* é amplamente expresso durante a embriogênese do camundongo. Os níveis de expressão de ambas os *CRABP1* e *CRABP2* variam em tecidos embriogênicos de um modo espaço-temporal e isto é claramente ilustrado nos padrões de sobreposição e complementares às vezes observados. Em adultos, o gene *CRABP2* é predominantemente expresso na pele. Há também tecidos embrionários em desenvolvimento onde o *CRABP2* é expresso e o *CRABP1* não é expresso. Estes tecidos são derivados da endoderme e incluem a faringe, esôfago, epitélio da traquéia e fígado (Ruberte *et al.*, 1992).

Freqüentemente é proposto que as CRABPs servem para solubilizar e proteger seus ligantes no citosol e que elas transportam o ácido retinóico entre os diferentes compartimentos celulares. Sugeriu-se, por exemplo, que as CRABPs atuam de modo a entregar seus ligantes para o núcleo (Takase *et al.*, 1986). De fato, foi demonstrado que ambas as isoformas da CRABP estão presentes não somente no citosol mas também no núcleo das células (Gaub *et al.*, 1998).

Dong e col. observaram que a expressão do *CRABP2* estimulou marcadamente a transativação pelo ácido retinóico e que a proteína CRABP2 entrega o ácido retinóico para o receptor de ácido retinóico por meio de canalização entre as duas proteínas. Além disso, eles também observaram que as interações entre a CRABP2 e RAR resultam em um facilitamento significativo da formação do complexo *RAR-RA* e pode ser a base para o aumento do efeito de CRABP2 na transativação mediada por RAR (Dong *et al.*, 1999).

A vitamina A e alguns de seus análogos (retinóides) são moduladores estabelecidos da diferenciação epitelial celular *in vivo* e *in vitro* (De Luca, 1991;

Jetten *et al.*, 1992). Os retinóides podem inibir o crescimento celular de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço *in vitro* (Lotan, 1994) e *in vivo* (Shalinsky *et al.*, 1995). Uma das principais funções fisiológicas da vitamina A é prevenir a diferenciação escamosa com queratinização de células epiteliais em tecidos não queratinizados. Além disso, os retinóides suprimem a diferenciação de células escamosas que ocorrem espontaneamente ou é induzida por íons de cálcio em cultura normal de queratinócitos ou células traqueais. Estudos com experimentação animal têm demonstrado que os retinóides suprimem a carcinogênese em uma variedade de tecidos epiteliais, incluindo pele, traquéia, pulmão e mucosa oral (Shklar *et al.*, 1980; Moon e Mehta, 1990b; 1990a).

Manor e col. observaram que a expressão do *CRABP2* é essencial para a atividade transcricional de RAR em linhagem de células de carcinoma mamário. Além disso, o *CRABP2* sensibiliza as células mamárias para a inibição do crescimento induzido pelo ácido retinóico (Manor *et al.*, 2003). Neste mesmo estudo, o *CRABP2* também inibiu a tumorigenicidade nas células mamárias em modelo de camundongo. Em outros estudos, usando outros modelos experimentais, foi verificado que os retinóides inibiram o crescimento celular por uma variedade de mecanismos, incluindo indução da diferenciação (Breitman *et al.*, 1981), parada do ciclo celular (Yen *et al.*, 1998), apoptose (Seewaldt *et al.*, 1995) ou pela combinação de efeitos (Jinno *et al.*, 2002).

O exame do efeito do ácido retinóico no perfil de expressão gênica de células MCF-7, realizado por Donato e col. revelaram que vários genes pró-apoptóticos foram super regulados em uma exposição de 4 horas ao ácido

retinóico. Após um curto período de tratamento foi esperado que pelo menos alguns dos genes respondedores fossem alvos diretos para o *RAR*. Adicionalmente, devido a sua habilidade de aumentar a atividade transcricional do *RAR*, pode-se prever que o *CRABP2* aumenta a resposta do ácido retinóico de genes que estão sob controle direto do *RAR*. Mostrou-se que a caspase 9 é, de fato, um alvo direto do *RAR* e que a indução aumenta com a super expressão do *CRABP2*. Estas observações compreendem a primeira demonstração que o *CRABP2* aumenta a ativação mediada por *RAR* é induzida por RA de gene endógeno (Donato e Noy, 2005).

O gene *CRABP2*, por meio do transporte de ácido retinóico e ligação do mesmo ao complexo *RAR/RXR* ao *RARE* ativam vários genes que desempenham papéis na diferenciação, indução a apoptose e proliferação celular. Donato e col. sugerem que o *CRABP2* desempenha atividades de supressor de tumor por meio de duas funções biológicas separadas: o papel conhecido desta proteína na entrega direta do ácido retinóico para o *RAR* e outra função, independente de RA, embora esta função adicional do *CRABP2* ainda não esteja esclarecida (Donato e Noy, 2005). Neste mesmo estudo também foi notado que embora o gene *CRABP2* desempenhe atividades pró apoptóticas, ele não induz a apoptose por si só. O gene *CRABP2* sensibiliza as células para apoptose, cooperando com outros agentes apoptóticos para permitir uma indução mais eficiente da morte celular. Atualmente sabe-se que 532 genes estão sob a regulação da via do ácido retinóico e Balmer e col. estimaram que 27 genes são, indiscutivelmente, controlados através da via clássica do ácido retinóico em vários contextos celulares (Balmer e

Blomhoff, 2002). Entre esses genes estão o *EGR1* (supressor de tumor) e o gene *ETS1* (regula genes envolvidos na senescência, morte e tumorigênese).

A ilha CpG da região promotora do gene *MXI* possui 738 pares de bases onde foi analisado o perfil de metilação de 78 dinucleotídeos CpGs nas linhagens FaDu e UM-SCC-14A antes e após o tratamento com o agente desmetilante. Uma redução menos pronunciada no nível de metilação da região 5' do gene *MXI* foi observada na linhagem FaDu (de 27.7 para 12.7%) e na linhagem UM-SCC-14A (de 7.8 para 1.02%). A redução estava limitada aos nucleotídeos 39 a 56 localizados dentro do primeiro éxon do gene *MXI*. A redução nos níveis de metilação destes dinucleotídeos específicos foram diretamente correlacionados com a indução da expressão gênica após o tratamento observado nestas linhagens celulares corroborando com os resultados das análises de expressão deste gene nas linhagens após o tratamento com o agente desmetilante (22.4 “fold” para FaDu e 4.5 para UM-SCC-14A), sugerindo que este dinucleotídeos desempenham uma papel crítico na regulação da transcrição.

Na linhagem FaDu observou-se que alguns dinucleotídeos CpGs, na maioria dos clones, ainda continuaram metilados após o tratamento com o agente desmetilante embora a expressão gênica do *MXI* fosse recuperada. Este fato também já foi observado em outros estudos quando analisados outros genes em linhagens celulares de diferentes sítios anatômicos. Por exemplo, Arai e col. obtiveram resultados semelhantes a este estudo quando analisaram os dinucleotídeos CpGs da região promotora dos genes *CSTL2*, *NEMSI*, *FABP5* e *GADD45A* por meio de seqüenciamento de DNA em linhagens de carcinomas de

células escamosas de esôfago (TE-1, TE-2 e TE-10) e Moriguchi e col. também obtiveram uma desmetilação parcial do dinucleotídeos da região promotora do gene *TUBB6* em linhagem celular de câncer gástrico (AGS) (Moriguchi *et al.*, 2007; Arai *et al.*, 2008). Kass e col. observaram que o DNA metilado pode ser transcrito na ausência de proteínas ligantes ao DNA metilado (Kass *et al.*, 1997).

Embora neste estudo não tenha sido possível a realização do estudo de alterações epigenéticas nas histonas por meio de ChiP (Imunoprecipitação de cromatina), sugere-se que a depleção da metilação do DNA nas células após o tratamento com o agente desmetilante poderia induzir a expressão gênica embora as cromatinas destas células não retornem ao estado totalmente eucromático como observado em um gene normalmente transcrito. Neste estado intermediário, os sítios CpGs estão parcialmente desmetilados, as histonas contêm marcas de ativação transcricional como K4me2 e K9/K14ac e o Hp1 não está presente. Entretanto, várias modificações repressivas ainda permanecem e aparentemente não precisam mudar para a transcrição ocorrer. As histonas que retém esta mistura de marcas de cromatina ativas e repressivas permanecem com um arranjo nucleossomal compactado (Figura 9). (Mcgarvey *et al.*, 2006).

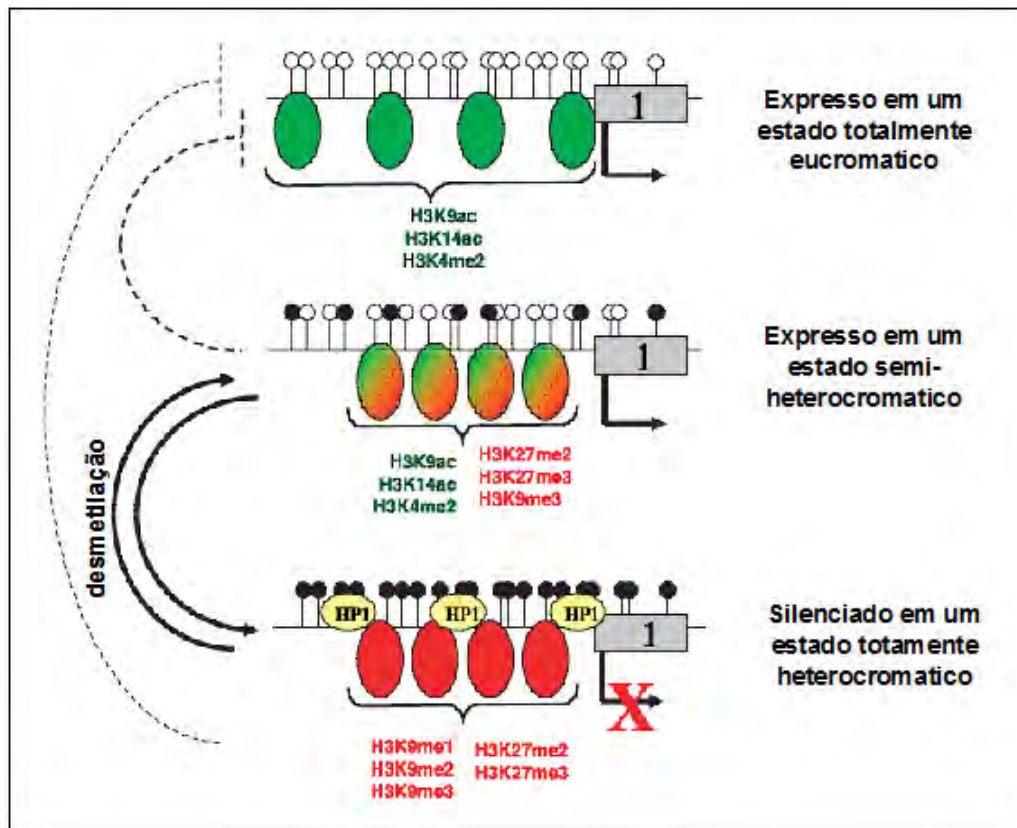


Figura 9- Modelo dos estados de cromatina para os genes nas células cancerosas. No modelo acima, o gene ativamente transcrito não mostra metilação do DNA na região promotora (pequenos círculos brancos) e a H3 é preferencialmente modificada com marcas de cromatina ativa. As histonas carregando essas marcas de cromatina ativas (círculos ovais verdes) estão amplamente dispersas, fornecendo um arranjo de cromatina aberta favorável para a transcrição ativa. Inversamente, no modelo da parte de baixo da figura, o promotor do gene hipermetilado (círculos ovais pretos) e silenciado (seta preta com um X vermelho) está associado com histonas organizadas em uma configuração nucleossômica mais compacta típica de promotores de genes reprimidos transcricionalmente. No modelo do meio, a depleção da metilação do DNA pode induzir a expressão gênica (Modificado de Mcgarvey *et al.*, 2006).

As proteínas Mx compreendem uma pequena família de GTPases. As células de camundongos expressam proteínas Mx nucleares assim como citoplasmáticas, enquanto a maioria das outras espécies de vertebrados expressa proteínas Mx que se acumulam exclusivamente no citoplasma de células tratadas com interferon. Inicialmente, as proteínas Mx foram descobertas em camundongos A2G que mostravam alto grau de resistência contra infecções por vírus Influenza A (FLUAV) (Lindenmann, 1964). O fenótipo de resistência foi herdado de uma maneira autossômica dominante e foi específica para membros da família ortomixovirus (Lindenmann, 1964).

Um estudo revelou que um único gene, *Mx1* (orthomyxovirus resistance gene 1) foi responsável pelo fenótipo de resistência e que a proteína Mx1 tinha uma atividade antiviral intrínseca (Staheli *et al.*, 1986; Arnheiter *et al.*, 1990). Interessantemente o gene *Mx1* no cromossomo 16 do camundongo passou a pertencer aos genes responsivos ao interferon (ISGs) (Haller *et al.*, 1980). A expressão do gene é normalmente silenciosa, mas é rapidamente induzida por meio da infecção por uma variedade de vírus através da ação de interferons do tipo I (a/b) ou tipo III induzidos por vírus. Estudos mostram que a Mx1 é a principal molécula efetora que protege animais infectados por influenza (Grimm *et al.*, 2007). As proteínas Mx antivirais ativas são encontradas na maioria das espécies de vertebrados incluindo pássaros e peixes. Entretanto, os genes *Mx* são polimórficos na maioria das espécies. As diferenças de aminoácidos resultantes são responsáveis por variações nas atividades antivirais dos produtos dos genes alélicos (Seyama *et al.*, 2006; Nakajima *et al.*, 2007; Palm *et al.*, 2007).

As Mx GTPases diferem das GTPases pequenas e das proteínas G heterotriméricas por possuírem uma massa molecular relativa de aproximadamente 80 kDa, uma relativa baixa afinidade por GTP e uma alta taxa intrínseca de hidrólise de GTP. Estas propriedades são características para membros da superfamília dinamina de GTPases de alto peso molecular (Staehele *et al.*, 1993). As proteínas Mx apresentam um domínio GTPase na região N-terminal, um domínio central interativo (CID) no meio, e um domínio efetor com motivos de zíper de leucina no final C-terminal. A região N-terminal contendo o motivo consenso tripartido ligante a GTP é altamente conservado enquanto que a região C-terminal é divergente (Haller *et al.*, 2007).

Em humanos, o gene *MxA* é um homólogo Mx com atividade antiviral e é codificado pelo gene humano *Mx1* na região do cromossomo 21 que é sintênico com o cromossomo 16 do camundongo (Horisberger *et al.*, 1988). A proteína de camundongo Mx1 e a proteína humana MxA agregam grânulos pontuados no núcleo ou no citoplasma, respectivamente, de células tratadas com interferon. Estudos em culturas de células mostraram que a MxA monomérica (L612K) é rapidamente degradada. Em contraste, o tipo selvagem da proteína MxA é estável, com uma meia vida de mais de 24 horas. Portanto, assume-se que a agregação de proteínas Mx previne sua rápida degradação e fornecem uma forma de armazenamento nas quais moléculas ativas podem ser recrutadas por longos períodos de tempo.

Holzinger e col. observaram que o gene *MxA* é transcricionalmente induzido por interferon através da via JAK/STAT (Holzinger *et al.*, 2007) (Figura

10). Os interferons do tipo 1 (IFN- $\alpha/\beta$ ) constituem a defesa celular primária contra a infecção viral incluindo HCV, da família *Flaviridae*. O interferon ligante a seus receptores ativam as kinases jak1 e Tyk2, que levam à fosforilação e organização de um tradutor de sinal e ativação do complexo trimérico (STAT1)-STAT2-fator regulatório interferon (IRF)9 chamado gene fator 3 estimulado por interferon que transloca para o núcleo e se liga aos elementos de resposta estimulados por interferon (ISRE), levando a indução transcricional de vários genes antivirais, incluindo proteína kinase ativada por RNA dupla fita (*PRK*), 2',5'-oligoadenilato sintetase (*OAS*) e proteína A de resistência a myxovirus (*MxA*) (Dharel *et al.*, 2008).

O promotor do gene *MxA* é sensível a ativação pelos interferons do tipo I e III mas não é responsivo a infecção por vírus. A indução exclusiva da síntese de proteína MxA pelo IFN sugere uma forte restrição a expressão gênica do *MxA* (Holzinger *et al.*, 2007). Efeitos negativos na homeostase normal da célula poderiam ser provocados pelo acúmulo de Mx. Estudos observaram que a superexpressão de *MxA* aumentou a sensibilidade das células ao estímulo apoptótico (Li e Youssoufian, 1997; Mibayashi *et al.*, 2002). Então, sugeriu-se que a regulação positiva de *MxA* é um fator que promove o desenvolvimento da anemia Fanconi, uma desordem que predispõe os pacientes os pacientes a má formações esqueléticas, progressão na falha da produção de medula óssea e leucemia aguda (Li e Youssoufian, 1997).

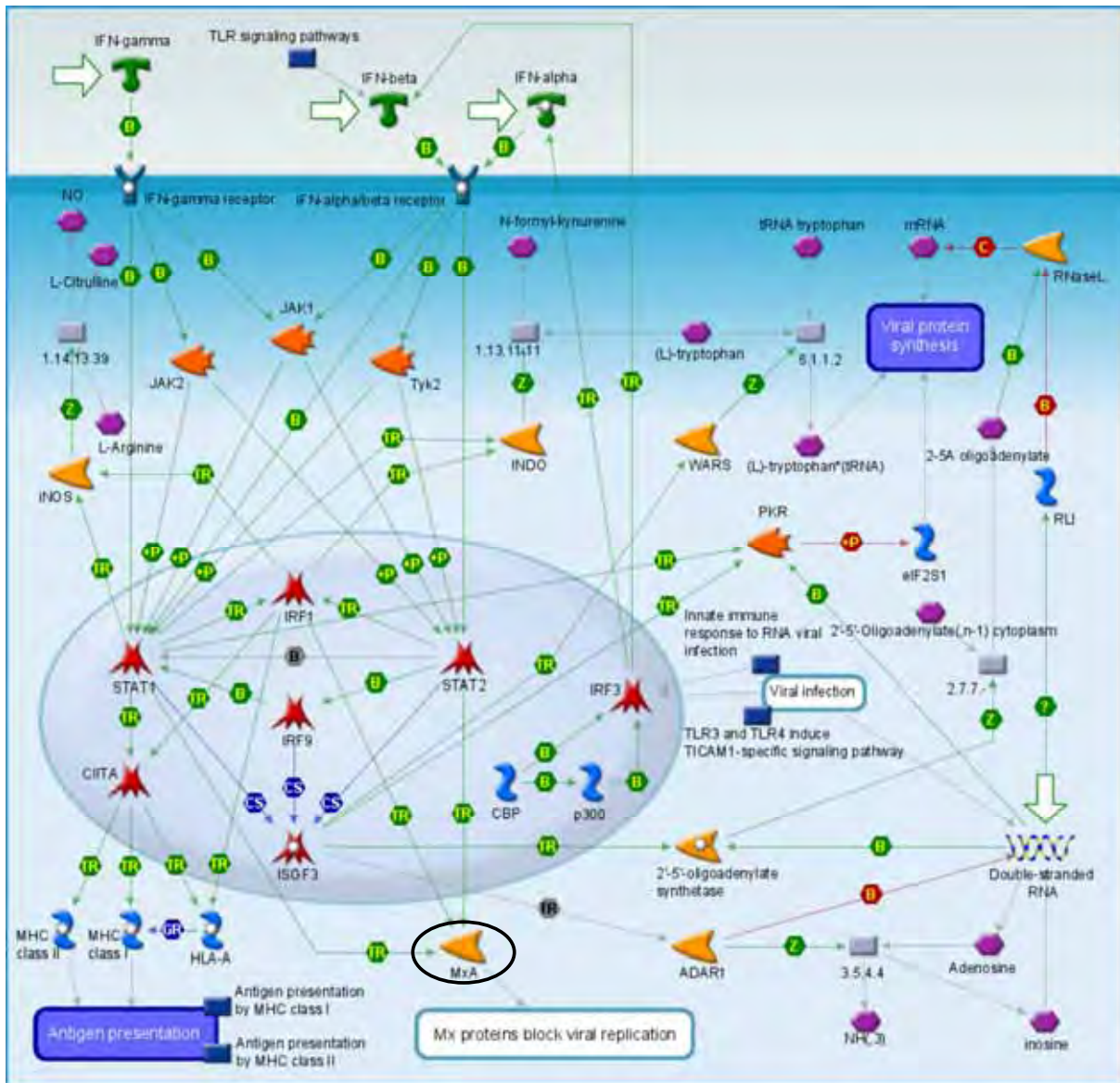


Figura 10 – Mapa da via do MxA (software GeneGo: [https://portal.genego.com/cgi/regulation/upload\\_list.cgi?ez\\_page=1](https://portal.genego.com/cgi/regulation/upload_list.cgi?ez_page=1))

No presente estudo foi detectado a hipermetilação do gene *MxA* em 45% das amostras de câncer de cabeça e pescoço analisadas, corroborando com achados de outro estudo que também observou a hipermetilação da região promotora deste gene em amostras de pacientes diagnosticados com leucemia

mielóide aguda (Jacinto *et al.*, 2007). Além disso, também há dados de baixa expressão deste gene em adenocarcinoma de pâncreas, carcinoma de próstata, pele e colangiocarcinoma de fígado (CGAP, 2009,(Schulz *et al.*, 2007). Estes achados sugerem uma ligação entre o silenciamento deste gene e a tumorigênese e/ou desenvolvimento do tumor.

Evidências bioquímicas e genéticas mostram que as proteínas Mx participam no transporte intracelular e mecanismos de seleção relacionados com proteínas. Os estudos de interações proteína-proteína indicaram que a MxA humana é capaz de se ligar a elementos do citoesqueleto e possivelmente a outras proteínas (Obar *et al.*, 1991). Mushiski e col. observaram que a proteína MxA se associa com a tubulina e que a MxA imita a efeito do IFN na motilidade (Mushinski *et al.*, 2009), sugerindo que esta proteína poderia ser um mediador molecular crítico do efeito do IFN, pois sabe-se a quase trinta anos que o IFN pode inibir a motilidade normal da célula (Brouty-Boye e Zetter, 1980). Além disso, no mesmo estudo também foi observado que a proteína MxA pode inibir o desenvolvimento de metástases experimentais *in vivo*.

Estudos recentes demonstraram que, em células móveis, além das actinas, os microtúbulos também podem regular a atividade da proteína Rho e polimerização da actina e então, os microtúbulos também são importantes reguladores do movimento direcional. Além disso, há vários dados recentes relacionando os microtúbulos e o centro organizante de microtúbulos no direcionamento da polarização celular e migração. Mishinski e col. sugerem que o gene *MxA* pode ser importante neste processo, representando um membro de uma

nova classe de proteínas associadas ao microtúbulo que regulam a motilidade celular e controlam a metástase (Mushinski *et al.*, 2009).

Além das evidências observadas que sugerem que a proteína MxA desempenha um papel na regulação da motilidade celular e controle da metástases, há ainda outros estudos que associaram a expressão do gene *MxA* com uma sensibilidade para estímulos apoptóticos. No estudo de Li e col., onde foi observado que o gene *MxA* está superexpresso em células com anemia Fanconi, sugerindo que a superexpressão do gene *MxA* está associado a apoptose e levando-os a propor um modelo onde a superexpressão constitutiva de *MxA* pelos IFNs ou por infecção viral poderia resultar em uma perda gradual de células troncos da medula óssea por apoptose (Li & Youssoufian, 1997). No estudo de Mybiashi e col., com células de fibroblastos infectadas e não infectadas por vírus Influenza A/PR/8/34, observou-se que tanto as células que expressavam *MxA* infectadas ou não por Influenza apresentavam fragmentação do DNA e que a função ou as funções do *MxA* ou induzidas por *MxA* estavam intimamente relacionadas com processos apoptóticos e síntese de proteínas e que a atividade de promoção de apoptose mediada pelo *MxA* era dependente do nível de expressão do *MxA*. Os pesquisadores sugerem duas possibilidades de ação do gene *MxA* nas células. A primeira possibilidade seria a inibição da síntese de proteína celular total em adição a síntese de proteína viral causaria apoptose, como a ciclohexamida, um inibidor de síntese protéica. A segunda possibilidade seria a redução da síntese de proteína como um dos resultados derivados da apoptose promovida pelas células que expressam *MxA*. Com isso, sugere-se que a

expressão de *MxA* promove apoptose possivelmente causada ou por aceleração de processos apoptóticos ou por redução na síntese de proteína (Mibayashi *et al.*, 2002).

Neste estudo foi observado uma correlação significativa entre a hipermetilação do gene *MxA* e invasão vascular ( $p= 0.055$ ) e o tamanho do tumor ( $p= 0.035$ ), corroborando com os resultados observados nos estudos citados acima e sugerindo que a expressão do gene *MxA*, de algum modo, que ainda não é compreendido, poderia promover a morte celular por estímulos apoptóticos e regular a metástase nos tumores de cabeça e pescoço.

No presente estudo foi demonstrado pela primeira vez que a expressão do RNA mensageiro do gene *CRABP2* e *MXI* é regulada pela metilação do DNA em câncer de cabeça e pescoço e que o silenciamento destes genes está relacionado com a tumorigênese e/ou desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço, sugerindo, com isso o papel de supressor de tumores destes dois genes em câncer de cabeça e pescoço.

## ***CONCLUSÕES***

---

Pelo presente trabalho foi concluído que:

- 1) O tratamento com o agente desmetilante 5'-AZA-2'-deoxicitidina nas linhagens celulares derivadas de cabeça e pescoço e a análise combinatória da expressão diferencial de genes por meio de RaSH e microarray são suficientes para a identificação de genes supostamente regulados por hipermetilação do DNA.
- 2) A hipermetilação do DNA nas regiões promotoras dos genes *CRABP2* e *MXI* está regulando a expressão dos mesmos.
- 3) Os dinucleotídeos CpGs localizados próximos ao início do sítio de transcrição do gene *CRABP2* apresentaram uma maior frequência de hipermetilação nas amostras de carcinoma de cabeça e pescoço analisadas quando comparados com dinucleotídeos CpGs localizados mais distantes do início do sítio de transcrição do gene *CRABP2*.
- 4) A ausência da proteína CRABP2 está associada com um pobre prognóstico, uma vez que pacientes cujos tumores foram negativos para expressão da proteína CRABP2 tem um risco maior de recorrência loco-regional ou metástases à distância do que aqueles pacientes com tumores positivos para CRABP2, sugerindo o papel de supressor de tumores deste gene em câncer de cabeça e pescoço e a potencial utilização deste gene como um biomarcador de prognóstico para o câncer de cabeça e pescoço.
- 5) A hipermetilação de um número pequeno de dinucleotídeos da região promotora do gene *Mx1* localizados dentro do primeiro éxon do gene *MXI* silencia a expressão deste gene em câncer de cabeça e pescoço.

6) Há uma correlação significativa entre a hipermetilação do gene *MxA* e invasão vascular e o tamanho do tumor, sugerindo que a expressão do gene *MxA*, de algum modo, promove a morte celular por estímulos apoptóticos e regula a metástase nos tumores de cabeça e pescoço, sendo um gene candidato a gene supressor de tumor em câncer de cabeça e pescoço.

## ***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

- Aapola, U., *et al.* Imprinting regulator DNMT3L is a transcriptional repressor associated with histone deacetylase activity. Nucleic Acids Res, v.30, n.16, Aug 15, p.3602-8. 2002.
- Akiyama, Y., *et al.* GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. Mol Cell Biol, v.23, n.23, Dec, p.8429-39. 2003.
- Andre, K., *et al.* Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. Eur J Cancer B Oral Oncol, v.31B, n.5, Sep, p.301-9. 1995.
- Annertz, K., *et al.* Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. Int J Cancer, v.101, n.1, Sep 1, p.95-9. 2002.
- Arai, M., *et al.* Analysis of the methylation status of genes up-regulated by the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine, in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep, v.20, n.2, Aug, p.405-12. 2008.
- Araujo, F. D., *et al.* The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus. J Biol Chem, v.276, n.10, Mar 9, p.6930-6. 2001.
- Argiris, A. INtroduction chemotherapy for head and neck cancer: will history repeat itself? J. Natl. Compr. Canc. Netw., v. 3, p. 393-403, 2005
- Argiris, A., *et al.* Head and neck cancer. Lancet, v.371, n.9625, May 17, p.1695-709. 2008.
- Arnheiter, H., *et al.* Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. Cell, v.62, n.1, Jul 13, p.51-61. 1990.
- Astrom, A., *et al.* Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). Retinoic acid-induced expression of CRABP-II but not CRABP-I in adult human skin in vivo and in skin fibroblasts in vitro. J Biol Chem, v.266, n.26, Sep 15, p.17662-6. 1991.
- Bachman, K. E., *et al.* Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. Cancer Cell, v.3, n.1, Jan, p.89-95. 2003.
- Balmer, J. E. e Blomhoff, R. Gene expression regulation by retinoic acid. J Lipid Res, v.43, n.11, Nov, p.1773-808. 2002.
- Baniushin, B. F. [Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes]. Mol Biol (Mosk), v.39, n.4, Jul-Aug, p.557-66. 2005.

- Barbacid, M. ras genes. Annu Rev Biochem, v.56, p.779-827. 1987.
- Bender, C. M., *et al.* Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands. Mol Cell Biol, v.19, n.10, Oct, p.6690-8. 1999.
- Bennett, K. L., *et al.* Frequently methylated tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res, v.68, n.12, Jun 15, p.4494-9. 2008.
- Bernier, J. Alteration of radiotherapy fractionation and concurrent chemotherapy: a new frontier in head and neck oncology? Nat Clin Pract Oncol, v.2, n.6, Jun, p.305-14. 2005.
- Bese, N. S., *et al.* Effects of prolongation of overall treatment time due to unplanned interruptions during radiotherapy of different tumor sites and practical methods for compensation. Int J Radiat Oncol Biol Phys, v.68, n.3, Jul 1, p.654-61. 2007.
- Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev, v.16, n.1, Jan 1, p.6-21. 2002.
- Bird, A. P. e Wolffe, A. P. Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. Cell, v.99, n.5, Nov 24, p.451-4. 1999.
- Blot, W. J., *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res, v.48, n.11, Jun 1, p.3282-7. 1988.
- Boukerche, H., *et al.* Cloning differentially expressed genes using rapid subtraction hybridization (RaSH). Methods Mol Biol, v.383, p.15-29. 2007.
- Breitman, T. R., *et al.* Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. Blood, v.57, n.6, Jun, p.1000-4. 1981.
- Brenner, C., *et al.* Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. Embo J, v.24, n.2, Jan 26, p.336-46. 2005.
- Brouty-Boye, D. e Zetter, B. R. Inhibition of cell motility by interferon. Science, v.208, n.4443, May 2, p.516-8. 1980.
- Brueckner, B., *et al.* Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. Cancer Res, v.65, n.14, Jul 15, p.6305-11. 2005.
- \_\_\_\_\_. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. Cancer Res, v.67, n.4, Feb 15, p.1419-23. 2007.

- Califano J, van der Riet P, Westra W, *et al.* Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. Cancer Res, v. 56, p. 2488–92, 1996.
- Calmon, M. F., *et al.* Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. Cancer Genet Cytogenet, v.173, n.1, Feb, p.31-7. 2007.
- Cao, R., *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science, v.298, n.5595, Nov 1, p.1039-43. 2002.
- Caplan, D. J. e Hertz-Picciotto, I. Racial differences in survival of oral and pharyngeal cancer patients in North Carolina. J Public Health Dent, v.58, n.1, Winter, p.36-43. 1998.
- Cavalieri, E. L., *et al.* Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.20, Sep 30, p.10937-42. 1997.
- Chan, S. W., *et al.* Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nat Rev Genet, v.6, n.5, May, p.351-60. 2005.
- Chuang, J. C., *et al.* Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine. Mol Cancer Ther, v.4, n.10, Oct, p.1515-20. 2005.
- Chung, C. H., *et al.* Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. Cancer Cell, v.5, n.5, May, p.489-500. 2004.
- Comb, M. e Goodman, H. M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. Nucleic Acids Res, v.18, n.13, Jul 11, p.3975-82. 1990.
- Constantinides, P. G., *et al.* Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. Nature, v.267, n.5609, May 26, p.364-6. 1977.
- Cui, H., *et al.* Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. Science, v.299, n.5613, Mar 14, p.1753-5. 2003.
- D'alessio, A. C. e Szyf, M. Epigenetic tete-a-tete: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. Biochem Cell Biol, v.84, n.4, Aug, p.463-76. 2006.
- De Luca, L. M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. Faseb J, v.5, n.14, Nov, p.2924-33. 1991.

De Schutter, H., *et al.* Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. Oncol Rep, v.21, n.2, Feb, p.507-13. 2009.

De Visscher, J. G., *et al.* Squamous cell carcinoma of the lower lip in renal-transplant recipients. Report of six cases. Int J Oral Maxillofac Surg, v.26, n.2, Apr, p.120-3. 1997.

Deplus, R., *et al.* Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. Nucleic Acids Res, v.30, n.17, Sep 1, p.3831-8. 2002.

Dhareel, N., *et al.* Potential contribution of tumor suppressor p53 in the host defense against hepatitis C virus. Hepatology, v.47, n.4, Apr, p.1136-49. 2008.

Donato, L. J. e Noy, N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. Cancer Res, v.65, n.18, Sep 15, p.8193-9. 2005.

Dong, D., *et al.* Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid. J Biol Chem, v.274, n.34, Aug 20, p.23695-8. 1999.

Dong, Q., *et al.* A genetic locus of Helicobacter pylori inversely associated with gastric intestinal metaplasia. FEMS Immunol Med Microbiol, v.44, n.2, May 1, p.243-9. 2005.

Donovan, M., *et al.* The cellular retinoic acid binding proteins. J Steroid Biochem Mol Biol, v.53, n.1-6, Jun, p.459-65. 1995.

Dvir, A., *et al.* Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II. Curr Opin Genet Dev, v.11, n.2, Apr, p.209-14. 2001.

Eden, A., *et al.* Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science, v.300, n.5618, Apr 18, p.455. 2003.

Egger, G., *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature, v.429, n.6990, May 27, p.457-63. 2004.

Enver, T., *et al.* DNA methylation: a secondary event in globin gene switching? Genes Dev, v.2, n.6, Jun, p.698-706. 1988.

Fan, T., *et al.* Lsh-deficient murine embryonal fibroblasts show reduced proliferation with signs of abnormal mitosis. Cancer Res, v.63, n.15, Aug 1, p.4677-83. 2003.

Fang, M. Z., *et al.* Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. Cancer Res, v.63, n.22, Nov 15, p.7563-70. 2003.

Feinberg, A. P. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. Cancer Res, v.59, n.7 Suppl, Apr 1, p.1743s-1746s. 1999.

Feinberg, A. P. e Tycko, B. The history of cancer epigenetics. Nat Rev Cancer, v.4, n.2, Feb, p.143-53. 2004.

Feinberg, A. P. e Vogelstein, B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. Nature, v.301, n.5895, Jan 6, p.89-92. 1983.

Ferris, R. L., *et al.* Molecular staging of cervical lymph nodes in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res, v.65, n.6, Mar 15, p.2147-56. 2005.

Fiala, E. S., *et al.* Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay for DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation. Carcinogenesis, v.19, n.4, Apr, p.597-604. 1998.

Fleisher, A. S., *et al.* Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. Cancer Res, v.60, n.17, Sep 1, p.4864-8. 2000.

Foulkes, W. D., *et al.* Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. Bmj, v.313, n.7059, Sep 21, p.716-21. 1996.

Fraga, M. F., *et al.* A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. Cancer Res, v.64, n.16, Aug 15, p.5527-34. 2004.

Fuks, F., *et al.* DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. Nat Genet, v.24, n.1, Jan, p.88-91. 2000.

\_\_\_\_\_. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. Nucleic Acids Res, v.31, n.9, May 1, p.2305-12. 2003.

Fukui, T., *et al.* Transcriptional silencing of secreted frizzled related protein 1 (SFRP 1) by promoter hypermethylation in non-small-cell lung cancer. Oncogene, v.24, n.41, Sep 15, p.6323-7. 2005.

Gal-Yam, E. N., *et al.* Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. Annu Rev Med, v.59, p.267-80. 2008.

Garavello, W., *et al.* Body size and laryngeal cancer risk. Ann Oncol, v.17, n.9, Sep, p.1459-63. 2006.

Gaub, M. P., *et al.* Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies. J Histochem Cytochem, v.46, n.10, Oct, p.1103-11. 1998.

Gaudet, F., *et al.* Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. Science, v.300, n.5618, Apr 18, p.489-92. 2003.

Geiman, T. M., *et al.* Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery. Nucleic Acids Res, v.32, n.9, p.2716-29. 2004.

Giguere, V. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. Endocr Rev, v.15, n.1, Feb, p.61-79. 1994.

Giguere, V., *et al.* Molecular cloning of cDNA encoding a second cellular retinoic acid-binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.16, Aug, p.6233-7. 1990.

Gillison, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. Head Neck, v.29, n.8, Aug, p.779-92. 2007.

Goll, M. G. e Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annu Rev Biochem, v.74, p.481-514. 2005.

Gowher, H., *et al.* Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. J Biol Chem, v.280, n.14, Apr 8, p.13341-8. 2005.

Grimm, D., *et al.* Replication fitness determines high virulence of influenza A virus in mice carrying functional Mx1 resistance gene. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.16, Apr 17, p.6806-11. 2007.

Gromova, E. S. e Khoroshaev, A. V. [Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA]. Mol Biol (Mosk), v.37, n.2, Mar-Apr, p.300-14. 2003.

Gronbaek, K., *et al.* Epigenetic changes in cancer. Apmis, v.115, n.10, Oct, p.1039-59. 2007.

- Guo, G., *et al.* Mismatch repair genes identified using genetic screens in Bln-deficient embryonic stem cells. Nature, v.429, n.6994, Jun 24, p.891-5. 2004.
- Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. Lancet Oncol, v.7, p. 77-82, 2006
- Haller, O., *et al.* Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. Nature, v.283, n.5748, Feb 14, p.660-2. 1980.
- \_\_\_\_\_. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. Biochimie, v.89, n.6-7, Jun-Jul, p.812-8. 2007.
- Hanahan, D. e Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. Cell, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.
- Herman, J. G., *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.18, Sep 3, p.9821-6. 1996.
- Hermann, A., *et al.* Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. Cell Mol Life Sci, v.61, n.19-20, Oct, p.2571-87. 2004.
- \_\_\_\_\_. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. J Biol Chem, v.278, n.34, Aug 22, p.31717-21. 2003.
- Hess, J. L. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. Trends Mol Med, v.10, n.10, Oct, p.500-7. 2004.
- Holler, M., *et al.* Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. Genes Dev, v.2, n.9, Sep, p.1127-35. 1988.
- Holzinger, D., *et al.* Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. J Virol, v.81, n.14, Jul, p.7776-85. 2007.
- Homma, N., *et al.* Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. Cancer Sci, v.97, n.1, Jan, p.51-6. 2006.
- Hore, T. A. Hore TA, Rapkins RW, Graves JA. Construction and evolution of imprinted loci in mammals. Trends Genet, v. 23, n. 9, p. 440-448, 2007.
- Horisberger, M. A. e Gunst, M. C. Interferon-induced proteins: identification of Mx proteins in various mammalian species. Virology, v.180, n.1, Jan, p.185-90. 1991.

Horisberger, M. A., *et al.* cDNA cloning and assignment to chromosome 21 of IFI-78K gene, the human equivalent of murine Mx gene. Somat Cell Mol Genet, v.14, n.2, Mar, p.123-31. 1988.

Howard, G., *et al.* Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. Oncogene, v.27, n.3, Jan 10, p.404-8. 2008.

Howe, H. L., *et al.* Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. Cancer, v.107, n.8, Oct 15, p.1711-42. 2006.

Hsieh, C. L. The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. BMC Biochem, v.6, p.6. 2005.

Instituto Nacional de Câncer. <http://www.inca.gov.br/>. Acesso em: 29/10/2009.

Issa, J. P., *et al.* Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. Blood, v.103, n.5, Mar 1, p.1635-40. 2004.

\_\_\_\_\_. Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. J Clin Oncol, v.23, n.17, Jun 10, p.3948-56. 2005.

Jacinto, F. V., *et al.* Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. Cancer Res, v.67, n.24, Dec 15, p.11481-6. 2007.

Januchowski, R., *et al.* Role of epigenetic DNA alterations in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. J Appl Genet, v.45, n.2, p.237-48. 2004.

Jascur, T. e Boland, C. R. Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. Int J Cancer, v.119, n.9, Nov 1, p.2030-5. 2006.

Jetten, A. M., *et al.* Control of squamous differentiation in tracheobronchial and epidermal epithelial cells: role of retinoids. J Natl Cancer Inst Monogr, n.13, p.93-100. 1992.

Jiang, H., *et al.* RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.23, Nov 7, p.12684-9. 2000.

\_\_\_\_\_. Induction of differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells activates p21, WAF1/CIP1, expression in the absence of p53. Oncogene, v.9, n.11, Nov, p.3397-406. 1994.

- Jinno, H., *et al.* Preventive efficacy of receptor class selective retinoids on HER-2/neu oncogene expressing preneoplastic human mammary epithelial cells. Int J Oncol, v.21, n.1, Jul, p.127-34. 2002.
- Jones, A. L., *et al.* De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. Embo J, v.17, n.21, Nov 2, p.6385-93. 1998.
- Jones, P. A. e Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet, v.3, n.6, Jun, p.415-28. 2002.
- Jones, P. A. e Martienssen, R. A blueprint for a Human Epigenome Project: the AACR Human Epigenome Workshop. Cancer Res, v.65, n.24, Dec 15, p.11241-6. 2005.
- Jones, P. A. e Taylor, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell, v.20, n.1, May, p.85-93. 1980.
- Jovanovic, A., *et al.* Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med, v.22, n.10, Nov, p.459-62. 1993.
- Kanai Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. Pathol Int., v. 58, n. 9, p. 544-558, 2008.
- Kaneda, A. e Feinberg, A. P. Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. Cancer Res, v.65, n.24, Dec 15, p.11236-40. 2005.
- Kantarjian, H., *et al.* Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. Cancer, v.106, n.8, Apr 15, p.1794-803. 2006.
- \_\_\_\_\_. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. Blood, v.109, n.1, Jan 1, p.52-7. 2007.
- karamouzis, M. V. Grandis, J. R., Argiris, A. Therapies directed against epidermal growth factor receptor in aerodigestive carcinomas. JAMA, v. 298, p. 3579-3584, 2007.
- Karpf, A. R. e Matsui, S. Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. Cancer Res, v.65, n.19, Oct 1, p.8635-9. 2005.

- Kass, S. U., *et al.* DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. Curr Biol, v.7, n.3, Mar 1, p.157-65. 1997.
- Kelly TL, Trasler JM. Reproductive epigenetics. Clin Genet., v. 65, n. 4, p. 247-260, 2004.
- Khuri, F. R., *et al.* Randomized phase III trial of low-dose isotretinoin for prevention of second primary tumors in stage I and II head and neck cancer patients. J Natl Cancer Inst, v.98, n.7, Apr 5, p.441-50. 2006.
- Kitazawa, S., *et al.* Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region. J Biol Chem, v.274, n.40, Oct 1, p.28787-93. 1999.
- Kohya, N., *et al.* Mutation analysis of K-ras and beta-catenin genes related to O6-methylguanin-DNA methyltransferase and mismatch repair protein status in human gallbladder carcinoma. Int J Mol Med, v.11, n.1, Jan, p.65-9. 2003.
- Kong, W. J., *et al.* Methylation-associated silencing of death-associated protein kinase gene in laryngeal squamous cell cancer. Laryngoscope, v.115, n.8, Aug, p.1395-401. 2005.
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. Cell, v.128, n.4, Feb 23, p.693-705. 2007.
- Kumar, S., *et al.* The DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nucleic Acids Res, v.22, n.1, Jan 11, p.1-10. 1994.
- Kunert, N., *et al.* A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. Development, v.130, n.21, Nov, p.5083-90. 2003.
- Laird, P. W., *et al.* Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. Cell, v.81, n.2, Apr 21, p.197-205. 1995.
- Lande-Diner, L., *et al.* Role of DNA methylation in stable gene repression. J Biol Chem, v.282, n.16, Apr 20, p.12194-200. 2007.
- Larsson, L. G., *et al.* Relationship of Plummer-Vinson disease to cancer of the upper alimentary tract in Sweden. Cancer Res, v.35, n.11 Pt. 2, Nov, p.3308-16. 1975.
- Le, Q. T., *et al.* Influence of fraction size, total dose, and overall time on local control of T1-T2 glottic carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys, v.39, n.1, Aug 1, p.115-26. 1997.

- Leid, M., *et al.* Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. Trends Biochem Sci, v.17, n.10, Oct, p.427-33. 1992.
- Leonhardt, H., *et al.* A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. Cell, v.71, n.5, Nov 27, p.865-73. 1992.
- Lewin, F., *et al.* Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. Cancer, v.82, n.7, Apr 1, p.1367-75. 1998.
- Li, Y. e Youssoufian, H. MxA overexpression reveals a common genetic link in four Fanconi anemia complementation groups. J Clin Invest, v.100, n.11, Dec 1, p.2873-80. 1997.
- Licitra, L., *et al.* High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. J Clin Oncol, v.24, n.36, Dec 20, p.5630-6. 2006.
- Lindahl, T. e Barnes, D. E. Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.65, p.127-33. 2000.
- Lindahl, T., *et al.* DNA joining in mammalian cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.58, p.619-24. 1993.
- Lindenmann, J. Inheritance of Resistance to Influenza Virus in Mice. Proc Soc Exp Biol Med, v.116, Jun, p.506-9. 1964.
- Liu, Z., *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine induces retinoic acid receptor-beta(2) demethylation and growth inhibition in esophageal squamous carcinoma cells. Cancer Lett, v.230, n.2, Dec 18, p.271-83. 2005.
- Llewellyn, C. D., *et al.* Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. Oral Oncol, v.37, n.5, Jul, p.401-18. 2001.
- Lock, L. F., *et al.* Methylation of the Hprt gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. Cell, v.48, n.1, Jan 16, p.39-46. 1987.
- Lotan, R. Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids. Cancer Res, v.54, n.7 Suppl, Apr 1, p.1987s-1990s. 1994.
- Lukasik, S. M., *et al.* High resolution structure of the HDGF PWWP domain: a potential DNA binding domain. Protein Sci, v.15, n.2, Feb, p.314-23. 2006.

- Lyko, F. e Brown, R. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. J Natl Cancer Inst, v.97, n.20, Oct 19, p.1498-506. 2005.
- Malik, S. e Roeder, R. G. Dynamic regulation of pol II transcription by the mammalian Mediator complex. Trends Biochem Sci, v.30, n.5, May, p.256-63. 2005.
- Malkhosyan, S., *et al.* Differences in the spectrum of spontaneous mutations in the hprt gene between tumor cells of the microsatellite mutator phenotype. Mutat Res, v.316, n.5-6, May, p.249-59. 1996.
- Manor D *et al.* Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II. Cancer Res., v. 63, p. 4426-4433, 2003.
- Mao L, Lee JS, Fan YH, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. Nat Med, v. 2, p. 682-85, 1996
- Marcucci, G., *et al.* Bioavailability of azacitidine subcutaneous versus intravenous in patients with the myelodysplastic syndromes. J Clin Pharmacol, v.45, n.5, May, p.597-602. 2005.
- Margot, J. B., *et al.* Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure. J Mol Biol, v.297, n.2, Mar 24, p.293-300. 2000.
- \_\_\_\_\_. Interactions within the mammalian DNA methyltransferase family. BMC Mol Biol, v.4, May 30, p.7. 2003.
- Marletaz, F., *et al.* Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. Int J Biol Sci, v.2, n.2, p.38-47. 2006.
- Marur, S. e Forastiere, A. A. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. Mayo Clin Proc, v.83, n.4, Apr, p.489-501. 2008.
- Mashberg, A., *et al.* Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. Cancer, v.72, n.4, Aug 15, p.1369-75. 1993.
- McCaul JA, Gordon KE, Clark LJ, Parkinson EK. Telomerase inhibition and the future management of head-and-neck cancer. Lancet Oncol, v. 3, p. 280-88, 2002.
- Mcgarvey, K. M., *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. Cancer Res, v.66, n.7, Apr 1, p.3541-9. 2006.

- Metzger, E., *et al.* LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. Nature, v.437, n.7057, Sep 15, p.436-9. 2005.
- Mibayashi, M., *et al.* Promoted cell death of cells expressing human MxA by influenza virus infection. Microbiol Immunol, v.46, n.1, p.29-36. 2002.
- Miranda, T. B. e Jones, P. A. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. J Cell Physiol, v.213, n.2, Nov, p.384-90. 2007.
- Misawa, K., *et al.* Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer. Clin Cancer Res, v.14, n.23, Dec 1, p.7604-13. 2008.
- Momparler, R. L., *et al.* Comparison of the antileukemic activity of 5-AZA-2'-deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-azacytidine against L1210 leukemia. Leuk Res, v.8, n.6, p.1043-9. 1984.
- Moon, R. C. e Mehta, R. G. Cancer chemoprevention by retinoids: animal models. Methods Enzymol, v.190, p.395-406. 1990a.
- \_\_\_\_\_. Chemoprevention of mammary cancer by retinoids. Basic Life Sci, v.52, p.213-24. 1990b.
- Moriguchi, K., *et al.* Larger numbers of silenced genes in cancer cell lines with increased de novo methylation of scattered CpG sites. Cancer Lett, v.249, n.2, May 8, p.178-87. 2007.
- Moyers, S. B. e Kumar, N. B. Green tea polyphenols and cancer chemoprevention: multiple mechanisms and endpoints for phase II trials. Nutr Rev, v.62, n.5, May, p.204-11. 2004.
- Mulero-Navarro, S. e Esteller, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. Crit Rev Oncol Hematol, v.68, n.1, Oct, p.1-11. 2008.
- Munger, K. e Howley, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res, v.89, n.2, Nov, p.213-28. 2002.
- Murti, P. R., *et al.* Malignant transformation rate in oral submucous fibrosis over a 17-year period. Community Dent Oral Epidemiol, v.13, n.6, Dec, p.340-1. 1985.
- Mushinski, J. F., *et al.* Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. J Biol Chem, v.284, n.22, May 29, p.15206-14. 2009.

Nagano, K., *et al.* Differential protein synthesis and expression levels in normal and neoplastic human prostate cells and their regulation by type I and II interferons. Oncogene, v.23, n.9, Mar 4, p.1693-703. 2004.

Nakagawa, H., *et al.* Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. Carcinogenesis, v.25, n.9, Sep, p.1567-74. 2004.

Nakajima, E., *et al.* A naturally occurring variant of porcine Mx1 associated with increased susceptibility to influenza virus in vitro. Biochem Genet, v.45, n.1-2, Feb, p.11-24. 2007.

Nan, X., *et al.* Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. Novartis Found Symp, v.214, p.6-16; discussion 16-21, 46-50. 1998.

\_\_\_\_\_. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature, v.393, n.6683, May 28, p.386-9. 1998.

National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/> Acesso em: 27/10/2009.

Obar, R. A., *et al.* Dynamin: a microtubule-associated GTP-binding protein. J Cell Sci Suppl, v.14, p.143-5. 1991.

[Ogi K](#), [Toyota M](#), [Ohe-Toyota M](#), *et al.* Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, v. 8, n. 10, p. 3164-3171, 2002..

Ohtani-Fujita, N., *et al.* CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. Oncogene, v.8, n.4, Apr, p.1063-7. 1993.

Okano, M., *et al.* Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. Nat Genet, v.19, n.3, Jul, p.219-20. 1998.

Palm, M., *et al.* Differential anti-influenza activity among allelic variants at the Sus scrofa Mx1 locus. J Interferon Cytokine Res, v.27, n.2, Feb, p.147-55. 2007.

Park, J. C., *et al.* Epigenetic silencing of human T (brachyury homologue) gene in non-small-cell lung cancer. Biochem Biophys Res Commun, v.365, n.2, Jan 11, p.221-6. 2008.

Parkin, D. M., *et al.* Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, v.55, n.2, Mar-Apr, p.74-108. 2005.

- Parsons, R., *et al.* Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. Cancer Res, v.55, n.23, Dec 1, p.5548-50. 1995.
- Pavia, M., *et al.* Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. Am J Clin Nutr, v.83, n.5, May, p.1126-34. 2006.
- Paz, M. F., *et al.* A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. Cancer Res, v.63, n.5, Mar 1, p.1114-21. 2003.
- Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Pathol, v. 59, p. 445–53, 2006.
- Pfeifer, G. P., *et al.* Mutation hotspots and DNA methylation. Curr Top Microbiol Immunol, v.249, p.1-19. 2000.
- Posfai, J., *et al.* Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. Nucleic Acids Res, v.17, n.7, Apr 11, p.2421-35. 1989.
- Pradhan, S. e Esteve, P. O. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. Clin Immunol, v.109, n.1, Oct, p.6-16. 2003.
- Prendergast, G. C., *et al.* Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. Cell, v.65, n.3, May 3, p.395-407. 1991.
- Pruss, D., *et al.* Nucleosomal anatomy--where are the histones? Bioessays, v.17, n.2, Feb, p.161-70. 1995.
- Qiu, C., *et al.* The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. Nat Struct Biol, v.9, n.3, Mar, p.217-24. 2002.
- Ramsahoye, B. H., *et al.* Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.10, May 9, p.5237-42. 2000.
- Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature, v.447, n.7143, May 24, p.425-32. 2007.
- Rideout, W. M., 3rd, *et al.* 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. Science, v.249, n.4974, Sep 14, p.1288-90. 1990.

- Robertson, A. K., *et al.* Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro. Biochem Biophys Res Commun, v.322, n.1, Sep 10, p.110-8. 2004.
- Robertson, K. D. DNA methylation and human disease. Nat Rev Genet, v.6, n.8, Aug, p.597-610. 2005.
- Robertson, K. D., *et al.* The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. Nucleic Acids Res, v.27, n.11, Jun 1, p.2291-8. 1999.
- Roepman, P., *et al.* Multiple robust signatures for detecting lymph node metastasis in head and neck cancer. Cancer Res, v.66, n.4, Feb 15, p.2361-6. 2006.
- Rosas, S. L., *et al.* Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. Cancer Res, v.61, n.3, Feb 1, p.939-42. 2001.
- Rountree, M. R., *et al.* DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. Nat Genet, v.25, n.3, Jul, p.269-77. 2000.
- Ruberte, E., *et al.* Differential distribution patterns of CRABP I and CRABP II transcripts during mouse embryogenesis. Development, v.115, n.4, Aug, p.973-87. 1992.
- Sandelin, A., *et al.* Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. Nat Rev Genet, v.8, n.6, Jun, p.424-36. 2007.
- Saraiya, M., *et al.* Cervical cancer incidence in a prevaccine era in the United States, 1998-2002. Obstet Gynecol, v.109, n.2 Pt 1, Feb, p.360-70. 2007.
- Schaefer, C. B., *et al.* Epigenetic decisions in mammalian germ cells. Science, v.316, n.5823, Apr 20, p.398-9. 2007.
- Schantz, S. P. e Yu, G. P. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, v.128, n.3, Mar, p.268-74. 2002.
- Schulz, W. A., *et al.* Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer. Mol Cancer, v.6, p.14. 2007.

- Seewaldt, V. L., *et al.* Expression of retinoic acid receptor beta mediates retinoic acid-induced growth arrest and apoptosis in breast cancer cells. Cell Growth Differ, v.6, n.9, Sep, p.1077-88. 1995.
- Seyama, T., *et al.* Population research of genetic polymorphism at amino acid position 631 in chicken Mx protein with differential antiviral activity. Biochem Genet, v.44, n.9-10, Oct, p.437-48. 2006.
- Shalinsky, D. R., *et al.* Retinoid-induced suppression of squamous cell differentiation in human oral squamous cell carcinoma xenografts (line 1483) in athymic nude mice. Cancer Res, v.55, n.14, Jul 15, p.3183-91. 1995.
- Shangina, O., *et al.* Occupational exposure and laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. Am J Epidemiol, v.164, n.4, Aug 15, p.367-75. 2006.
- Shiboski, C. H., *et al.* Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. Cancer, v.103, n.9, May 1, p.1843-9. 2005.
- Shklar, G., *et al.* Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by 13-cis-retinoic acid. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v.50, n.1, Jul, p.45-52. 1980.
- Siedlecki, P., *et al.* Establishment and functional validation of a structural homology model for human DNA methyltransferase 1. Biochem Biophys Res Commun, v.306, n.2, Jun 27, p.558-63. 2003.
- Siedlecki, P. e Zielenkiewicz, P. Mammalian DNA methyltransferases. Acta Biochim Pol, v.53, n.2, p.245-56. 2006.
- Silverman, S. Jr., Shillitoe, E. F. Etiology and Predisposing Factors. In: Silverman, S. Jr. ed. Oral Cancer, 4<sup>th</sup> ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc, p. 7-24, 1998
- Silverman, S. Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes. the trends, the challenge. J. Am. Dent. Assoc., v. 132, p.7S-11S, 2001
- Silverman, L. R., *et al.* Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. J Clin Oncol, v.20, n.10, May 15, p.2429-40. 2002.
- Sinha, P., *et al.* Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. Head Neck, May 8. 2009.
- Sjoblom, T., *et al.* The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science, v.314, n.5797, Oct 13, p.268-74. 2006.

- Slebos, R. J., *et al.* Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. Clin Cancer Res, v.12, n.3 Pt 1, Feb 1, p.701-9. 2006.
- Sorm, F., *et al.* 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. Experientia, v.20, n.4, Apr 15, p.202-3. 1964.
- Staeheli, P., *et al.* Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. Cell, v.44, n.1, Jan 17, p.147-58. 1986.
- \_\_\_\_\_. Mx proteins: GTPases with antiviral activity. Trends Cell Biol, v.3, n.8, Aug, p.268-72. 1993.
- Stresemann, C., *et al.* Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. Cancer Res, v.66, n.5, Mar 1, p.2794-800. 2006.
- Stresemann, C. e Lyko, F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. Int J Cancer, v.123, n.1, Jul 1, p.8-13. 2008.
- Strunnikova, M., *et al.* Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter. Mol Cell Biol, v.25, n.10, May, p.3923-33. 2005.
- Stunnenberg, H. G. Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. Bioessays, v.15, n.5, May, p.309-15. 1993.
- Suarez, C., *et al.* Tumours of familial origin in the head and neck. Oral Oncol, v.42, n.10, Nov, p.965-78. 2006.
- Suzuki, M. M. e Bird, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet, v.9, n.6, Jun, p.465-76. 2008.
- Szyf, M., *et al.* DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. Cancer Lett, v.211, n.2, Aug 10, p.133-43. 2004.
- Takase, S., *et al.* Transfer of retinoic acid from its complex with cellular retinoic acid-binding protein to the nucleus. Arch Biochem Biophys, v.247, n.2, Jun, p.328-34. 1986.
- Tamaru, H., *et al.* Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. Nat Genet, v.34, n.1, May, p.75-9. 2003.

- Trizna, Z. e Schantz, S. P. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. Otolaryngol Clin North Am, v.25, n.5, Oct, p.1089-103. 1992.
- Tsunoda, S., *et al.* Methylation of CLDN6, FBN2, RBP1, RBP4, TFPI2, and TMEFF2 in esophageal squamous cell carcinoma. Oncol Rep, v.21, n.4, Apr, p.1067-73. 2009.
- Tufarelli, C., *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. Nat Genet, v.34, n.2, Jun, p.157-65. 2003.
- Turek-Plewa, J. e Jagodzinski, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Cell Mol Biol Lett, v.10, n.4, p.631-47. 2005.
- Turker, M. S. Estimation of mutation frequencies in normal mammalian cells and the development of cancer. Semin Cancer Biol, v.8, n.6, Dec, p.407-19. 1998.
- \_\_\_\_\_. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. Oncogene, v.21, n.35, Aug 12, p.5388-93. 2002.
- Turner, B. M. Defining an epigenetic code. Nat Cell Biol, v.9, n.1, Jan, p.2-6. 2007.
- Tycko, B. Epigenetic gene silencing in cancer. J Clin Invest, v.105, n.4, Feb, p.401-7. 2000.
- Unterberger, A., *et al.* DNA methyltransferase 1 knockdown activates a replication stress checkpoint. Mol Cell Biol, v.26, n.20, Oct, p.7575-86. 2006.
- Vineis, P., *et al.* Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. J Natl Cancer Inst, v.96, n.2, Jan 21, p.99-106. 2004.
- Vire, E., *et al.* The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature, v.439, n.7078, Feb 16, p.871-4. 2006.
- Walsh, C. P. e Xu, G. L. Cytosine methylation and DNA repair. Curr Top Microbiol Immunol, v.301, p.283-315. 2006.
- Wassenegger, M., *et al.* RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. Cell, v.76, n.3, Feb 11, p.567-76. 1994.
- Whitehall, V. L., *et al.* Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. Cancer Res, v.61, n.3, Feb 1, p.827-30. 2001.

Widschwendter, M., *et al.* Epigenetic stem cell signature in cancer. Nat Genet, v.39, n.2, Feb, p.157-8. 2007.

Wu, H., *et al.* Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. Nature, v.438, n.7070, Dec 15, p.981-7. 2005.

Xie, S., *et al.* Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. Gene, v.236, n.1, Aug 5, p.87-95. 1999.

Yamada, Y., *et al.* Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.38, Sep 20, p.13580-5. 2005.

Yen, A., *et al.* Retinoic acid induced mitogen-activated protein (MAP)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) kinase-dependent MAP kinase activation needed to elicit HL-60 cell differentiation and growth arrest. Cancer Res, v.58, n.14, Jul 15, p.3163-72. 1998.

Yoder, J. A. e Bestor, T. H. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. Hum Mol Genet, v.7, n.2, Feb, p.279-84. 1998.

Yoder, J. A., *et al.* DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe. J Mol Biol, v.270, n.3, Jul 18, p.385-95. 1997.

Yoon, J. H., *et al.* Methylated CpG dinucleotides are the preferential targets for G-to-T transversion mutations induced by benzo[a]pyrene diol epoxide in mammalian cells: similarities with the p53 mutation spectrum in smoking-associated lung cancers. Cancer Res, v.61, n.19, Oct 1, p.7110-7. 2001.

Zhang, Y. e Reinberg, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. Genes Dev, v.15, n.18, Sep 15, p.2343-60. 2001.

Zhang, Z. F., *et al.* Marijuana use and increased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.8, n.12, Dec, p.1071-8. 1999.

Zhu, W. G., *et al.* Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. Mol Cell Biol, v.23, n.12, Jun, p.4056-65. 2003.

***OUTRAS PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS***

---

## Gene expression profiling reveals molecular marker candidates of laryngeal squamous cell carcinoma

JUCIMARA COLOMBO<sup>1</sup>, ÂNGELA A. FACHEL<sup>2</sup>, MARILIA DE FREITAS CALMON<sup>1</sup>,  
PATRÍCIA MALUF CURY<sup>3</sup>, ÉRICA ERINA FUKUYAMA<sup>4</sup>, ELOIZA HELENA TAJARA<sup>5</sup>,  
JOSÉ ANTÔNIO CORDEIRO<sup>6</sup>, SERGIO VERJOVSKI-ALMEIDA<sup>2</sup>,  
EDUARDO M. REIS<sup>2\*</sup> and PAULA RAHAL<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UNESP - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - IBILCE, Departamento de Biologia, São José do Rio Preto; <sup>2</sup>USP - Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, São Paulo; <sup>3</sup>FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Patologia, São José do Rio Preto; <sup>4</sup>Hospital do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, São Paulo; <sup>5</sup>FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Biologia Molecular; <sup>6</sup>FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Departamento de Epidemiologia, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

Received August 14, 2008; Accepted October 6, 2008

DOI: 10.3892/or\_00000268

**Abstract.** Laryngeal squamous cell carcinoma is very common in head and neck cancer, with high mortality rates and poor prognosis. In this study, we compared expression profiles of clinical samples from 13 larynx tumors and 10 non-neoplastic larynx tissues using a custom-built cDNA microarray containing 331 probes for 284 genes previously identified by informatics analysis of EST databases as markers of head and neck tumors. Thirty-five genes showed statistically significant differences ( $\text{SNR} \geq 1.0$ ,  $p \leq 0.001$ ) in the expression between tumor and non-tumor larynx tissue samples. Functional annotation indicated that these genes are involved in cellular processes relevant to the cancer phenotype, such as apoptosis, cell cycle, DNA repair, proteolysis, protease inhibition, signal transduction and transcriptional regulation. Six of the identified transcripts map to intronic regions of protein-coding genes and may comprise non-

annotated exons or as yet uncharacterized long ncRNAs with a regulatory role in the gene expression program of larynx tissue. The differential expression of 10 of these genes (*ADCY6*, *AES*, *AL2SCR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* and *ZNF706*) was independently confirmed by quantitative real-time RT-PCR. Among these, the *CSTB* gene product has cysteine protease inhibitor activity that has been associated with an antimetastatic function. Interestingly, *CSTB* showed a low expression in the tumor samples analyzed ( $p < 0.0001$ ). The set of genes identified here contribute to a better understanding of the molecular basis of larynx cancer, and provide candidate markers for improving diagnosis, prognosis and treatment of this carcinoma.

### Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the fifth most common cancer worldwide, with a global annual incidence of 780,000 new cases (1). More than 90% of these cancer types have a squamous origin, and common sites include the hypopharynx, larynx, oral cavity, nasopharynx, oropharynx, paranasal sinus, nasal cavity, parathyroid and salivary glands (2,3). Laryngeal squamous cell carcinoma is a very common type of head and neck cancer, corresponding to ~25% of HNSCC cases (4). Tobacco and/or alcohol consumption are the two main risk factors involved in the development of HNSCC. Other risk factors include poor oral hygiene, nutritional deficiencies and certain viruses, such as human papilloma (HPV) and Epstein-Barr (2,5,6).

Despite advances in treatment, the long-term survival rate of patients with head and neck squamous cell carcinoma has remained at 50%, with high rates of associated mortality (5). Late presentation of the lesion, lack of suitable markers for early detection and failure of advanced lesions to respond to the available chemotherapy contribute to a poor outcome of

**Correspondence to:** Dr Eduardo M. Reis, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil  
E-mail: emreis@iq.usp.br

\*Contributed equally

**Abbreviations:** HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; ORESTES, open reading frame expressed sequence tags; qRT-PCR, quantitative real-time RT-PCR; *CSTB*, cystatin B

**Key words:** cDNA microarray, larynx carcinoma, gene expression, real-time RT-PCR, cystatin B



Table I. Patient clinical and anatomopathological data.

Case	Gender <sup>a</sup>	Age (years)	Ethnicity <sup>b</sup>	Tobacco <sup>c</sup>	Alcohol <sup>c</sup>	Anatomic location	TNM category and clinical stage	NED or recurrence (months) <sup>d</sup>
T1	M	73	C	P	P	Pyriiform sinus and hemilarynx	T4N2bM0 IV	Loc/Rec (9)
T2	M	66	C	P	P	Glottis and subglottis	T4N0M0 IV	Loc/Rec (10)
T3	M	52	C	P	P	Glottis	T3N0M0 III	NED (26)
T4	F	58	C	P	P	Larynx	T4N0M0 IV	Loc/Rec (7)
T5	M	44	C	P	P	Pyriiform sinus	T4N2bM0 IV	NED (40)
T6	M	48	N	P	P	Transglottis	T4N2cM0 IV	Loc/Rec (14)
T7	M	53	C	P	P	Transglottis	T2N2M0 III	Loc/Rec (5)
T8	M	58	C	P	P	Transglottis	T4N0M0 IV	NED (30)
T9	M	72	N	P	P	Transglottis	T3N0M0 III	NED (38)
T10	M	72	C	P	P	Vocal cords	T4N2cM0 IV	Loc/Rec (10)
T11	M	44	C	P	N	Vallecula, epiglottis	T4N2cM0 IV	NED (42)
T12	M	60	C	P	P	Pyriiform sinus	T4N2cM0 IV	Loc/Rec (7)
T13	M	52	C	P	P	Vallecula	T4N1M0 IV	Loc/Rec (4)
T14	M	67	C	P	P	Vallecula	T4N1M0 IV	Loc/Rec (5)
T15	M	61	C	P	P	Epiglottis, vocal cords	T4N0M0 IV	NED (30)

<sup>a</sup>M, male; F, female; <sup>b</sup>C, caucasian; N, negroid; <sup>c</sup>P, positive; N, negative and <sup>d</sup>NED, no evidence of disease; Loc/Rec, loco-regional recurrence.

Prior to RNA extraction, samples were re-examined, and Giemsa-stained microsections obtained from each side of the frozen block were used to delimit the spatial distribution of the tumor mass or non-tumor tissue. Microdissections were performed to ensure that >70% of the isolated RNA was derived from cancer cells. In the case of surgical margins, only the epithelial tissue was used. Microdissected tumor and non-tumor samples were returned to liquid nitrogen until use.

*RNA extraction.* Snap-frozen tissue samples were pulverized using a mortar pestle. Total RNA was isolated from tissue specimens and Hep2 cell culture using TRIzol reagent (Gibco BRL, Life Technologies). Total RNA was precipitated by incubating with 0.5 ml of isopropyl alcohol for 10 min, followed by centrifugation at 12,000 x g for 10 min at 4°C. The pellet was washed with 75% ethanol, solved in RNase-free water, passed through an RNeasy spin column (Qiagen) for purification and stored at -80°C until further use.

RNA quantity and quality were evaluated using a spectrophotometer, 1% agarose gel electrophoresis and micro-electrophoresis on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). RNA from the samples was of appropriately high quality for cDNA microarray analysis.

**Probe labeling and hybridization.** The experimental design employed a one-color approach to obtain gene expression measurements (27). Labeled targets for hybridizations were generated from total mRNA in reverse transcription reactions using oligo-dT primers, following the protocol accompanying the CyScribe First-Strand labeling kit strictly (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Total RNA (15  $\mu$ g) from each sample was mixed with 4  $\mu$ l anchored oligo (dT) (500  $\mu$ g/ml), in a total volume of 11  $\mu$ l, denatured at 70°C for 5 min, put on ice for 30 sec, spun down and placed at room temperature for 10 min. Then, 1  $\mu$ l of dNTP mix, 1  $\mu$ l of aminoallyl-dUTP, 2  $\mu$ l of 0.1 M DTT, 1  $\mu$ l of RNaseOUT (40 U/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l of 5X CyScript buffer and 1  $\mu$ l of CyScript reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ l) were added. The volume was adjusted to 20  $\mu$ l with water. After incubation for 3 h at 42°C, RNA was hydrolyzed by adding 2  $\mu$ l of 2.5 N NaOH for 15 min at 37°C. Samples were then neutralized with 10  $\mu$ l of 2 M HEPES-free acid, and reactions were purified using 96-well Millipore multiscreen filter plates as follows: 5 volumes of 5.3 M guanidine-HCl and 150 mM KOAc were added to labeling reactions. The mixture was applied onto the plate and washed 4 times with 80% EtOH by centrifugation at 3500 rpm for 5 min. Residual ethanol was spun out by an additional centrifugation at 3500 rpm for 5 min. Labeled targets were eluted in 50  $\mu$ l 10 mM Tris pH 8.5, by spinning at 3000 rpm for 5 min, dried on a SpeedVac and kept at -20°C, protected from light until use. cDNA was re-suspended in 40  $\mu$ l of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> and reacted with monoreactive NHS-ester Cy5 dye. The reaction was incubated for 2 h at room temperature and purified.

Labeled targets were re-suspended in 250  $\mu$ l of 1X hybridization buffer [25% formamide, 12.5% of proprietary Microarray Hybridization Buffer Version 2 (Amersham Biosciences)], denatured for 2 min at 92°C and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The Cy5- (tumor or non-tumor sample) labeled cDNAs were incubated individually with microarrays using an Automated Slide Processor (ASP, GE Healthcare) for 16 h at 42°C. Following hybridization, slides were washed (1.0X SSC, 0.2% SDS for 10 min at 55°C; 0.1X SSC, 0.2% SDS for 10 min at 55°C; 0.1X SSC, 0.2% SDS for 10 min at 55°C; 0.1X SSC for 1 min at RT; 0.1X SSC for 1 min at RT and dH<sub>2</sub>O for 10 sec at RT), and dried with a N2 stream.

**Data measurement and normalization.** Processed slides were scanned with a 700 V PMT setting (GenIII scanner, Amersham Biosciences), and background-subtracted artifact-removed median intensities of Cy5 emissions were extracted for each spot from raw images, using the ArrayVision V.7.2 software (Imaging Research Inc., Ontario, Canada). An array grid was automatically aligned to locate the position of each spot in the array, and then manually adjusted to obtain the best possible alignment.

To make the experiments comparable, intensity data from each hybridized test sample was normalized by Local

weighted scatter-plot smoothing LOWESS (28). Intensity data from a sample with total energy comparable to the average intensity of the samples was used as a reference in the LOWESS normalization procedure. Raw and normalized microarray intensities are deposited in the GEO database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) under the accession number GSE10288.

**Statistical analysis of microarray data.** To identify genes with a significantly altered expression in larynx tumors, a signal-to-noise ratio (SNR) metric (29) was used to compare the expression intensity data from tumor and non-tumor samples. The SNR parameter is essentially a measure of signal strength relative to background noise. The distance between the two groups was measured by a signal (expression intensity) to noise (variation) ratio. The signal-to-noise comparison gives an indication of the level of separation for the means of the two distributions defining the gene intensities of the two groups, and was calculated as:

$$\text{SNR} = \sqrt{2(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)/(S_1 + S_2)}$$

where  $\bar{X}_1$  and  $\bar{X}_2$ , respectively, are the mean intensities of tumor and non-tumor groups, and  $S_1$  and  $S_2$ , respectively, the corresponding standard deviations. For each gene, higher absolute SNR values indicate a greater difference of expression between tumor and non-tumor samples, with a lower dispersion within each group. A cut-off  $\text{SNR} \geq |1|$ ,  $p \leq 0.001$  was used to select differentially expressed genes. Statistical significance of the differential expression (p-values) was ascertained by bootstrap re-sampling, i.e., by re-calculating SNR values following 10,000 random permutations of sample labels and computing the frequency at which each SNR value measured in the original set was observed in the randomly permuted data (29). Expression profiles of selected transcripts were grouped using hierarchical clustering (UPGMA with Euclidean distance) and visualized using the computer software Spotfire Decision Site (Spotfire, Somerville, MA, USA).

**Real-time RT-PCR experiments and statistical analysis.** For an independent validation of the array data, we selected 14 genes which were down-regulated in tumor tissues as measured by microarray analysis. The cDNA sequence of each gene was selected from the internationally published databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and gene-specific primers for real-time RT-PCR were designed for optimal hybridization kinetics, using the Primer 3.0 program (25). Amplification primers were designed into different exons, to avoid the amplification of any contaminating genomic DNA. Primer sequences are shown in Table III.

For validation, we used total RNA from 15 tumor samples (T1-T15) and a pool of RNA from 7 histologically normal larynx mucosa tissue samples adjacent to tumors, considered here as a normal reference. Double-stranded cDNA was synthesized from total RNA, using high-capacity cDNA archive (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR was performed using the ABI prism 7300 sequencer detector system and SYBR-Green PCR core reagent

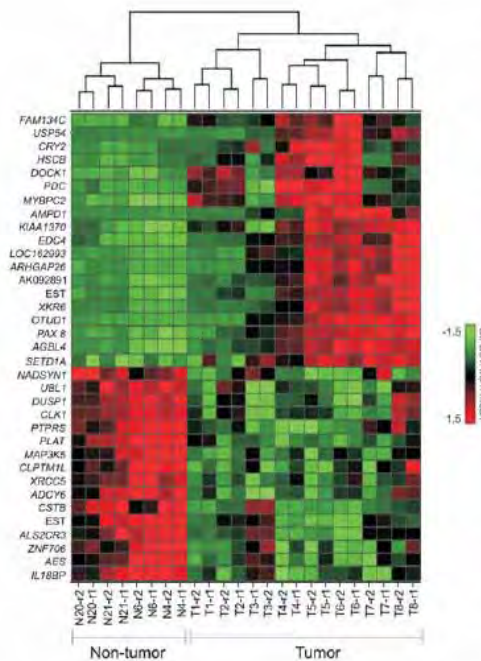


Figure 1. Supervised hierarchical clustering of 8 larynx tumor and 4 non-tumor samples used in the training set. A total of 35 differentially expressed genes was identified, using a signal-to-noise ratio of  $>111$  and  $p \leq 0.001$  as cut-offs. Selected transcripts were grouped using hierarchical clustering (Wards method with half square Euclidean distance), and heat maps were constructed using the Spotfire software. For each gene (row), red indicates a higher expression and green a lower one relative to the average level of expression of that gene across the 35 samples (columns).

(Applied Biosystems) following the manufacturer's protocol. In brief, the reaction mixture (20  $\mu$ l total volume) contained 25 ng of cDNA, gene-specific forward and reverse primers for each gene at a final concentration of 0.4 or 0.5  $\mu$ M, and 10  $\mu$ l of 2X quantitative SYBR-Green PCR master mix. The relative quantification was given by the CT values, determined for triplicate reactions for tumor and reference samples from each gene and for the endogenous control ( $\alpha$ -tubulin, *TUBA1C*). Thus, the fold-change of each gene was calculated by using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  formula, where  $CT =$  fluorescence at the defined detection threshold;  $\Delta CT = CT$  of the target gene -  $CT$  of the endogenous control and  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (tumor sample) -  $\Delta CT$  (reference sample). For the tumor sample, evaluation of  $2^{-\Delta\Delta CT}$  indicates the fold change in gene expression relative to the reference sample.

Statistical analysis was performed using the Minitab software (version 12.22) and the significance level was defined as  $\alpha=0.05$ . Relative expression levels detected by quantitative real-time RT-PCR for the 14 genes in samples from larynx carcinoma were transformed into natural logarithms. The Anderson-Darling normality test was performed to determine whether or not the values presented a normal distribution. As

this test did not reject normality for the 14 genes, data were subjected to a one-sample Student's t-test on their expression levels at the logarithmic scale.

## Results

**Epidemiology.** The study population included 14 males and 1 female with larynx carcinoma. Minimum and maximum ages were 44 and 73 years, respectively, with a mean age of  $58.7 \pm 9.8$  years. Patients at the UICC stage were: 1 T2, 2 T3 and 12 T4, while at the neck stage, there were: 7 N0, 2 N1 and 6 N2 patients. Thus, 93% of the patients had T3-T4 tumors and 60% had regional metastases at presentation. None of the patients had distant metastases upon diagnosis of the disease. Regarding the clinical stage, 3 patients had stage III and 12 had stage IV. Six patients presented no clinical evidence of the disease at the last follow-up, and 9 patients showed disease recurrence. Recurrence occurred between 4 and 14 months after surgery. Our data are in agreement with the literature, since 40-50% of patients with advanced disease (stage III and IV) exhibited recurrence, and ~80% of these recurrences occurred within the first two years. Regarding the risk factors, 100% were smokers and 94% used to consume alcohol. Therefore, most of these patients had a history of smoking and drinking, which are the major etiological factors in larynx cancer. Patient data are presented in Table I.

**Gene expression analysis of larynx tumors.** Expression analysis using the 331-element cDNA microarray was initially performed on 8 larynx tumor (T1-T8) and 4 larynx non-tumor samples.

Differentially expressed genes were identified using the signal-to-noise ratio (SNR) metric as described in Materials and methods. Of the 285 genes analyzed, 35 (12% of the total) showed statistically significant differences in the expression between tumor and adjacent non-tumor larynx tissue (SNR  $\geq 1.0$ ,  $p \leq 0.001$ ). Among these 35 genes, 19 (54%) showed a higher expression in tumor than in non-tumor tissue, and 16 (46%) presented the contrasting pattern.

Supervised hierarchical clustering analysis revealed that the expression patterns of the selected set of 35 differentially expressed genes were able to perfectly distinguish tumors from non-malignant tissues in the set of samples used in this training set (Fig. 1). Two subgroups of tumor samples were distinguishable in the training set based on the expression profile of the 35 genes (Fig. 1), suggesting heterogeneity among larynx cancer cases. Separation of these samples into 2 subgroups does not appear to correlate with the clinical staging or metastatic features of the tumors. In contrast, we observed a statistically significant difference ( $p=0.030$ ) in the mean age of patients upon disease presentation in each subgroup: in one, the ages of patients ranged between 44 and 58 years ( $51 \pm 5.5$ ), and in the other from 61 to 73 ( $68 \pm 4.7$ ).

To verify the robustness of the 35-gene signature, we investigated whether this gene set was able to distinguish tumor from non-tumor larynx tissues, using data from an additional set of 5 larynx tumor samples (T9, T10, T11, T14 and T15) and 6 additional adjacent non-tumor larynx tissue samples. As shown in Fig. 2, the 35-gene set was able to separate this additional set of larynx samples according to

Table II. The 35 genes showing down- or up-regulation in larynx cancer.

Locus name	EST accession/ HN contig name	Annotation	Genome mapping	Ratio tumor/ non-tumor (log <sup>2</sup> )	Biological function/molecular process
<i>NADSYN1</i>	BF825810	NAD synthetase 1	11q13.4	-1.1	Nucleotide binding/NAD biosynthetic process
<i>CSTB</i>	R1_CL240674_CT4	Cystatin B	21q22.3	-1.0	Cysteine protease inhibitor activity/protease inhibition
<i>EST</i>	B1002390	Intergenic region	2q31.2	-0.8	Unknown
<i>UBL1</i>	R1_CL327107_CT1	Ubiquitin-like 1 (sentrin)	2q33.1	-0.8	SUMO-conjugating enzyme activity/DNA repair
<i>PLAT</i>	R1_CL186187_CT2	Plasminogen activator tissue type isoform 2	8p11.21	-0.7	Plasminogen activator activity/proteolysis
<i>CLK1</i>	R1_CL306959_CT1	CDC-like kinase 1	2q33.1	-0.6	Protein serine/threonine kinase activity/cell proliferation
<i>DUSP1</i>	R1_CL117820_CT4	Dual specificity phosphatase 1	5q35.1	-0.6	MAP kinase phosphatase activity/cell cycle
<i>XRCC5</i>	R1_CL315103_CT23	X-ray repair defective repair in Chinese hamster cells	2q35	-0.5	ATP-dependent DNA helicase activity/DNA repair
<i>ALS2CR3</i>	R1_CL303821_CT1	Amyotrophic lateral sclerosis 2 chromosome region, candidate 3	2q33.1	-0.4	GABA receptor binding/neurotransmitter transport
<i>CRR9</i>	R1_CL315539_CT1	Cisplatin resistance-related protein CRR9p	5pter15.33	-0.4	Unknown
<i>ZNF706</i>	R1_CL164403_CT3	Protein zinc finger 706	8q22.3	-0.4	Nucleic acid binding
<i>AES</i>	R1_CL309068_CT2	Amino-terminal enhancer of split isoform b	19p13.3	-0.4	Transcription corepressor activity/transcriptional regulation
<i>MAP3K5</i>	R1_CL237238_CT1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	6q25.1	-0.4	MAP kinase kinase activity/apoptosis
<i>IL18BP</i>	R1_CL305797_CT10	Interleukin 18 binding protein precursor	11q13.4	-0.4	Receptor antagonist activity/T-helper 1 type immune response
<i>ADCY6</i>	R1_CL17269_CT2	Adenylate cyclase 6 isoform a	12q14.1	-0.4	Adenylate cyclase activity/cAMP biosynthesis
<i>PTPRS</i>	R1_CL310075_CT12	Protein tyrosine phosphatase receptor type	19p13.3	-0.3	Protein tyrosine phosphatase activity/cell adhesion
<i>PDC<sup>c</sup></i>	CV374356	Phosducin isoform a	1q25.2	1.0	Phospholipase inhibitor activity/response to stimulus
<i>SETD1A<sup>e</sup></i>	B1000562	SET domain containing 1A	16p11.2	1.0	Nucleotide and protein binding/chromatin modification
<i>KIAA1370<sup>f</sup></i>	B1002185	Hypothetical protein LOC56204	15q21.2	1.1	Unknown

Table II. Continued.

Locus name	EST accession/ HN contig name	Annotation	Genome mapping	Ratio tumor/ non-tumor (log <sup>2</sup> )	Biological function/molecular process
<i>DOCK1</i>	BF828101	Dedicator of cytokinesis 1	10q26.2	1.2	GTPase activator activity/apoptosis
<i>MYBPC2</i>	BF826295	Myosin-binding protein C fast type	19q13.33	1.3	Actin binding/cell adhesion
<i>FAM134C</i>	BF377952	Family with sequence similarity 134, member C	17q21.31	1.4	Unknown
EST	AW984383	Intergenic region	6q14.1	1.5	Unknown
<i>AGBL4<sup>a</sup></i>	AW984388	ATP/GTP binding protein-like 4	1p33	1.6	Carboxypeptidase A activity/proteolysis
<i>PAX 8</i>	B1004213	Paired box gene 8	2q13	1.6	Transcriptional activator activity/transcriptional regulation
<i>HSCB</i>	B1003653	HscB iron-sulfur cluster co-chaperone homolog	22q12.1	1.8	Chaperone binding/protein folding
<i>XKR6<sup>a</sup></i>	B1002820	Kell blood group complex subunit-related family, member 6	8p23.1	1.9	Unknown
<i>EDC4</i>	BQ359764	Enhancer of mRNA decapping 4	16q22.1	2.0	Protein binding
<i>CRY2</i>	B1004402	Cryptochrome 2 (photolyase-like)	11p11.2	2.0	Nucleotide and protein binding/transcriptional regulation
<i>ARHGAP26</i>	B1002158	Rho GTPase activating protein 26	5q31	2.1	Rho GTPase activator activity/signal transduction
<i>LOC162993<sup>a</sup></i>	B1000521	LOC162993 hypothetical protein	19p13.2	2.2	Unknown
AK092891	B1001659	Homo sapiens cDNA FLJ35572	17q21.31	2.4	Unknown
<i>OTUD1</i>	BE154599	OTU domain containing 1	10p12.2	3.2	Unknown
<i>USP54</i>	BE153900	Ubiquitin-specific peptidase 54	10q22.2	3.3	Ubiquitin thiolesterase activity/ubiquitin-dependent protein catabolism
<i>AMPD1</i>	BF827836	Adenosine monophosphate deaminase 1	1p13	3.5	AMP deaminase activity/nucleotide metabolic process

<sup>a</sup>EST mapping to intronic region of the annotated gene locus. HN, head and neck.

their histological type, thus confirming the robustness of this gene classifier.

A functional classification of the selected 35-gene set was performed manually by querying the Entrez Gene database (30). We observed that these genes are involved in processes such as apoptosis, cell adhesion, cell cycle, cell motility, DNA repair, metabolism, proteolysis, signal transduction and transcriptional regulation (Table II). Thus, of the 19 genes identified and overexpressed in larynx tumors, 2 were involved in signal transduction, 2 in transcriptional regulation and 1 each in apoptosis, catabolism, cell adhesion, chromatin modification, folding protein, metabolism and response to stimulus, and 8 with unknown functions. Of the 16 genes under-expressed in larynx tumors, 2 were involved in cell cycle, 2 in DNA repair, and 1 each in apoptosis, biosynthesis, cell adhesion, immune response, protease inhibition, proteolysis, transcription regulation and transport, and 4 with unknown functions.

Interestingly, 6 of the 35 transcripts identified map to intronic regions of protein-coding genes (Table II). While these partial transcripts may represent non-annotated exons of these genes, no significant open-reading frames and coding-potential was observed, as determined by the ESTScan software (31), suggesting that these genes represent as yet uncharacterized non-coding RNAs that are deregulated in larynx tumors.

**Validation of markers of larynx carcinoma by real-time RT-PCR.** Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) was employed to validate the larynx tumor gene expression by an independent method. We compared the relative expression levels of the 14 genes *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CLK1*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *IL18BP*, *MAP3K5*, *PLAT*, *PTPRS*, *UBL1*, *XRCC5* and *ZNF706* using triplicate measurements and normalization based on the  $\alpha$ -tubulin level. Data were analyzed using Student's t-test. Seven genes were statistically under-

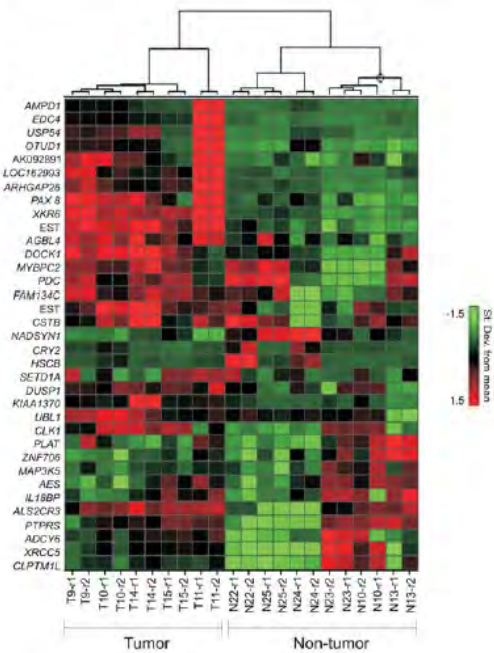


Figure 2. Validation of the 35-gene classifier in an independent set of tumor and non-tumor larynx samples. Expression of the 35 genes identified in the training set was measured in an independent validation set comprised of 5 tumor and 6 non-tumor samples. Selected transcripts were grouped using hierarchical clustering (Wards method with half square Euclidean distance), and heat maps were constructed using the Spotfire software. For each gene (row), red indicates a higher expression and green a lower one, relative to the average level of expression of that gene across the 35 samples (columns).

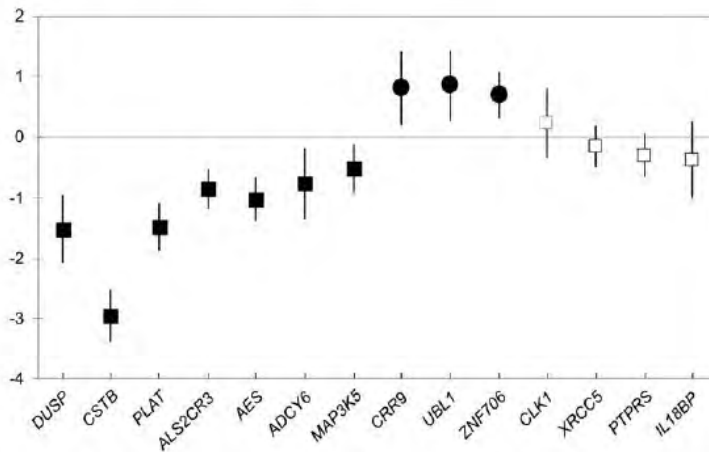


Figure 3. Mean and 95% confidence interval for the natural logarithms of the relative expression values of genes selected for validation by quantitative real-time RT-PCR. Expression of *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5* and *PLAT* (black squares) was significantly lower in tumor tissues than in normal reference. Expression of *CRR9*, *UBL1* and *ZNF706* was significantly higher in tumor tissues than in normal reference (black circles). *CLK1*, *IL18BP*, *PTPRS* and *XRCC5* were not confirmed by real-time RT-PCR as differentially expressed (white squares).

Table III. Primer sequences used for validation by quantitative real-time PCR.

Gene	Forward (F) and reverse (R) primers	Amplicon size (bp)
<i>ADCY6</i>	F - 5' - ACACCTGCTGACATCACTGC - 3' R - 5' - GACAGAGCTGGCCAAGAGAC - 3'	150
<i>AES</i>	F - 5' - CCCAGCAACTCAAATTCACC - 3' R - 5' - CTCCTGGCCAACCTTGTAC - 3'	116
<i>ALS2CR3</i>	F - 5' - TTGCCTTCGAGGTTTTATGC - 3' R - 5' - ATGGTTCCCAAGTTTGGTTG - 3'	108
<i>TUBA1C</i>	F - 5' - TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG - 3' R - 5' - AGTGCCAGTGCGAACTTCATC - 3'	241
<i>CLK1</i>	F - 5' - AGGAGCATTTAGCAATGATG - 3' R - 5' - CCAGTCTAATCGATCGTGGTG - 3'	104
<i>CRR9</i>	F - 5' - TGGGTGCTGAGAACAAACATC - 3' R - 5' - ACAGCGTCCCATTGTTTCTC - 3'	120
<i>CSTB</i>	F - 5' - TGTCATTCAAGAGCCAGGTG - 3' R - 5' - GGGAGAGATTGGAACACTCG - 3'	100
<i>DUSP1</i>	F - 5' - GCGGAATCTGGGTGCAGTT - 3' R - 5' - CAGGTACAGAAAGGGCAGGATTT - 3'	81
<i>IL18BP</i>	F - 5' - TAAGCAGTGTCCAGCATTGG - 3' R - 5' - AGGCCACACAGGATAAGCTC - 3'	83
<i>MAP3K5</i>	F - 5' - ACCGAAGAGAAGGGGAGAAAG - 3' R - 5' - CCGACCTGCGTAGACTATCC - 3'	135
<i>PLAT</i>	F - 5' - GAGTGCACCAACTGGAACAG - 3' R - 5' - GGCTTTGAGTCTCGATCTGG - 3'	125
<i>PTPRS</i>	F - 5' - TCCTGCGAGAGTTCAAGGTC - 3' R - 5' - GACTTTGGCACACCCTGTTC - 3'	100
<i>UBL1</i>	F - 5' - TGACAAACATCTCAAGAACTCAAA - 3' R - 5' - TCTCTGACCCTCAAAGAGAAACCT - 3'	92
<i>XRCC5</i>	F - 5' - ACCAAAGAGGAAGCCTCTGG - 3' R - 5' - CGTCCACATCACCACTTC - 3'	121
<i>ZNF706</i>	F - 5' - AAATGCCAAAAAGCAAGCTG - 3' R - 5' - TGCTTGCTCTCAAAGTGCTG - 3'	147

expressed in tumor samples compared to the normal reference, while three genes were statistically overexpressed. These data are summarized in Fig. 3. The complete data with the relative expression levels detected by quantitative real-time PCR for the 14 genes in samples from larynx carcinoma are shown in Table IV.

We confirmed by qRT-PCR that genes *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5* and *PLAT* are significantly down-regulated in tumor tissues compared to the normal reference ( $p=0.012$ ,  $<0.0001$ ,  $<0.0001$ ,  $<0.0001$ ,  $<0.0001$ ,  $0.014$  and  $<0.0001$ , respectively). These genes, except *ALS2CR3*, are located in regions of chromosomal loss involved in head and neck carcinogenesis. The results of

qRT-PCR were in agreement with those of the cDNA microarray analysis, further supporting evidence that these are potential cancer-related genes.

We found by qRT-PCR that genes *CRR9*, *UBL1* and *ZNF706* were significantly up-regulated in tumor tissues when compared to the normal reference ( $p=0.011$ ,  $0.007$  and  $0.001$ , respectively). It should be noted that these genes displayed expression patterns which were in contrast to the cDNA microarray analysis results. These genes are located in regions of chromosomal gains involved in head and neck carcinogenesis. The differential expression of *CLK1*, *IL18BP*, *PTPRS* and *XRCC5* was not confirmed by qRT-PCR ( $p=0.406$ ,  $0.222$ ,  $0.083$  and  $0.340$ , respectively).

Table IV. Natural logarithms of relative expression levels detected by quantitative real-time PCR for the 14 genes in samples from larynx carcinoma.<sup>a</sup>

Sample	Gene													
	ADCY6	AES	ALZSCR3	CLK1	CRR9	CSTB	DUSP1	IL18BP	MAP3K5	PLAT	PTPRS	UBL1	XRCC5	ZNF706
T1	-0.58	-1.64	-0.93	-0.18	1.07	-3.56	-3.86	0.15	-0.46	-1.06	0.98	1.24	-0.33	0.08
T2	-0.14	-1.57	-0.34	0.37	2.20	-2.61	-1.00	-1.38	0.13	-2.28	0.18	1.38	0.58	1.09
T3	0.24	-0.40	-0.20	1.62	1.80	-2.65	-1.28	-0.30	0.43	-1.41	0.47	1.55	0.16	1.48
T4	-1.96	-1.82	-1.28	1.07	1.20	-2.59	-2.14	-1.62	-0.77	-1.33	-0.62	2.50	-1.59	1.47
T5	-3.26	-1.74	-0.94	0.78	0.06	-2.92	-1.02	-1.68	-0.91	-2.80	-1.30	1.58	0.06	-0.56
T6	-0.72	-0.85	-0.15	1.32	1.38	-1.99	-0.36	0.42	-0.87	-1.84	-0.31	1.05	0.14	0.84
T7	-1.86	-0.20	-1.85	1.77	2.71	-4.47	-0.27	-1.12	-1.98	-2.47	-1.14	1.81	0.12	0.30
T8	0.02	-0.92	-0.68	0.89	1.20	-2.74	-2.43	-0.72	-0.37	-1.07	-0.26	2.15	0.39	0.96
T9	-1.21	-0.81	-1.25	-1.30	-0.27	-1.62	-2.42	-0.72	-0.43	-1.59	-0.25	-1.05	-0.21	0.56
T10	0.76	-0.76	-0.85	-0.52	0.34	-2.75	-0.37	1.10	-0.08	-1.40	0.20	0.20	-0.90	0.30
T11	-0.66	-1.19	-0.76	-0.65	0.05	-2.86	-1.83	-2.01	-0.95	-1.89	-0.21	-0.19	-0.31	0.89
T12	-1.53	-1.95	-1.91	-0.99	-1.27	-4.04	-2.44	-0.65	-0.94	-0.74	-0.23	0.45	0.10	1.80
T13	-0.12	0.30	0.24	0.75	1.76	-2.35	-0.59	0.96	0.50	-0.61	-0.60	1.14	0.54	-0.32
T14	-0.42	-0.93	-1.22	-1.10	-0.43	-3.78	-1.67	0.02	-1.53	-1.55	-1.17	-0.61	-0.95	0.66
T15	-0.12	-0.90	-0.76	-0.42	0.47	-3.53	-1.14	1.92	0.37	-0.24	-0.22	-0.25	-0.10	0.90
Mean ± SD	-0.77± 1.0	-1.02± 0.6	-0.86± 0.6	0.23± 1.0	0.82± 1.1	-2.97± 0.8	-1.528± 1.0	-0.37± 1.1	-0.52± 0.7	-1.49± 0.7	-0.30± 0.6	0.86± 1.1	-0.15± 0.6	0.70± 0.7
P-value	0.012	0.000	0.000	0.406	0.011	0.000	0.000	0.222	0.014	0.000	0.083	0.007	0.340	0.001

<sup>a</sup>A pool of RNA isolated from 7 histologically normal larynx mucosa tissue samples adjacent to tumors were used as a reference. Experiments were performed in triplicate reactions and normalized for an endogenous control ( $\alpha$ -tubulin). Statistical significance (P-value) was determined by one-sample Student's t-test as described in Materials and methods.

## Discussion

The current literature includes several studies which included DNA microarray analysis in the study of HNSCC, to determine gene expression changes during disease progression and/or predict disease outcome. However, considerable heterogeneity among these studies exists in terms of study design, number of samples, sites and stage of disease, choice of microarray platform and validation of results by other laboratory methodologies (7). Many studies in HNSCC have been performed using tumors from various anatomical sites, but carcinomas from different upper aerodigestive tract sites may behave differently. Consequently, the results may be misleading when analyzed together. Larynx cancer is one of the most common types of HNSCC, with high mortality rates and poor prognosis (32).

Considering the above, our study examined, by microarray technology, the expression levels of 284 genes in clinical samples of larynx squamous cell carcinoma and non-neoplastic larynx tissue, identifying 35 genes as differentially regulated in tumor as compared to non-tumor tissue. The genes detected are primarily involved in processes such as apoptosis, cell cycle, DNA repair, proteolysis, protease inhibition, signal transduction and transcriptional regulation. Interestingly, six of the transcripts identified map to intronic regions of protein-coding genes. These sequences are unspliced and apparently have no coding potential. Long intronic non-coding RNAs (ncRNAs) are ubiquitously transcribed in the human genome (33,34) and a subset of these ncRNAs were shown to correlate with the degree of tumor cell differentiation in prostate cancer (35). We postulate that the intronic transcripts identified here comprise of as yet uncharacterized long ncRNAs that have a regulatory role in the gene expression program in larynx tissues and are deregulated in the neoplastic tissue.

Microarray data were further confirmed by real-time RT-PCR in a set of 14 genes which were found to be down-regulated in tumor tissues by microarray analysis. Of the genes analyzed by microarray some showed similar patterns of expression by real-time RT-PCR. Thus, of the 14 selected genes tested by microarray and real-time RT-PCR, 7 showed congruent and significant down-regulation in tumor tissue, 3 displayed contrasting expression patterns with the two methods, while 4 did not exhibit any significant change in expression by real-time RT-PCR. One possible source of variation in the measurements of mRNA expression detected by microarray and real-time RT-PCR is the existence of different splicing isoforms, which may affect the transcript levels detected in different regions of the mRNA with these two techniques (36). This result highlights the importance of performing independent real-time RT-PCR validation following the identification of candidates by high-throughput microarray screening before further conclusions on gene expression can be drawn (37).

In the present study, 10 potential biomarkers of larynx carcinoma were validated and showed pronounced differences in expression between tumor and non-neoplastic samples. The validated markers were genes *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CRR9*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT*, *UBL1* and *ZNF706*.

The expression of genes *ADCY6*, *AES*, *ALS2CR3*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5* and *PLAT* was significantly lower in tumor

tissues than in the non-tumor adjacent tissue. Interestingly, these genes, except *ALS2CR3*, are located in regions of chromosomal loss involved in head and neck carcinogenesis.

Gene *ADCY6*, located at 12q14.1, encodes adenylate cyclase 6, which is a membrane-associated enzyme that catalyzes the formation of the secondary messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP). No information is available in the literature on *ADCY6* expression in head and neck cancer. However, Celano *et al* (38) observed that its expression is significantly lower in hyperfunctioning thyroid tumors than in normal thyroid tissue, evidencing a low expression of this gene in transformed tissues.

The amino-terminal enhancer of the split (*AES*) gene, located at 19p13, encodes a 197-amino acid protein that is homologous to the NH(2)-terminal domain of the *Drosophila* Groucho protein but lacks COOH-terminal WD40 repeats. According to data of Tetsuka *et al* (39), *AES* acts as a corepressor for NF- $\kappa$ B, which is well recognized as a regulator of genes encoding cytokines, chemokines and cell adhesion molecules important in immune and inflammatory responses, as well as critical genes in the control of cellular proliferation and apoptosis (40).

Additionally, *AES* inhibits NF- $\kappa$ B,-dependent gene expression induced by tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$ , and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase kinase 1, which is an upstream kinase for NF- $\kappa$ B activation (39). There is evidence that nuclear factor NF- $\kappa$ B modulates a broad program of genes differentially expressed during tumor progression of HNSCC, such as *CCND1* (*PRADI*), *Gro-1* (IL-8 homologue) and *GST* (41). Thus, the *AES* gene may play a role in head and neck carcinogenesis since it acts in the regulation of NF- $\kappa$ B and its target genes. Moreover, gene *AES* acts on the Wnt receptor signaling pathway. The nuclear output of Wnt signaling is mediated by a complex between DNA-binding proteins of the TCF family and the transcriptional coactivator  $\beta$ -catenin. The Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf pathway serves important functions in embryonic development and is constitutively activated in human colorectal cancer (42,43). Groucho proteins, which include *AES*, act to repress transcriptional activation by the  $\beta$ -catenin-tcf complex, probably by interacting directly with Tcf transcriptional factors (42). Thus, the low expression of the *AES* gene may contribute to a higher activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin/Tcf signaling model and consequently to larynx carcinogenesis, as occurs in colorectal cancer.

The *ALS2CR3* gene, located at 2q33.1, is denominated as *GRIF-1* and *TRAK2*. This gene encodes a factor that interacts with the  $\gamma$ -aminobutyric acid (A) receptor and plays a role in the intracellular transport, mainly in the kinesin-mediated transport of mitochondria (44). Alterations of this gene have been associated with neurodegenerative diseases (45). Currently, however, no studies are available in the literature describing alterations of *ALS2CR3* in tumor tissues.

Cystatin B, also called stefin B, is a small protein that is a member of the superfamily of cysteine protease inhibitors. Cystatins have emerged as important players in a multitude of physiological and pathophysiological settings that range from cell survival and proliferation to differentiation, cell signaling and immunomodulation (46). Cysteine proteases,

in turn, have been implicated in multiple steps of tumor progression, including early steps of immortalization and transformation (47), intermediate steps of tumor invasion and angiogenesis (48), and late steps of metastasis and drug resistance (49). The importance of lysosomal cysteine proteases in the progression of tumors from benign to aggressive lesions suggests that cystatins in many ways safeguard against tumor progression (46).

In a review on gene expression profiles, a low expression of the *CSTB* (cystatin B) gene, located at 21q22.3, was reported in 5 of 24 HNSCC microarray studies (7). A decrease of *CSTB* expression was observed in esophageal carcinoma, breast cancer, prostatic adenocarcinomas and atypical meningiomas (50-53).

The *DUSP1* gene, also referred to as *MSP-1* and located at 5q35.1, encodes a dual-specificity phosphatase for tyrosine and threonine (54). This gene specifically inactivates mitogen-activated protein kinase and suppresses its activation by *ras*. The *DUSP1* gene is also a transcriptional target of tumor suppressor p53, inducing cell cycle arrest or apoptosis. Consequently, *DUSP1* may play an important role in the negative regulation of cell proliferation (54,55).

A low expression of *DUSP1* has been observed in ovarian and prostate cancer (56,57). Moreover, in line with our study, Tomioka *et al.* (58) observed a low expression of this gene in head and neck cancer. These authors considered *DUSP1* a candidate for tumor suppression, mediating PTEN signaling pathways. Unoki and Nakamura (59) reported that *DUSP1* gene expression was induced by the introduction of exogenous *PTEN* into endometrial cancer cell lines.

In addition, *DUSP1* plays a vital role in the regulation of innate immune responses via the p38 MAPK and JNK pathways and appears to play a role in the induction of senescence through the inhibition of AP-1 activity and the subsequent transcription of genes involved in DNA replication (60,61).

Gene *MAP3K5*, located at 6q25.1 and denominated as apoptosis signal-regulating kinase 1 (*ASK1*), encodes a multi-functional serine/threonine kinase involved in a broad range of biological activities including cell differentiation and stress-induced apoptosis (62,63). Its catalytic activity can be activated by many stress stimuli such as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), reactive oxygen species (ROS), DNA damage and chemotherapeutic agents such as cisplatin and taxol, and selectively activates JNK and p38 MAPK pathways (64).

The pro-apoptotic role of *MAP3K5* is reinforced by Dasgupta *et al.* (65) and Kherrouche *et al.* (66). Dasgupta *et al.* (65) described a physical and functional interaction between *MAP3K5* and the Rb protein in response to apoptotic stimuli. The Rb protein has antiproliferative and antiapoptotic functions. It appears that *MAP3K5* has to overcome RB functions to induce apoptosis. Moreover, the *MAP3K5*-mediated inactivation of Rb correlates with increased levels of the pro-apoptotic protein p73. Kherrouche *et al.* (66) suggest that the overexpression of *E2F1* induces the expression of *MAP3K5* and that some of the cellular functions of *MAP3K5* are under the control of the E2F transcriptional factor. The authors also suggest that the up-regulation of *MAP3K5* favor the p53-independent E2F1 apoptotic activity. However, no information is available in the literature regarding *MAP3K5* expression in head and neck cancer.

The *PLAT* gene, located at 8p11.21, encodes the tissue-type plasminogen activator, a secreted serine protease which converts the proenzyme plasminogen to plasmin, a fibrinolytic enzyme (67). Numerous studies have provided evidence that plasminogen activators (PA)/plasmin systems represent a key event in angiogenesis. It is well established that tumor-induced neovascularization and angiogenesis are necessary requirements for the growth of tumors and their metastases. The PA/plasmin system comprises two major types of PA, tissue (PLAT) and urokinase (PLAU) (68).

In contrast to *PLAU*, for which considerable evidence indicates that up-regulation of the enzyme correlates with tumor aggression, several observations suggest that high *PLAT* levels correlate with good prognosis in melanoma and breast cancer, whereas lower *PLAT* levels have been associated with malignant tumors (69,70). These findings suggest that an increase in either *PLAT* activity or expression levels is beneficial, possibly due to the overstimulation of plasmin generation by *PLAT* that induces the degradation of the pro-angiogenic fibrin matrix, resulting in the inhibition of angiogenesis (71,72). Moreover, Gingras *et al.* (72,73) reported that Neovastat, an inhibitor of angiogenesis derived from marine cartilage, specifically stimulates *PLAT*-dependent plasmin generation through an increase in the affinity of the enzyme towards plasminogen.

Expression of the *CRR9*, *UBL1* and *ZNF706* genes was significantly higher in tumor tissues than in the normal reference. These genes are located in regions of chromosomal gains involved in head and neck carcinogenesis.

The *CRR9* gene, located at 5pter15.33, has an unknown function. A high expression of this gene was observed in a renal carcinoma cell line when compared to normal cells, as well as in a cell line of ovary cancer resistant to treatment with cisplatin (74,75). However, no information is available in the literature on *CRR9* expression in head and neck cancer.

The *UBL1* gene, also referred to as *SUMO-1* and located at 2q33.1, is likely to be involved in many cellular processes, including apoptosis, mitosis regulation, protein translocation, cell proliferation and transcriptional regulation. One function of the *UBL1* protein is to conjugate covalently with target proteins and modify their function. Consequently, in the nucleus, the transcriptional activities of *UBL1*-modified transcriptional factors including p53, c-jun, Sp-3, c-Myc and c/EBP families are reduced (76,77).

The *UBL1* protein forms a complex with *RAD51* and *RAD52* proteins in human cells, which play essential roles in DNA homologous recombination, DNA repair and cell proliferation. *UBL1* overexpression down-regulates DNA double-strand break-induced homologous recombination in CHO cells and reduces cellular resistance to ionizing radiation. Overexpression of *UBL1* reduces the fraction of bidirectional gene conversion tracts, and that of a mutant *UBL1* that is incapable of being conjugated retains the ability to inhibit homologous recombination (78). These results suggest a regulatory role for *UBL1* in homologous recombination.

The *UBL1* protein was found to repress *MAPK5* activation through physical interaction (79). Therefore, *UBL1* overexpression may contribute to carcinogenesis by decreasing DNA repair capacity and inhibiting *MAPK5* activation and, consequently, apoptosis. Currently, no information is available

in the literature on *UBL1* expression in head and neck cancer. However, a high *UBL1* expression was observed in a renal carcinoma cell line when compared to normal cells (80).

No information is available in the literature on *ZNF706* expression in cancer. The zinc finger gene family belongs to one of the largest families of transcriptional factors. Most zinc finger proteins bind to specific DNA sequences and are involved in the transcriptional regulation of gene expression. Members of the zinc finger family function as activators or repressors of gene transcription, regulating embryonic development as well as a variety of physiological processes in the adult (81). Zinc-finger-containing transcriptional factors have previously been involved in MAPK signaling pathway regulation. These factors are among the most widespread mechanisms of eukaryotic cell regulation (82).

According to the holistic model of cancer proposed by Hanahan and Weinberg (83), a malignant cell has to acquire 6 biological alterations to dictate pathogenesis: self-sufficiency in proliferative growth signals, insensitivity to growth inhibitor signals, evasion of apoptosis, limitless replication potential, sustained angiogenesis and the induction of invasion. By verifying this model, our study shows a set of differentially expressed genes, especially *AES*, *CSTB*, *DUSP1*, *MAP3K5*, *PLAT* and *UBL1* that can directly or indirectly feed these pathways.

Among the differentially expressed genes, we emphasize *CSTB*. Notably, this gene showed a low expression in the tumor samples analyzed by microarray and real-time RT-PCR. The *CSTB* gene has an antimetastatic function, since it inhibits lysosomal cysteine protease action. Despite mounting evidence showing that the expression of lysosomal cysteine proteases is aberrant in tumor versus normal cells, this class of proteases has yet to be investigated (46). Emphasis has been placed on metalloproteases as potential novel targets for anti-cancer chemotherapy. Clinical trials with cancer patients have provided no indication that metalloprotease inhibitors are successful (84). This has led to a growing interest in members of the cystatin superfamily for potential novel anti-cancer strategies, and pre-clinical studies are promising (85). Several clinical studies have shown that some cathepsins and/or cystatins may have diagnostic and/or prognostic value in a variety of cancer types (52,53,86). Since loco-regional relapse and metastasis appear to be significant contributing factors for the restricted survival of HNSCC patients (1), we suggest that the *CSTB* gene constitutes a good biomarker for larynx cancer and deserves more attention in future studies.

In conclusion, our microarray analysis revealed a gene expression signature of larynx tumors, including several genes whose deregulation is potentially associated with disease progression. Further studies are required to evaluate whether the genes identified in this study are specifically altered in larynx tumors or are deregulated in other head and neck tumors. These findings will contribute to the understanding of the molecular basis of larynx cancer, thus helping to improve diagnosis, treatment and patient outcome.

#### Acknowledgements

This work was mainly funded by grants and fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP), Brazil. Partial funding was available as a grant from the Ludwig Institute for Cancer Research under the James R. Kerr Program.

#### References

- Lothaire P, de Azambuja E, Dequanter D, *et al*: Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. *Head Neck* 28: 256-269, 2006.
- Döbrossy L: Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 24: 9-17, 2005.
- Chung CH, Levy S and Yarbrough WG: Clinical applications of genomics in head and neck cancer. *Head Neck* 28: 360-368, 2006.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer, Ministério da Saúde. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro. <http://www.inca.org.br>, 2008.
- Hunter KD, Parkinson EK and Harrison PR: Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 5: 127-135, 2005.
- Ragin CC, Modugno F and Gollin SM: The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* 86: 104-114, 2007.
- Choi P and Chen C: Genetic expression profiles and biology pathway alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 104: 1113-1128, 2005.
- Kim MM and Califano JA: Molecular pathology of head and neck cancer. *Int J Cancer* 112: 545-553, 2004.
- Angadi PV and Krishnapillai R: Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: correlation with histological differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103: 30-35, 2007.
- Kalyankrishna S and Grandis JR: Epidermal growth factor receptor biology in head and neck. *J Clin Oncol* 24: 2666-2672, 2006.
- Ruiz-Godoy RLM, Garcia-Cuellar CM, Herrera Gonzalez NE, *et al*: Mutational analysis of K-ras and Ras protein expression in larynx squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 25: 73-78, 2006.
- Papakosta V, Vairaktaris E, Vylliotis A, *et al*: The co-expression of c-myc and p53 increases and reaches a plateau early in oral oncogenesis. *Anticancer Res* 26: 2957-2962, 2006.
- Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH and Turek LP: p16(INK4a) Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol* 44: 133-149, 2007.
- Keum KC, Chung EJ, Koom WS, *et al*: Predictive value of p53 and PCNA expression for occult neck metastases in patients with clinically node-negative oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 135: 858-864, 2006.
- Hirai T, Hayashi K, Takumida M, Ueda T, Hirakawa K and Yajin K: Reduced expression of p27 is correlated with progression in precancerous lesions of the larynx. *Auris Nasus Larynx* 30: 163-168, 2003.
- Nemes JA: p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 34: 274-279, 2005.
- Gleich LL and Salamone FN: Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 9: 369-378, 2002.
- Thomas GR, Nadiminti H and Regalado J: Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Path* 86: 347-363, 2005.
- Belbin TJ, Singh B, Smith RV, Succi ND, *et al*: Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 10-18, 2005.
- Squire JA, Bayami J, Luk C, *et al*: Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: by comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. *Head Neck* 24: 874-887, 2002.
- Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, *et al*: Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. *Oncogene* 21: 2634-2640, 2002.
- Carinci F, Arcelli D, Lo Muzio L, *et al*: Molecular classification of nodal metastasis in primary larynx squamous cell carcinoma. *Transl Res* 150: 233-245, 2007.
- Reis EM, Ojopi EP, Alberto FL, *et al*: Large-scale transcriptome analyses reveal new marker candidates of head, neck, and thyroid cancer. *Cancer Res* 65: 1693-1699, 2005.

24. Knuutila S, Autio K and Aalto Y: Online access to CGH data of DNA sequence copy number changes. *Am J Pathol* 157: 689, 2000.
25. Rozen S and Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386, 2000.
26. International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours, 6th edition. Wiley-Liss, New York, 2002.
27. Peixoto BR, Vêncio RZ, Egidio CM, Mota-Vieira L, Verjovski-Almeida S and Reis EM: Evaluation of reference-based two-color methods for measurement of gene expression ratios using spotted cDNA microarrays. *BMC Genomics* 7: 35, 2006.
28. Quackenbush J: Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* 32: 496-501, 2002.
29. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, *et al.*: Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531-537, 1999.
30. Maglot D, Ostell J, Pruitt KD and Tatusova T: Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 35: D26-D31, 2007.
31. Iseli C, Jongeneel CV and Bucher P: ESTScan: a program for detecting, evaluating, and reconstructing potential coding regions in EST sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*: 138-148, 1999.
32. Vokes EE and Stenson KM: Therapeutic options for laryngeal cancer. *N Engl J Med* 349: 2087-2089, 2003.
33. Bimey E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, *et al.*: Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447: 799-816, 2007.
34. Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, *et al.*: Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol* 8: R43, 2007.
35. Reis EM, Nakaya HI, Louro R, *et al.*: Antisense intronic noncoding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* 23: 6684-6692, 2004.
36. Hedge PS, White IR and Deboucq C: Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr Opin Biotechnol* 14: 647-651, 2003.
37. Liew KJL and Chow VTK: Microarray and real-time RT-PCR analysis of a novel set of differentially expressed human genes in ECV304 endothelial-like cells infected with dengue virus type 2. *J Virol Meth* 131: 47-57, 2006.
38. Celano M, Arturi F, Presta I, *et al.*: Expression cyclase types III and VI in human hyperfunctioning thyroid nodules. *Mol Cell Endocrinol* 203: 129-135, 2003.
39. Tetsuka T, Uranishi H, Imai H, *et al.*: Inhibition of nuclear factor-kappaB-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J Biol Chem* 275: 4383-4390, 2000.
40. Chang AA and Waes CV: Nuclear factor-kappaB as a common target and activator of oncogenes in head and neck squamous cell carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol* 62: 92-102, 2005.
41. Loercher A, Lee TL and Ricker JL: Nuclear factor-kB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 64: 6511-6523, 2004.
42. Lepourcelet M and Shiydasani RA: Characterization of a novel mammalian Groucho isoform and its role in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 277: 47732-47740, 2002.
43. Wong NACS and Pignatelli M:  $\beta$ -Catenin - A Linchpin in colorectal carcinogenesis. *Am J Pathol* 160: 389-401, 2002.
44. Brickley K: GRIP-1 and OIP106, members of a novel gene family of coiled-coil domain proteins: association in vivo and in vitro with kinesin. *J Biol Chem* 280: 14723-14732, 2005.
45. Hadano S, Hand CK, Osuga H, *et al.*: A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29: 166-173, 2001.
46. Keppler D: Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett* 235: 159-176, 2006.
47. Fehrenbacher M, Gyrd-Hansen B, Poulsen U, Felbor T, Kallunki T and Boes M: Sensitization to the lysosomal cell death pathway upon immortalization and transformation. *Cancer Res* 64: 5301-5310, 2004.
48. Joyce JA, Baruch A, Chehade K, *et al.*: Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 5: 443-453, 2004.
49. Zheng X, Chou PM, Mirkin BL and Rebaa A: Senescence-initiated reversal of drug resistance: specific role of cathepsin L. *Cancer Res* 64: 1773-1780, 2004.
50. Shiraishi T, Mori M, Tanaka S, Sugimashi K and Akiyoshi T: Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma using displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. *Int J Cancer* 79: 175-178, 1998.
51. Levicar N, Kos J, Blejec A, Golouch R, Vrhovc I, Frkovic-Grazio S and Lah TT: Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor-1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients. *Cancer Detect Prev* 26: 42-49, 2002.
52. Mirtti T, Alanen K, Kallajoki M, Rinne A and Soderstrom KO: Expression of cystatins, high molecular weight cytokeratin, and proliferation markers in prostatic adenocarcinoma and hyperplasia. *Prostate* 54: 290-298, 2003.
53. Trinka M, Vranic A, Dolenc VV and Lah TT: Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and Cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. *Int J Biol Markers* 20: 50-59, 2005.
54. Lin YW and Yang JL: Cooperation of ERK and SCFskp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferatin signaling. *J Biol Chem* 281: 915-926, 2006.
55. Li M, Zhou J, Ge Y, Matherly LH and Wu GS: The phosphatase MKP1 is a transcriptional target of p53 involved in cell cycle regulation. *J Biol Chem* 278: 41059-41068, 2003.
56. Denkert C, Schmitt WD and Berger S: Expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in primary human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 102: 507-513, 2002.
57. Rauhala HE, Porkka KP, Tolonen TT, Martikainen PM, Tammela TLJ and Visakorpi T: Dual-specificity phosphatase 1 and serum/glucocorticoid-regulated kinase are downregulated in prostate cancer. *Int J Cancer* 117: 738-745, 2005.
58. Tomioka H, Morita K, Hasegawa S and Omura K: Gene expression analysis by cDNA microarray in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 35: 206-211, 2006.
59. Unoki M and Nakamura Y: Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 20: 4457-4465, 2001.
60. Abraham SM and Clark AR: Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses. *Biochem Soc Trans* 34: 1018-1023, 2006.
61. Hardy K, Mansfield L, Mackay A, *et al.*: Transcriptional networks and cellular senescence in human mammary fibroblasts. *Mol Biol Cell* 16: 946-953, 2005.
62. Subramanian RR, Zhang H, Wang H, Ichijo H, Miyashita T and Fu H: Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp Cell Res* 294: 581-591, 2004.
63. Mizumura K, Takeda K, Hashimoto S, Horie T and Ichijo H: Identification of Op18/stathmin as a potential target of ASK1-p38 MAP kinase cascade. *J Cell Physiol* 206: 363-370, 2006.
64. Nagai H, Noguchi T, Takeda K and Ichijo H: Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* 40: 1-16, 2007.
65. Dasgupta P, Betts V, Rastogi S, *et al.*: Direct binding of apoptosis signal-regulating kinase 1 to retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 279: 38762-38769, 2004.
66. Kherrouche Z, Blais A, Ferreira E, De Launoit Y and Monté D: ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) is a direct E2F target gene. *Biochem J* 396: 547-556, 2006.
67. Shim BC, Kang BH, Hong YK, *et al.*: The kringle domain of tissue-type plasminogen activator inhibits in vivo tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 1155-1162, 2005.
68. Pepper MS: Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1104-1117, 2001.
69. Ferrier CM, Suci S, van Geloof WL, *et al.*: High t-PA expression in primary melanoma of the limb correlates with good prognosis. *Br J Cancer* 83: 1351-1359, 2000.
70. Chappuis PO, Dieterich B, Sciotta V, Lohse C, Bonnefoi H, Remadi S and Sapino AP: Functional evaluation of plasmin formation in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 2731-2738, 2001.
71. Reijkerkerk A, Voest EE and Gebbink MFGB: No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 36: 16695-16705, 2000.
72. Gingras D, Nyalendo C, Di Tomasso G, Annabi B and Béliveau R: Activation of tissue plasminogen activator gene transcription by Neovastat, a multifunctional antiangiogenic agent. *Biochem Biophys Res Commun* 16: 205-212, 2004.

73. Gingras D, Labelle D, Nyalendo C, Boivin D, Demeule M, Barthelemy C and Béliveau R: The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) stimulates tissue plasminogen activator activity. *Invest New Drugs* 22: 17-26, 2004.
74. Yamamoto, K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K and Ohtake Y: A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 1148-1154, 2001.
75. Asakura T, Imai A, Ohkubo-Uraoka N, *et al*: Relationship between expression of drug-resistance factors and drug sensitivity in normal human renal proximal tubular epithelial cells in comparison with renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 14: 601-607, 2005.
76. Gill G: SUMO and ubiquitin in the nucleus: Different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* 18: 2046-2059, 2004.
77. Chen A, Wang PY, Yang YC, *et al*: SUMO regulates the cytoplasmic nuclear transport of its target protein Daxx. *J Cell Biochem* 98: 895-911, 2006.
78. Li W, Hesabi B, Babbo A, *et al*: Regulation of double-strand break-induced mammalian homologous recombination by UBL1, a RAD51-interacting protein. *Nucleic Acids Res* 28: 1145-1153, 2000.
79. Lee YS, Jang MS, Lee JS, Choi EJ and Kim E: SUMO-1 represses apoptosis signal-regulating kinase 1 activation through physical interaction and not through covalent modification. *EMBO Rep* 6: 949-955, 2005.
80. Lichtenfels R, Kelner R, Atkins D, *et al*: Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing Proteomex analyses. *Biochim Biophys Acta* 1646: 21-31, 2003.
81. Xiang, Z: A novel human zinc finger protein ZNF540 interacts with MVP and inhibits transcriptional activities of the ERK signal pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 288-296, 2006.
82. Zhao Y, Zhou L, Liu B, *et al*: ZNF325, a novel human zinc finger protein with a RbA-like RB-binding domain, inhibits AP-1- and SRE-mediated transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 1191-1199, 2006.
83. Hanahan D and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70, 2000.
84. Rosenthal EL and Matrisian LM: Matrix metalloproteinases in head and neck cancer. *Head Neck* 28: 639-648, 2006.
85. Gondi CS, Lakka SS, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M and Rao JS: RNAi-mediated inhibition of cathepsin B and uPAR leads to decreased cell invasion, angiogenesis and tumor growth in gliomas. *Oncogene* 23: 8486-8496, 2004.
86. Kos J, Werle B, Lah T and Brunner N: Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* 15: 84-89, 2000.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

---

## 1. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.1. Linhagens celulares de cabeça e pescoço

O laboratório de Genética Molecular e Bioinformática de Ribeirão Preto foi responsável pela cultura das quatro linhagens celulares FaDu, *UM-SCC-14A*, *UM-SCC-17A*, *UM-SCC-38*, cujas características são apresentadas na Tabela 1. Para cada linhagem foram feitas duas culturas celulares, uma foi tratada com o agente desmetilante 5-AZA e outra não recebeu o tratamento. As linhagens foram cultivadas rotineiramente em meio mínimo essencial (Eagle) suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% L-glutamina e 1% penicilina/estreptomicina, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para cada linhagem foram feitas duas culturas celulares, uma foi tratada com o agente desmetilante 5-aza (2,5 µM 5-aza-2'-desoxicitidina em 50% ácido acético) por 4 dias e outra não recebeu o tratamento.

**Tabela 1.** Características das linhagens utilizadas no estudo.

Linhagem	Características	TNM	Estadio	Grau
<i>FaDu</i>	linhagem tumoral (ATCC: HTB-43) proveniente de carcinoma epidermóide de células escamosas da faringe de grau I			I
<i>UM-SCC-14A</i>	linhagem tumoral derivada de recidiva de tumor de assoalho de boca previamente submetido à	T1N0M0	I	Moderadamente bem diferenciado

	radioterapia			
<i>UM-SCC-17A</i>	linhagem tumoral proveniente de tumor primário de supraglote	T1N0M0	I	Moderadamente bem diferenciado
<i>UM-SCC-38</i>	linhagem tumoral proveniente de tumor primário de tonsila pilar sem tratamento quimioterápico prévio	T2N2aM0	IV	Moderadamente diferenciado

### 1.2. Amostras de tumores primários

Foram utilizadas 140 amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e 10 amostras de tecido normal de cabeça e pescoço. As amostras foram obtidas do Banco de Tumores do Hospital A.C. Camargo, criado durante a realização do projeto Genoma Humano do Câncer e a coleta das amostras foi devidamente regularizada e aprovada pelo CONEP (parecer nº 728/2000). As amostras foram obtidas também do projeto “Head and Neck Genome Project/GENCAPO”, também regularizado e aprovado pelo CONEP (parecer nº 1763/05). Todas as amostras armazenadas no Banco de Tumores e obtidas do Projeto GENCAPO foram coletadas mediante consentimento informado dos pacientes.

### 1.3. Amostras de linfócitos normais

Foram utilizadas 10 amostras de linfócitos normais provenientes de mulheres que doaram sangue no Hospital A.C. Camargo durante a realização do

projeto “Caracterização do gene ADAM23 como um novo marcador molecular de prognóstico em câncer de mama” e que não apresentavam nenhuma patologia no momento em que foi realizada a coleta de sangue.

#### **1.4. Extração de RNA total.**

A extração de RNA foi realizada no laboratório de Genética Molecular e Bioinformática de Ribeirão Preto e seguiu a técnica descrita por Sambrook & Russel (2001) com modificações, sendo que o sucesso da técnica depende principalmente da obtenção de RNA em quantidade e de boa qualidade.

O meio celular foi descartado logo após o término do experimento e as células foram tratadas com TRIzol (solução de extração de RNA., Life Technologies, Grand Island, NY). Os restos celulares na massa gelatinosa assim obtida foram transferidos para tubos de centrifuga de 15 mL e colocados em geladeira por um período aproximado de cinco dias para melhor extração do RNA.

A próxima etapa foi a divisão das amostras em tubos limpos de 1,5mL, sendo 1mL para cada tubo, além de 250µL de clorofórmio em cada, misturando-se por 1 minuto e incubando-se por 2 minutos à temperatura ambiente. Na seqüência, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o RNA permaneceu exclusivamente na fase superior aquosa. Essa fase foi transferida para um tubo de 1,5mL limpo, que recebeu um volume igual de isopropanol para precipitação do RNA. A solução foi homogeneizada e incubada à -20°C de um dia para outro. Em seguida, foi centrifugada a 12.000

rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 500µL de etanol 75% ao sedimento, seguindo-se de centrifugação por 10 minutos, com a mesma velocidade e temperatura descritas na etapa anterior. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco em temperatura ambiente. O RNA foi ressuspenso em 20µL a 50µL de água DEPC (dietil pirocarbonato). A próxima etapa foi a determinação da concentração dos RNAs ( $1\text{DO}_{260} = 40\mu\text{g/ml}$ ), medindo-se a densidade óptica nos seguintes comprimentos de ondas:  $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ . Uma alíquota de cada amostra foi submetida a uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% para análise da presença ou não de RNA degradado. A análise do gel, sob luz ultra-violeta, deveria mostrar um rastro de RNA, com bandas específicas de 28S e 18S representando o RNA ribossomal.

Depois de isolado o RNA total, as moléculas foram utilizadas para síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

### **1.5. Obtenção do cDNA por transcriptase reversa**

Os RNAs extraídos das linhagens foram levados para o Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP de São José do Rio Preto para a obtenção de cDNA para análise da expressão dos genes candidatos por meio da técnica de Real Time PCR, sendo que as etapas relacionadas a esta técnica foram realizadas neste mesmo laboratório. Para a reação de RT, foi necessário 2 µg do RNA total ao qual foi adicionado 1µL de oligo (dT) ancorado (500µg/mL) e 1µL de dNTPs mix 10 mM. Em seguida, o material foi incubado a 65°C por 5 minutos. Ao término da incubação, foram acrescentados os seguintes

reagentes: 2µL de DTT 0.1mM, 1µL de RNaseOUT (40U/µL), 4µL de tampão 5X Superscript e 1µL da enzima transcriptase reversa Superscript II Rnase H Reverse Transcriptase (200U/µL).

O material foi incubado a 42°C por 50 minutos e a reação foi finalizada com a incubação a 70°C por 15 minutos.

### **1.6. Controle da qualidade do cDNA**

A etapa seguinte foi a validação do cDNA tanto das linhagens celulares por meio da amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de um fragmento de 305 pb do gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), o qual serve como controle para transcritos abundantes.

As reações foram processadas em 25µL, contendo 100 a 500 ng de cDNA, Tampão 1X, dNTP mix (200 µM), MgCl<sup>2+</sup> (1,5mM ), oligonucleotídeos (0,4 pmol) e *Taq DNA Polimerase* (1 unidade). Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA, tal procedimento é usado como controle de contaminação.

A reação compreendeu uma etapa inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C para anelamento dos oligonucleotídeos e 45 segundos a 72°C para extensão das cadeias, além de 7 minutos a 72°C para extensão final.

Após a reação, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (100Volts por 30 minutos), juntamente com um marcador de 100pb (Ladder Gibco 100pb), para verificar a amplificação de um fragmento de 305 pb

referente ao gene *GAPDH*. Os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra violeta.

As seqüências de bases de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do fragmento de 305 pb do gene *GAPDH* está descrita a seguir:

5'CTGCACCACCAACTGCTTA 3'

5'CATGACGGCAGGTCAGGTC 3'

### **1.7. Extração de DNA de tumores primários e linhagens celulares de cabeça e pescoço**

O DNA de tumores primários de câncer de cabeça e pescoço e das linhagens celulares derivadas de tumores de cabeça e pescoço foi extraído pelo método convencional de fenol-clorofórmio. Os tumores primários de cabeça e pescoço e linhagens celulares foram incubados a 55°C durante a noite em 4 mL de tampão de extração (10 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8,0), em presença de 100 µg/mL de RNase A e 200 µg/mL de proteínase K. Após a digestão, adicionou-se 4 mL de fenol equilibrado (pH 8,0) à amostra. Seguiu-se sua agitação por 5 minutos e centrifugação durante 15 minutos a 5000xg, 4°C. Após a recuperação da fase aquosa, adicionou-se à mesma 4 mL de solução clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguindo-se novamente a agitação da amostra por 5 minutos e sua centrifugação durante 15 minutos a 5000xg, 4°C. Separou-se novamente a fase aquosa e repetiu-se a extração com clorofórmio-álcool isoamílico. Após esta extração, a fase aquosa foi coletada em tubo corex estéril. A precipitação de DNA foi realizada adicionando-se 1/10 do volume da

amostra de 3M NaAc pH 6,0 e 2,5 vezes do volume final de etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas durante 30 minutos a 22.000xg. Após a secagem do DNA à temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensionado em 100-500 de tampão (10 nM Tris HCl, 1.0 mM EDTA pH 8,0) e armazenado a 4°C. A qualidade das preparações de DNA foi avaliada em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo e suas concentrações determinadas por espectrofotometria.

### **1.8 Extração de DNA de linfócitos**

Para a obtenção dos linfócitos, cerca de 2 mL de sangue foram centrifugados durante 5 minutos a 5.000xg. Após a centrifugação, a camada leucocitária. foi removida e transferida para um tubo de 1,5 mL. A extração de DNA dos linfócitos foi realizada empregando-se o método convencional fenol-clorofórmio, de modo semelhante à extração de DNA dos tumores primários, exceto pelo volume dos reagentes. Inicialmente, ao volume de cerca de 300 µL de papa linfocitária, adicionou-se 600 µL de tampão de extração contendo 100 µg/mL RNase A e 200 µg/mL de proteinase K. Após a digestão a 55 °C durante a noite, foram realizadas três extrações, sendo a primeira com 900 µL de fenol equilibrado (pH 8,0) e as duas seguintes com solução clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1). Durante as extrações, foram utilizados tubos *phase lock gel*, a fim de evitar contaminação entre as fases. Ao final das extrações, seguiu-se a precipitação do DNA com 0,3M NaAc pH 6,0 e etanol absoluto. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite e, no dia seguinte, após a centrifugação

durante 30 minutos a 15.300xg e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspenso em 100-200  $\mu$ L de tampão e armazenado a 4°C. A qualidade das preparações de DNA foi avaliada em géis de agarose 0,8% corados com brometo de etídeo, e suas concentrações foram determinadas por espectrofotometria.

### **1.9 Seleção de genes potencialmente regulados por metilação**

Foram selecionados para validação por meio de PCR em tempo real 35 genes analisados por meio de *microarray* que foram reativados por 5-azacitidina em, pelo menos, duas das quatro linhagens celulares de cabeça e pescoço. As regiões promotoras dos genes selecionados foram analisadas para a presença de ilha CpG próxima ao sítio de início de transcrição utilizando UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). O critério para a ilha CpG foi baseado em Gardiner-Garden **et al.**, 1987 com um conteúdo de CG de 50% ou mais, com um comprimento maior que 200 pb e uma taxa maior que 0.6 no número observado de dinucleotídeos CG que o número esperado com base no número de Gs e Cs no segmento.

### **1.10 Padronização das reações de PCR em tempo real**

Primeiramente, foram desenhados, com auxílio do programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystem), oligonucleotídeos iniciadores inter-éxons para os genes de interesse e para os genes *TUBA6* e *GAPDH* que foram utilizados como controles endógenos. Os oligonucleotídeos foram desenhados para que os produtos tivessem entre 80 a 150pb e apresentassem temperatura de anelamento de aproximadamente 60° C.

Posteriormente, foram realizadas reações de padronização para cada par de oligonucleotídeos e para seleção da concentração que garantisse sua saturação. As concentrações de oligonucleotídeos testadas foram 0,25  $\mu\text{M}$ ; 0,4  $\mu\text{M}$ ; 0,5  $\mu\text{M}$ ; 0,6  $\mu\text{M}$  e 0,8 $\mu\text{M}$ .

As reações de padronização foram processadas em volumes de 20 $\mu\text{L}$ , contendo 25ng de cDNA proveniente da linhagem celular Hep-2 (linhagem de câncer de laringe), 10  $\mu\text{L}$  de Power Master Mix SYBR<sup>TM</sup> Green (Applied Biosystem) e os oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações referidas acima. O Power Master Mix SYBR<sup>TM</sup> Green contém todos os componentes para a reação de PCR em tempo real, exceto o *template*, os oligonucleotídeos iniciadores e a água. Entre esses componentes, estão a enzima AmpliTaq Gold®, que cataliza a reação; a enzima UNG, que degrada DNA dupla fita contendo uracila; o *dye* SYBER Green, fluoróforo que se intercala em DNA de fita dupla; os dNTPs e o ROX, que é a referência passiva da reação.

Para uma melhor análise dos resultados, os ensaios de otimização de concentração de oligonucleotídeos foram realizados em triplicata para cada gene analisado. Além disso, todos os experimentos incluíram controles negativos sem cDNA.

As reações compreenderam uma incubação inicial de dois minutos a 50°C para a ativação da enzima UNG. Em seguida, realizou-se um passo de 10 minutos a 95 °C para inativação da UNG, evitando, dessa forma, que a enzima degrade os produtos da termociclagem a ser iniciada em seguida e também para a ativação da enzima AmpliTaq Gold®. Posteriormente, seguiram-se 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C para anelamento dos primers e extensão dos fragmentos. Foi

acrescentado um passo de dissociação que tem, em média, 20 minutos de duração onde há um aumento gradual de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de *primer dimers*, produtos inespecíficos e de contaminações. A Figura 1 mostra as curvas de amplificação dos genes *THRAP1*, *PLXNB1*, *CLDN1* e *CRABP2*, com as diferentes concentrações testadas.

As curvas de dissociação dos genes analisados não mostraram a formação de *primer dimer*, produtos inespecíficos, bem como de contaminantes, o que confirma a qualidade e a especificidade dos produtos amplificados por PCR em tempo real. A Figura 2 mostra a curva de dissociação do gene *CRABP2*, na qual pode ser observada a presença de apenas um pico.

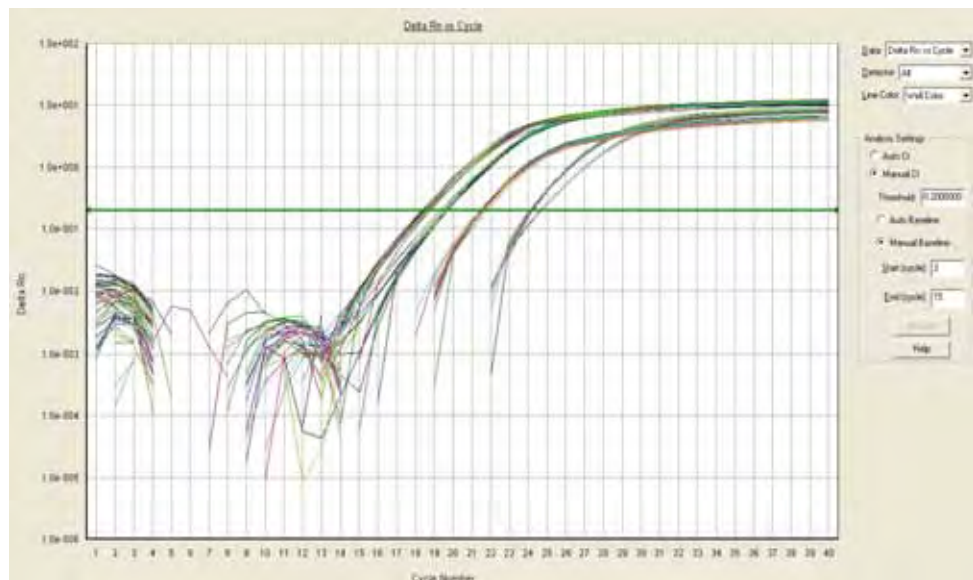


Figura 1. Curva de amplificação dos genes *THRAP1*, *PLXNB1*, *CLDN1* e *CRABP2* com as diferentes concentrações testadas.

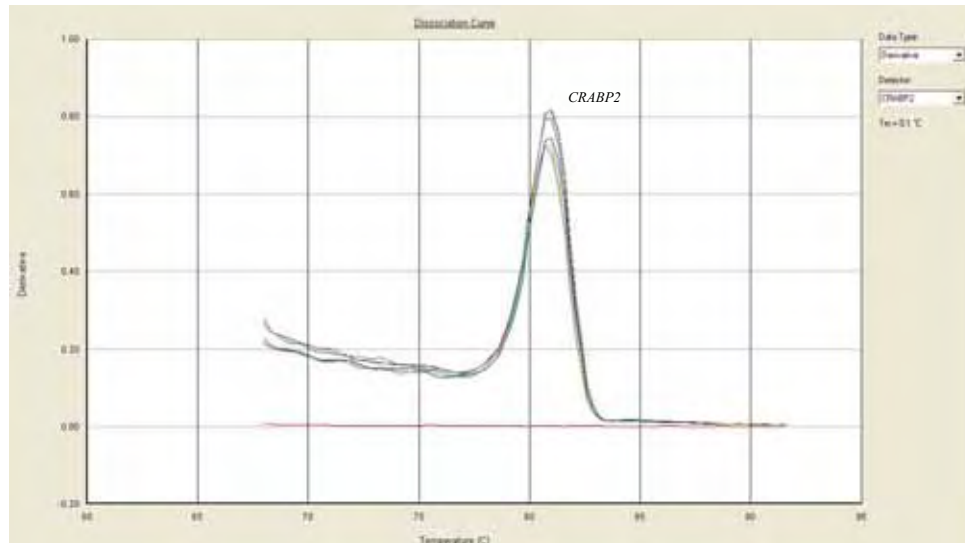


Figura 2. Curva de dissociação do gene *CRABP2* evidenciando a presença de apenas um pico

As eficiências de amplificação dos iniciadores específicos para os transcritos alvos e os genes normalizadores foram calculadas de acordo com a equação:  $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ . Nesta equação, o slope corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do CT dos transcritos alvo e normalizador em função do log de diferentes quantidades de cDNA. Para a realização do cálculo citado acima, foram realizadas diluições seriadas de cDNA de *Hep-2*, que foi sintetizada a partir de 2 $\mu$ g de RNA total, sendo as concentrações finais utilizadas: 20ng, 10 ng, 5 ng, 2,5 ng e 1,25 ng. As amostras de cDNA nas concentrações citadas foram submetidas à amplificação por PCR em tempo real. O teste foi realizado para cada gene utilizando a concentração de oligonucleotídeo otimizada anteriormente. A Figura 3 mostra o resultado da validação da eficiência do gene *TUBA6*, cujo valor de *slope* foi de  $-3,30155$ .

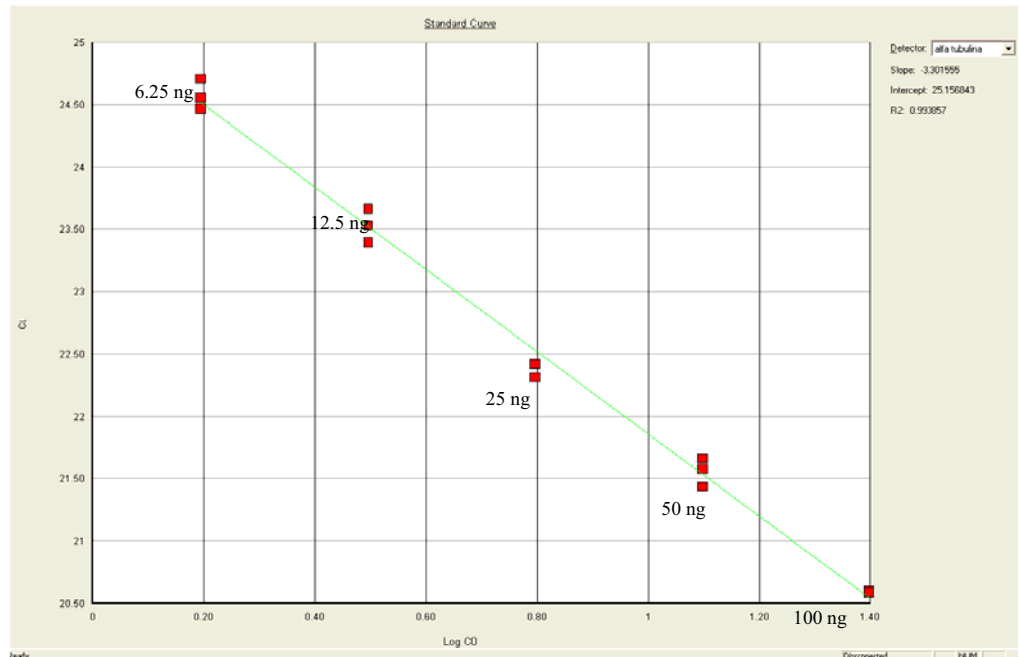


Figura 3. Validação da eficiência de amplificação do gene da alfa-tubulina

### 1.11. Validação dos genes diferencialmente expressos por PCR em tempo real

As reações de padronização foram processadas em volumes de 20 $\mu$ L, contendo 10ng de cDNA proveniente das linhagens celulares de cabeça e pescoço, 10  $\mu$ L de Power Master Mix SYBR<sup>TM</sup> Green (Applied Biosystem) e os oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações referidas acima. Para uma melhor análise dos resultados foram realizados em triplicata para cada gene analisado. Além disso, todos os experimentos incluíram controles negativos sem cDNA.

As reações compreenderam uma incubação inicial de dois minutos a 50°C para a ativação da enzima UNG. Em seguida, realizou-se um passo de 10 minutos a 95 °C para inativação da UNG, evitando, dessa forma, que a enzima degrade os produtos da

termociclagem a ser iniciada em seguida e também para a ativação da enzima AmpliTaq Gold®. Posteriormente, seguiram-se 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e um minuto a 60°C para anelamento dos primers e extensão dos fragmentos. Foi acrescentado um passo de dissociação que tem, em média, 20 minutos de duração onde há um aumento gradual de 60°C para 95°C a 0,2°C por segundo. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de *primer dimers*, produtos inespecíficos e de contaminações.

A expressão diferencial dos transcritos de interesse foi determinada pelo método de quantificação relativa em relação a genes normalizadores utilizando como amostra de referência o cDNA da linhagem não tratada.

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizando o modelo matemático proposto por PFAFFL (2001).

$$R = (E \text{ alvo})^{\Delta CT_{\text{alvo}}} / (E \text{ normalizador})^{\Delta CT_{\text{normalizador}}}$$

em que “E alvo” corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o transcrito alvo, “E normalizador” corresponde à eficiência de amplificação dos iniciadores específicos para o gene normalizador, “ $\Delta CT$  alvo” corresponde à diferença entre o CT do transcrito alvo obtido para a amostra em análise e o CT do transcrito alvo obtido para a amostra referência, “ $\Delta CT$  normalizador” corresponde à diferença entre o CT do gene endógeno obtido para a amostra em análise e o CT do gene endógeno obtido para a amostra referência.

O *cut-off* para validação de cada gene foi de  $\geq 2.0$  *fold change*, tanto para expressão reduzida como aumentada.

### **1.12 Análise do padrão de metilação das ilhas CpG na região promotora dos genes validados nas linhagens**

Após a análise da expressão dos genes entre as quatro linhagens tratadas e não tratadas com o agente desmetilante, os genes que foram validados por Real Time PCR seguiram para a análise de metilação da região promotora.

#### **1.12.1 Conversão do DNA por Bissulfito de Sódio**

Os DNAs das linhagens foram levados para o Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP de São José do Rio Preto para a realização do tratamento de bissulfito nos mesmos para análise do perfil de metilação da região promotora dos genes candidatos validados por meio da técnica de Real Time PCR. As etapas relacionadas à pré-análise do perfil de metilação pela curva de dissociação do Real Time PCR e análise do perfil de metilação dos dinucleotídeos da seqüência da região promotora dos genes candidatos foram realizadas pela aluna de doutorado Marília de Freitas Calmon no laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig de São Paulo cuja chefe do Laboratório é a Dra. Anamaria Aranha Camargo.

Após a determinação da concentração de cada amostra de DNA por espectrofotometria, 2 µg de DNA (por amostra) foram desnaturados por adição de Herring Sperm DNA (10 mg/mL) and NaOH (3M) e, a seguir, as amostras

foram aquecidas a 50 °C por 20 minutos. Em seguida, o DNA foi tratado pela adição da solução bissulfito de sódio (2,5M) / hidroquinona (1M) seguido de aquecimento a 70 °C durante 3 horas em ambiente escuro. Após o tratamento, foi utilizado o Wizard Clean up kit (Promega) para purificação do DNA de acordo com as instruções do fabricante. Subseqüentemente, o DNA foi precipitado por adição de acetato de amônia (5M), 100% de etanol gelado e glicogênio (20mg/mL) e incubado a -20 °C overnight. Após a precipitação, o DNA foi ressuspendido por adição de DDW (Double Distilled Water) após ter sido centrifugado e seco em temperatura ambiente.

#### **1.12.2 Desenho de primers para PCR e NESTED PCR para análise do padrão de metilação nas linhagens tratadas com bissulfito de sódio**

Foram desenhados, com o auxílio do programa Oligotech, primers externos e internos às regiões promotoras dos genes para clonagem e sequenciamento da região promotora. A tabela 5 mostra os primers externos e a tabela 6 mostra os primers internos de cada gene, sua temperatura de anelamento e o tamanho do produto de amplificação.

Tabela 5: Primers externos para análise de ilhas CpGs

Genes	Primers externos 5'-3'	Temp. de anel.	Tamanho produto
<b><i>CDK7</i></b>	F - GAG TGA tAt AGt AGt tAT TGA AGA R - AaC CAA aCC AaA CCT CTa aC	60°C	413
<b><i>CRABP2</i></b>	F - GAG TGG Ttt tAt TGG Att Tag TTt A R - CCC CTa CCC Aaa ATT aAA aTa aC	60°C	427
<b><i>CLTC</i></b>	F - AGG ttt ttT ttt TAG GtT GTA GG R - CCA aTC TTC TCT TTC TCC C	60°C	439
<b><i>ATP5L</i></b>	F - GAt AGG tTG GAT TtT GtA AAG ATt R - CCA ACC TaC TTC CTa CTC	60°C	397
<b><i>BTAFl</i></b>	F - GtT TTt GAA GTT ttA GGA tTT GGA R - AaC TCC AaA aCC CAa TaA CAA TaA a	60°C	413
<b><i>GOLT1B</i></b>	F - TGt AGt AGG AAA GGG AAG GA R - CCA ACC CAa AaC TTC ATT CAT Ta	60°C	676
<b><i>HSPA5</i></b>	F - GAA GGG AGA AtA AGt AGT AGA R - CAa CCA aTT aaa CAa CAa CAa aCA a	60°C	639
<b><i>MDN1</i></b>	F - GTG TGT TAA GGt AGA AGt AAG R - AAa AAC CTa CCC AAC TCA CTa	60°C	525
<b><i>NCL</i></b> <b><i>FRAG.1</i></b>	F - GAG GGA AAT GtT tTG GTT TGt R - CCT Taa AaT TCC TCA aAa ACC C	60°C	611
<b><i>NCL</i></b> <b><i>FRAG.2</i></b>	F - tAA GtA GGG ATA AGt TGT Gtt Ttt R - CCC AaC ACC TaC AaA AaC TC	60°C	868
<b><i>TCPI</i></b> <b><i>FRAG.1</i></b>	F - GAG tTG GTT GAt AGG GtT G R - aCT TTa CTC CAa aCC TCA aaA aT	60°C	933
<b><i>TCPI</i></b> <b><i>FRAG.2</i></b>	F - AtT ttT GAG Gtt TGG AGt AAA G R - aAC AAA aaC CCC TCC ATC TTa A	60°C	609
<b><i>VEGF</i></b> <b><i>FRAG.1</i></b>	F - GGG AGA AGG ttA GGG GT R - aaA AaT AaA aCA ATC TCC CCA AaC	60°C	731

<b><i>VEGF FRAG.2</i></b>	F - GtT TGG GGA GAT TGt TtT AtT Ttt R - AaC AaC AAa aCA Aaa CTC CAA TaC	60°C	828
<b><i>SKIL</i></b>	F - GTG AGG GTG GGG TGG R - CCT AAT aCT aCA CCT CCC	60°C	970
<b><i>CTNND1 66</i></b>	F - AAG GGt tAt AGt tAG tTt tTG AtT TG R - TAC ACC TaC AAa aaC Aaa aAC AaT C	60°C	880
<b><i>CTNND1 72</i></b>	F - GtA GAT GGT GGt AtA tAA tAT TTA G R - TCC CCC ACA TCC Aaa TCC	60°C	774
<b><i>CTND1 36</i></b>	F - GGG tTT tAG GGA GAG ttt TG R - CAT CCC CCT aCC TCT TaC	60°C	497
<b><i>MX1</i></b>	F - ttt TtA GtA tAG GGT tTG TGA GTT R - AaA ACT CCT TaA ACC TTC CCT	60°C	619
<b><i>NXF1</i></b>	F - GGt AGt AtT GTG tTt TAG tAt TAA tTt R - CCA ACA CCA aaA TaC CAa CAa a	60°C	587
<b><i>PERP</i></b>	F - ttT GGA GAG Gtt AGG AGA G R - CCT AAA CAa aCA TTC TaA AAA aCA C	60°C	679
<b><i>SLC15A3</i></b>	F - AGG AGA GGA GAG AAG AGt R - CTa aaa aCC AaC CCT CCT TC	56°C	669

Tabela 6 - Primers internos para análise de ilhas CpGs

Genes	Primers internos 5'-3'	Temp. Anel.	Tam. produto
<b><i>MXI</i></b>	FN - tAt AGG GTt TGT GAG TTT tAT TTt TT RN - TTa AAC CTT CCC TCC CCA a	60°C	602
<b><i>NXF1</i></b>	FN - AtT AAt TtT GAA GtT Gtt AGG GtA G RN - CAa CAa aAA TCC Aaa AaT CAA CAA CT	60°C	553
<b><i>PERP</i></b>	FN - GAt TGG AGG GTT GTG GG RN - TTC TaA AAA aCA CTa aCT CCC C	60°C	645
<b><i>SLC15A3</i></b>	FN - tTG GTG GAG ATG tTG GAG RN - TCC TTC CCT CCA CAC C	58°C	494
<b><i>CDK7</i></b>	FN - GtA Gtt ATT GAA GAT Gtt ttA tTT tA RN - aCC AaA CCT CAa aCC TCC A	60°C	500
<b><i>CRABP2</i></b>	FN - tAT TtA ATG GAG tTA GGG ttA GtT A RN - CCA CCA ACC TCT aaA TCT AaC	60°C	427
<b><i>CLTC</i></b>	FN - GGA GGA GTG tTG tAG ttA Gt RN - TCT CTT TCT CCC CCC ACT	60°C	388
<b><i>ATP5L</i></b>	FN - GGt TGG ATT tTG tAA AGA TtT TTG RN - CCC TCC ACC TaC Aaa CC	60°C	397
<b><i>BTAFl</i></b>	FN - TtG AAG TTt tAG GAt TTG GAt TAA AT RN- TAA aAa aAa ACC ATa CCT TCC CT	60°C	413
<b><i>GOLT1B</i></b>	FN - AGt AGG AAA GGG AAG GAT GA RN - CCA aAa CTT CAT TCA TTa ACC C	60°C	676
<b><i>HSPA5</i></b>	FN - GGG GGT tAt Ttt TGt TGG Att T RN -aCA aaC AaT CCA aCC ACA aaC	60°C	639
<b><i>MDN1</i></b>	FN - TGT GTT AAG GtA GAA GtA AGG t RN - ATa ACC CAa aaC CCT CAC C	60°C	525
<b><i>NCL</i></b> <b><i>FRAG.1</i></b>	FN - GGA AAT GtT tTG GTT TGt TAA Gtt RN - aaA aaC ACA aCT TAT CCC TaC TTa	60°C	611

<b>NCL</b> <b>FRAG.2</b>	FN - GGG TtT tTG AGG AAt Ttt AAG G RN - ACC TaC AaA AaC TCT TCA CCT	60°C	868
<b>TCPI</b> <b>FRAG.1</b>	FN - TAT Gtt tAt AGG GTG GAG TtA G RN - CTa CAT CTT aCC CTa CCT TA	60°C	933
<b>TCPI</b> <b>FRAG.2</b>	FN - AGt AGG GAt AAG GAA AAG AtA tT RN - AAC ACA CCA CCC CAC C	60°C	609
<b>VEGF</b> <b>FRAG.1</b>	FN - AGA AGG ttA GGG GTt AtT ttA G RN - aAT CAA TaA ATA TCA AAT TCC AaC A	60°C	731
<b>VEGF</b> <b>FRAG.2</b>	FN - AGt AGA AAG AGG AAA GAG GTA RN - AAa aCA Aaa CTC CAA TaC ACC C	60°C	828
<b>SKIL</b>	FN - TGG GGT GGG GAG GGA RN - CAT CCA AAC CCC CTA CTC	60°C	970
<b>CTNND1</b> <b>66</b>	FN - GGG GTG GAG GtT TTt tTG RN - aCT CAC CCA aTC AAA aTC ACA	60°C	880
<b>CTNND1</b> <b>72</b>	FN - ttA TGt AAA GGT AtA GAA AAG ATT G RN - Aaa TCC CCA CTT ACT aCT aC	60°C	774
<b>CTNND1</b> <b>36</b>	FN - AGG GTT TtT GGG AAT GGA tt RN - aCA aCC CAa CCa TCT TCC	60°C	898

### 1.12.3 PCR e Nested PCR

As reações da 1º PCR e Nested PCR foram processadas em 25µL, contendo 2,5 µl de tampão 10X, 4,0 µl de dNTP mix a 1,25 µM), 1µl de MgCl<sup>2+</sup> a 50mM, 0,4 µl de oligonucleotídeos a 10 pmol e 0,2 µl de *Taq Platinum* a 5U/µl. Em todos os experimentos, um dos tubos não recebeu DNA, tal procedimento é usado como controle de contaminação. Para a 1º PCR foi utilizada,

aproximadamente, 50 ng de DNA tratado e para o Nested PCR foi utilizada 1µl de produto do 1º PCR.

A reação da 1º PCR compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95 °C para ativação da enzima Taq Platinum (invitrogen) Posteriormente, seguiram-se 30 ciclos de: 50 segundos a 95°C, 50 segundos a temperatura de anelamento de cada gene, 1 minuto a 72°C e um passo final de cinco minutos a 72°C para extensão dos fragmentos. A reação de Nested PCR compreendeu um passo inicial de 10 minutos a 95 °C para ativação da enzima Taq Platinum (invitrogen) Posteriormente, seguiram-se 35 ciclos de: 50 segundos a 95°C, 50 segundos a temperatura de anelamento de cada gene, 1 minuto a 72°C e um passo final de cinco minutos a 72°C para extensão dos fragmentos. Os produtos das ampliações foram submetidos à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8% para visualização das bandas de interesse.

#### **1.12.4 Purificação do produto de PCR**

Conforme descrito no relatório anterior, observou-se que o produto do gene *SKIL* estava apresentando problemas de amplificação. Portanto, após a alteração das condições de PCR para o gene *SKIL*, os produtos do Nested PCR do gene *SKIL* para as linhagens UM-SCC-17 tratada e não tratada com o agente desmetilante apresentaram algumas bandas inespecíficas quando submetidos a uma corrida em gel de poliacrilamida 8%. Então, estes foram submetidos a uma corrida de gel de agarose 2%, onde se cortou a banda de interesse e estas foram

purificadas de acordo com as instruções do fabricante do *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Após, utilizou-se 6 µl dos produtos para fazer a ligação ao vetor.

#### **1.12.5 Clonagem**

O amplificado das bandas foram clonados utilizando-se o Kit p-GEM T-Easy Vector<sup>TM</sup> (Promega), numa reação contendo 2µL do produto de PCR, 5µL de solução tampão 2X, 1µL de T4 DNA ligase (3U/µL) e 1µL do vetor (50 ng/µL), e incubado a 4°C overnight. A transformação foi realizada com a transferência de 2µL da reação para alíquotas de 50µL de bactérias *E.coli* (DH10B) eletrocompetente. Os parâmetros utilizados na transformação foram: 1.8kV, 25.0 µF e 200-700Ω. Foram adicionados 1 ml de meio CG líquido e as bactérias foram incubadas por 40 minutos a 37°C com agitação de 200rpm. Em seguida, foram transferidas para placas contendo 20mL de meio CG sólido, 16µL de Xgal (50mg/ml), 2µL de IPTG(0.2g/ml) e 10µl de ampicilina (200mg/ml) para crescerem, permanecendo a 37°C “overnight”. Após o crescimento das bactérias em meio sólido, colônias brancas foram selecionadas. Foram escolhidas 12 colônias para fragmento clonado.

Ass colônias brancas foram selecionadas e a eficiência de clonagem foi verificada através das reações de amplificação dos fragmentos de 12 colônias de cada fragmento clonado. A reação de PCR foi realizada com iniciadores universais M13 que anelam-se em seqüências do plasmídeo anterior e posterior a inserção do fragmento na clonagem. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µl contendo 3,2 µmM de iniciadorespUC/M13, 0,5U Taq DNA

polimerase, 125 $\mu$ M de cada dNTP, tampão (Tris-HCl 10mM (pH8. 3); KCl 50 mM; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>) e uma pequena fração de cada colônia retirada com um palito estéril. As condições da reação foram: desnaturação inicial (3 min a 94°C) seguida de 35 ciclos de 40 segundos a 95°C, 40s a 55°C, 55s a 72°C e um passo de extensão (10min a 72°C). O produto dessa amplificação foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1% para checagem do sucesso da clonagem.

#### **1.12.6 Purificação de plasmídeo**

Os plasmídeos que contém os fragmentos das regiões promotoras dos genes *NCL* frag.1, *SKIL* e *VEGF* frag.1 que estavam apresentando problemas na clonagem e sequenciamento (descrito no relatório anterior) foram purificados de acordo com o protocolo do fabricante do Wizard Plus *SV minipreps DNA purification System* (Promega). Após a purificação, o plasmídeo foi submetido à corrida em gel de agarose de 1% para análise a qualidade do plasmídeo.

#### **1.12.7 Sequenciamento.**

Os fragmentos de DNA de 12 colônias de cada gene clonado foram seqüenciados segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por Sanger e Coulson (1977), utilizando-se o Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fornecedor. Os produtos do sequenciamento foram submetidos à eletroforese por capilaridade no seqüenciador automático de DNA ABI 3100 (Applied Biosystems). As seqüências de

nucleotídeos obtidas foram analisadas através do programa computacional BLAST (Altschul et al., 1997) para a confirmação de sua especificidade.

**1.12.8 Análise do padrão de metilação dos dinucleotídeos CpG na região promotora dos genes candidatos e cálculo da metilação global da região promotora.**

A análise de metilação dos dinucleotídeos de cada gene foi realizada em 5 clones de cada linhagem. Após a análise da metilação dos dinucleotídeos na região promotora dos genes, foi realizado o cálculo da metilação global da região promotora dos genes candidatos na linhagem tratada e não tratada com o agente desmetilante, sendo utilizada a seguinte fórmula:

Metilação global =  $[(\sum \text{clones que apresentaram metilação em cada dinucleotídeo analisado}) \times 100] / \text{n}^\circ \text{ de dinucleotídeos analisados} \times \text{n}^\circ \text{ de clones analisados}$ .

**1.13. Análise do perfil de metilação em amostras de carcinomas de cabeça e pescoço por meio da técnica MSP - *Methylation Specific PCR* (Herman e cols., 1996)**

O perfil de metilação da região promotora do gene *CRABP2* foi analisado através de MSP em amostras de carcinomas de cabeça e pescoço. Os iniciadores empregados nas reações de MSP para análise da região 1 da ilha CpG do gene *CRABP2* foram: CRABP2 U – F: 5' TTT TTT TGT TTT TGT GGA GAG TGT G 3' / CRABP2 U – R: 5' AAA CCA AAA TAA CCT TCT CCT ACa 3' para a situação não metilada e CRABP2 M- F: 5' CGTTTTTGC GGAGAGCG 3' /

CRABP2 M – R: 5' CGA AAT AAC CTT CTC CTA CG 3' para a situação metilada. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL por tubo contendo 1X tampão Taq Platinum Polimerase (Invitrogen), 2mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 200 mM de dNTPs (*Gibco BRL*), 0,32 µM de cada iniciador e 1U de *Taq Platinum* (Invitrogen). As condições de amplificação foram 10 minutos a 95°C para ativação da enzima, seguido de 40 ciclos de 95°C por 55 segundos, anelamento de 60°C por 55 segundos e extensão de 72 °C por 55 segundos. Seguiu-se extensão final de 72°C a 7 minutos. A amplificação do fragmento localizado na ilha CpG na região 1 do gene *CRABP2* gera um produto de 93 pares de bases na reação com iniciadores específicos para situação não metilada e de 83 pares de bases para a situação metilada.

Os iniciadores empregados nas reações de MSP para análise da região 2 da ilha CpG do gene *CRABP2* foram os seguintes: CRABP2 U – F: 5' GTG AGA TGT GAG GAA TTT G 3'/ CRABP2 U – R: 5' ATC ACA CTC TCC ACA AAA ACA 3' para a situação não metilada e CRABP2 M- F: 5' GAG ACG TGA GGA ATT CG 3'/ CRABP2 M – R: 5' CGC TCT CCG CAA AAA CG 3' para a situação metilada. As reações de MSP foram realizadas em condições e ciclagem semelhantes às reações para análise da ilha CpG na região 1 do promotor do *CRABP2*. A amplificação do fragmento localizado na ilha CpG na região 2 do gene *CRABP2* gera um produto de 96 pares de bases na reação com iniciadores específicos para situação não metilada e de 91 pares de bases para a situação metilada.

Como controle das reações de MSP com amostras de DNA de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço utilizou-se amostras de DNA de linfócito normal, metilado ou não *in vitro* com a enzima MSssI (*New England BioLabs*).

Os produtos das reações de MSP foram analisados em gel de poliacrilamida 8%, preparados utilizando-se uma solução de poliacrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, 10% de APS e TEMED. Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram submetidos à coloração com AgNO<sub>3</sub> (Sanguinetti et al., 1994).

#### **1.13.2 Metilação de DNA de linfócitos *in vitro***

DNA de linfócitos de indivíduos normais foram metilados *in vitro* utilizando-se 0,32 mM S-adenosilmetionina e 25 U da metilase M.SssI (*New England Biolabs*), em volume final de 250 µL. Após 4 horas de incubação, acrescentou-se mais 0,64 mM de S-adenosilmetionina e 12,5 U da enzima M.SssI. Seguiu-se mais 4 horas de incubação a 37°C. Após a modificação do DNA, foi realizada a extração com 250 µL de fenol-clorofórmio (1:1). As amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 16.000xg, seguindo-se a precipitação do DNA com a adição de 1/3 do volume da amostra de 7,5M NH<sub>4</sub>OAc e 2 vezes o volume final da amostra de etanol absoluto gelado. As amostras foram deixadas a -20°C por toda a noite e, no dia seguinte, após centrifugação e lavagem com etanol 70%, o DNA foi ressuspensionado em 100-200 µL de tampão e armazenado a 4°C. A concentração dos DNAs metilados foi determinada por espectrofotometria.

Após, foi realizado o tratamento de bissulfito neste DNA conforme o protocolo descrito no item 1.12.