**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – FMRP
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADOS PELO MECANISMO DE
METILAÇÃO EM LINHAGENS TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Carla Martins Kaneto

**Ribeirão Preto
2007**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO – FMRP
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES REGULADOS PELO MECANISMO DE
METILAÇÃO EM LINHAGENS TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Genética
da Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de mestre em Ciências
Biológicas-Área de Genética.

ALUNA: Carla Martins Kaneto

ORIENTADOR: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior.

**Ribeirão Preto
2007**

**Ao meu irmão, Luciano, minha
vida, minha alma repartida, um
amor além da vida...**

Agradecimentos

Aos meus pais, Carlos e Vera, e ao meu irmão Luciano, por todo amor, carinho, paciência, apoio e tantas outras coisas que somente a família pode nos proporcionar. Tudo o que faço é para ver um sorriso brilhar no rosto de vocês, as maiores riquezas de minha vida. A vocês, meu amor incondicional, carinho e admiração.

À minha família: Avós, tios, tias, primos e primas, pela torcida e incentivo e, em especial, a minha avó Carolina, por suas orações tão poderosas.

Ao meu orientador, Prof. Wilson, pela oportunidade a mim concedida, mas acima de tudo, pela confiança, apoio, experiência e conhecimento transmitidos.

Ao meu namorado Junior, pelo amor, dedicação, companheirismo e paciência ou simplesmente por existir, iluminando meus caminhos e minha vida, tornando tudo mais leve e colorido. Tudo se torna mais fácil quando você está ao meu lado.

À Anne, Isabela e Lúcia, irmãs que a cegonha não trouxe, mas que Deus me deu, pelos momentos de alegria, “felicidade infinita”, choro ou mesmo silêncio. Porque amigo é quem te dá um pedacinho do chão, quando é de terra firme que você precisa ou um pedacinho do céu, se é o sonho que te faz falta.

Ao André Bordini, meu conselheiro, pelas longas conversas, apoio e momentos de desabafo.

À Meire, sempre disposta e solícita, por toda a ajuda, atenção e apoio.

À Greice, Fernanda, Anemari, Lidiane e Cris Ayres, peças fundamentais sem as quais esse trabalho não poderia ter sido realizado. Obrigada pela imensa ajuda.

Aos colegas de laboratório, Beatriz, Manuela, Vinícius, Camillo, Eliana, Ciane, Virgínia, Dalila, Paulinho, Adriana, e todos os outros que por ventura tenha omitido, por todos os momentos, alegrias e almoços compartilhados.

Aos “meninos do BiT”, Alynne, Thiago, Gislaine, Tonhão, Brown, Daniel, Tojal e Marco, por todas as vezes que me socorreram diante das minhas dificuldades.

À Pat e Pierre, pela amizade, alegria, divertimento, confiança e confidências divididas. Obrigada, Pat, por todos os ensinamentos, ajuda e disposição em me ajudar quando entrei para “os caminhos tortuosos da metilação”. Sem palavras para descrever meu respeito e admiração por você.

Aos meus amigos, mesmo os mais distantes, Bruno, Fabrício, Juliano, Flávia, Priscila. A saudade de vocês é imensa! E aos amigos de Ribeirão Preto, Leandro, Wagner, Juliana e Mariana, por todos os momentos que dividimos.

À família Fernandes, que tantas vezes me acolheu, em especial a Rosângela, Dona Aldair, Nana, Thales e Breno, por todos os fins de semana na chácara e por todas as longas risadas que demos juntos.

A Deus, força suprema, pela oportunidade de viver e por sua constante presença em minha vida, guiando meus passos por caminhos que só Ele conhece e colocando soluções onde eu só enxergava problemas.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Alterações no padrão normal de metilação do DNA têm sido caracterizadas como um importante mecanismo na gênese de neoplasias. Esta modificação do DNA é denominada de epigenética uma vez que altera o padrão de expressão das células sem alterar a sequência do DNA. No câncer, as alterações epigenéticas observadas consistem na hipermetilação das ilhas CpG nos promotores dos genes acompanhada de uma hipometilação global dos dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma. Este evento mostra geralmente ser câncer-específico, ou seja, alguns genes que são metilados em um tipo de câncer, não o são na maioria dos outros tipos. O objetivo deste projeto foi identificar, através da construção de bibliotecas subtrativas de RaSH, genes silenciados por metilação nas linhagens de câncer de cabeça e pescoço FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-38 e que possuem expressão induzida após o tratamento com o agente demetilante 5-aza-2-deoxicitidina. Uma vez que a metilação leva a diminuição gradual da expressão gênica, o método RT-PCR semi-quantitativo foi utilizado para validação da expressão diferencial dos genes candidatos PLAU, CD82, RBBP4, AOF2, TMSB10, HSPA5 e LAMC2 nas linhagens não tratadas e tratadas com o agente demetilante 5-aza-2-deoxicitidina. Para todos os genes candidatos foi observado aumento na expressão gênica após o tratamento em pelo menos uma das quatro linhagens. Na linhagem UM-SCC-14 A, os genes CD82, RBBP4, AOF2, HSPA5 e LAMC2 mostraram aumento na expressão após o tratamento com o agente demetilante, sendo que o gene LAMC2 também mostrou esse aumento de expressão na linhagem UM-SCC-17A. Na linhagem UM-SCC-38A todos os genes mostraram aumento de expressão após o tratamento. Embora novos estudos sobre a metilação da região promotora dos genes selecionados sejam necessários, aumentam as evidências de que os genes selecionados sejam regulados pelo mecanismo de metilação e que estejam metilados nas linhagens estudadas.

ABSTRACT

Abnormalities on the normal pattern of DNA methylation have been characterized as an important mechanism on carcinogenesis. This modification is called epigenetic and can be defined as a heritable change in gene expression that is not accompanied by changes in DNA sequence. The epigenetic alterations observed on cancer include hypermethylation of selected CpG island gene promoters and simultaneous global hypomethylation. The aim of this project was to identify, by rapid subtraction hybridization, genes silenced by methylation on head and neck cancer lineages with alterations on gene expression after the treatment with 5-aza-2-deoxycytidine. The cancer lineages we used for our experiments were: FaDu, UM-SCC-14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-387A and seven genes (PLAU, CD82, RBBP4, AOF2, TMSB10, HSPA5 and LAMC2) were analysed by semiquantitative RT-PCR and for all of them an increaseament of gene expression was observed. For the UM-SCC-14A lineage, the genes CD82, RBBP4, AOF2, HSPA5 and LAMC2 were upregulated after the treatment with demethylating agent as well as LAMC2 was upregulated on UM-SCC-17A. For the UM-SCC-38A lineage all the genes showed increased expression after the treatmente with -aza-2-deoxycytidine. Our work is another evidence that some genes may be regulated by methylation during carcinogenesis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Herança Epigenética e Metilação do DNA	9
1.2 Importância da metilação do DNA na célula normal	11
1.3 Importância da metilação do DNA no câncer	12
1.4 Dinâmica do silenciamento epigenético	14
1.5 Métodos para detecção de genes hipermetilados	18
1.6 Aplicações clínicas dos estudos sobre metilação	19
1.7 Câncer de cabeça e pescoço	22
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Cultura de células	25
3.2 Extração do RNA em Trizol	26
3.3 Síntese de cDNA	26
3.4 Biblioteca Subtrativa-RASH (Rapid Subtraction Hybridization)	27
3.5 Digestão e ligação dos adaptadores	27
3.6 PCR e purificação do produto de PCR	28
3.7 Digestão do <i>Tester</i>	28
3.8 Subtração das amostras	29
3.9 Clonagem e transformação bacteriana	29
3.10 Análise dos transformantes	30
3.11 Classificação funcional	31
3.12 Validação dos dados obtidos no RaSH	32
4. RESULTADOS	35
4.1 Cultura de células	35
4.2 RaSH (Rapid Subtraction Hybridization)	36
4.3 Mapeamento dos genes clonados em regiões de perda cromossômica ou LOH (Loss of heterozygosity)	38
4.4 Classificação Funcional	40
4.5 Análise dos genes com ilhas CpG	42
4.6 Descrição dos genes selecionados e validação dos dados obtidos no RaSH	42
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS	62

1.INTRODUÇÃO

1.1 Herança Epigenética e Metilação do DNA

O Câncer é uma doença complexa e multifatorial que envolve alterações genéticas que contribuem para a transformação progressiva de células normais em malignas. Estas alterações compreendem mudanças irreversíveis na sequência de DNA, como mutações, deleções e translocações, que podem resultar na ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor ou na formação de proteínas quiméricas. São exemplos bem estabelecidos destes eventos genéticos as mutações pontuais em genes da família *ras*, deleções do gene controlador do ciclo celular *p16*, e a translocação recíproca t(9;22), que leva a formação do gene de fusão *bcr-abl* (GALM; HERMAN; BAYLIN, 2006).

Ao longo dos anos tem se tornado cada vez mais evidente que, em adição às aberrações genéticas, processos epigenéticos como a metilação do DNA e modificações nas histonas desempenham um papel central na carcinogênese. Esta herança da informação, baseada na expressão gênica, é classificada como epigenética, uma vez que altera o padrão de expressão de um gene sem, no entanto, alterar sua sequência de bases (ESTELLER, 2003).

A principal modificação epigenética em humanos é a metilação da citosina localizada em dinucleotídeos CpG. Cerca de 3 e 4% de todas as moléculas de citosina encontram-se metiladas e a 5-metilcitosina resultante deste processo compõe entre 0,75 e 1% de todas as bases nucleotídicas do DNA de tecidos humanos normais (ESTELLER, 2003).

A distribuição dos nucleotídeos CpG no genoma humano não é uniforme, concentrando-se em regiões denominadas Ilhas CpG. Essas Ilhas CpG usualmente não estão metiladas em tecidos normais. Uma ilha CpG é definida como uma região de DNA maior que 200 pb, com um conteúdo de GC acima de 50% e a razão da frequência entre o observado e o esperado de CpG

(ob/esp) maior que 60% (LI; DAHIYA, 2002). Estima-se que o genoma humano apresenta aproximadamente 29.000 ilhas CpG e que 50-60% destas ilhas estejam localizadas próximas a região promotora de genes ativos podendo também se estender para dentro do primeiro éxon (NEPHEW; HUANG, 2003).

A metilação de resíduos de citosina em dinucleotídeos CpG causa profundos efeitos na expressão gênica. Este evento epigenético ocorre de forma global no genoma normal e entre 70 e 80% de todos os dinucleotídeos CpG encontram-se intensamente metilados em células humanas. Entretanto, as Ilhas CpG parecem estar protegidas desta modificação. Estas Ilhas, normalmente não metiladas, podem se tornar metiladas em células cancerosas e este evento é associado à perda de expressão dos genes flanqueados (NEPHEW; HUANG, 2003).

O processo de metilação do DNA é resultado da atividade de uma família de enzimas, as DNA metiltransferases (DNMT), que catalisam a adição de um grupo metil a um resíduo de citosina em dinucleotídeos CpG (figura 1) (STRATHDEE; BROWN, 2002). Até o momento, foram descritos três membros da família DNMT em células de mamíferos. A primeira DNMT identificada foi a enzima DNMT1 (BESTOR *et al.*, 1988). Devido ao fato de exibir atividade muito maior no DNA hemimetilado do que no DNA não-metilado, acredita-se que esta enzima atue na manutenção do padrão de metilação do DNA após sua replicação. Subseqüentemente, mais duas enzimas, DNMT3a e DNMT3b, foram clonadas e acredita-se que funcionem principalmente como metiltransferases *de novo* (STRATHDEE; BROWN, 2002). Evidências mais recentes, entretanto, sugerem que a DNMT1 e a DNMT3b atuam conjuntamente na definição e manutenção do fenótipo hipermetilado em células tumorais (RUSH; PLASS, 2002).

Figura 1: Mecanismo de metilação do DNA. A 5-metilcitosina é produzida pela ação de DNA metiltransferases (DNMT 1, 3a ou 3b), que catalisam a transferência do grupo metil (CH₃) da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono na posição 5 da citosina (STRATHDEE; BROWN, 2002).

1.2 Importância da metilação do DNA na célula normal

A metilação tem sido proposta como um mecanismo de controle para expressão seletiva de genes tecido-específicos e silenciamento desses genes em células de diferentes tecidos. Entretanto, não está claro se o efeito da metilação é secundário, devido à ausência de um fator de transcrição específico, ou se é a principal causa do silenciamento tecido-específico (ESTELLER, 2003).

Mais conhecidamente, a metilação do DNA como mecanismo fundamental para o controle da expressão gênica ocorre na inativação do cromossomo X em fêmeas de mamíferos e no *imprinting* gênico (STRATHDEE; BROWN, 2002).

Um outro papel biológico da metilação do DNA em células normais é a repressão de transposons, retrovírus e alguns elementos repetitivos, limitando assim a propagação destes elementos pelo genoma (MUKAI; SEKIGUCHI, 2002). Estas seqüências podem ser controladas por repressão transcricional mediada por muitas proteínas hospedeiras, mas é possível que a principal linha de defesa contra a expressão destas seqüências seja a inativação através da metilação dos seus promotores (ESTELLER, 2003).

1.3 Importância da metilação do DNA no câncer

Muitos fatores genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento do câncer, mas a metilação do DNA pode fornecer uma ligação entre estas influências. A estabilidade genômica e a expressão gênica normal são mantidas por um padrão fixo de metilação predeterminado (ESTELLER, 2003).

De uma forma geral, o genoma de células malignas é caracterizado por uma hipometilação generalizada, que envolve os íntrons e seqüências repetitivas (GALM; HERMAN; BAYLIN, 2006). Essa hipometilação global contribui para um fenótipo maligno por interferir na estabilidade cromossômica, na reativação de elementos transponíveis e na perda dos padrões de *imprinting* gênico (EHRLICH, 2002). Além disso, pode favorecer a recombinação mitótica com conseqüente perda de heterozigosidade e promover rearranjos cromossômicos e aneuploidias (GAUDET, *et al.*, 2003).

Em geral, todos os tipos de câncer possuem ganhos de metilação nos promotores gênicos associados a ilhas CpG (GALM; HERMAN; BAYLIN, 2006). Essa metilação está relacionada com a inativação gênica e é equivalente a perda de função por deleção ou mutação puntiforme. Se o gene possuir propriedades de supressor de tumoral ou estiver envolvido em regulação

do crescimento, diferenciação ou apoptose, a metilação aberrante pode desempenhar um papel central na tumorigênese (NEPHEW; HUANG, 2003).

Embora a hipermetilação de Ilhas CpG seja uma ocorrência comum em câncer, os mecanismos que determinam esta metilação aberrante só estão começando a ser revelados agora (NEPHEW; HUANG, 2003).

Vários estudos demonstram que a hipermetilação de Ilhas CpG associadas a genes supressores tumorais pode fornecer uma vantagem seletiva a células cancerosas e os genes que encontram-se hipermetilados em células tumorais são fortemente específicos ao tecido de origem do tumor (KWONG, *et al.*, 2005); (AI, *et al.*, 2006); (GUO, *et al.*, 2006); (COSTA, *et al.*, 2005); DRUCKER, *et al.*, 2006) (figura 2).

Figura 2. Uma região promotora rica em dinucleotídeos CpG transcricionalmente ativa e inativa, respectivamente. **a.** Um promotor típico, não metilado e transcrito contendo uma ilha CpG localizada em um domínio protegido da metilação. Ao redor do promotor, há nucleossomos espaçados, que contém histonas acetiladas e os complexos DNA metiltransferases (DNMT) são excluídos da região promotora. **b.** O mesmo promotor em um estado de hipermetilação aberrante que está associado a repressão transcricional na célula cancerosa. A região promotora está acessível a complexos DNMT e a cromatina transcricionalmente repressiva ocupa o promotor, que é então silenciado. CA = proteína co-ativadora; HAT = acetiltransferase histônica; HP1 = proteína HP1; TF = Fator de transcrição (JONES; BAYLIN, 2002).

1.4 Dinâmica do silenciamento epigenético

O primeiro mecanismo sugerido para a supressão da transcrição gênica mediada pela metilação do DNA, descrevia a inibição direta da ligação dos fatores de transcrição (TATE; BIRD, 1993). Entretanto, alguns fatores de transcrição ignoram a metilação e muitos nem sequer possuem ilhas CpG em suas seqüências de reconhecimento. Mais recentemente, um mecanismo geral para explicar a metilação começou a ser elucidado. Segundo esse mecanismo, a metilação do DNA leva a ligação de uma família de proteínas conhecidas como proteínas MBD (*Methyl-binding domain*), que compartilham um domínio que se liga especificamente ao DNA contendo Ilhas CpG metiladas (HENDRICH; BIRD, 1998). Pelo menos três dos cinco membros desta família (MeCP2, MBD2 e MBD3) se mostraram associados a complexos protéicos maiores, contendo histonas-desacetilases (HDAC1 e HDAC2) e remodeladores de cromatina. Acredita-se que a ação dessas desacetilases e dos remodeladores de cromatina resulte na produção de uma cromatina compactada e refratária à transcrição (figura 3) (TYLER; KADONAGA, 1999).

Figura 3. Mecanismo proposto pelo qual a metilação do DNA leva a repressão transcricional (STRATHDEE; BROWN, 2002).

A Metilação *de novo* geralmente se inicia nas margens de uma Ilha CpG e progressivamente se espalha em direção ao centro da Ilha (figura 4). Não está claro o porque da proteção das Ilhas CpG e das seqüências flanqueadoras ser perdida nas células cancerosas. Estudos sugerem que algumas seqüências na região promotora podem servir como sítios de ligação atraindo complexos repressores, incluindo HDACs, MBDs, DNMTs e outros. Seqüências de reconhecimento dentro ou ao redor dos dinucleotídeos CpG também podem desempenhar um papel importante na associação de proteínas a citosinas metiladas. A interferência dessas proteínas na ligação de fatores de transcrição que têm preferência por seqüências não metiladas foi recentemente reportada, sugerindo que a abundância de fatores de transcrição pode competir com a maquinaria promotora de metilação e isso pode ser relevante na iniciação

da hipermetilação das Ilhas CpG no câncer. A densidade ou número de dinucleotídeos CpG metilados pode exercer repressão transcricional a longas distâncias. Devido a sua herança natural, Ilhas CpG hipermetiladas deixam marcas através das quais a progressão de eventos epigenéticos pode ser reconstruída durante de tumorigênese e então, serem utilizadas como marcadores moleculares para classificação de diversos tipos tumorais (figura 5) (NEPHEW; HUANG, 2003).

Figura 4: O silenciamento gênico epigenético pode ser gradual, começando nas fases iniciais da progressão tumoral. Este processo pode se iniciar com um súbito decréscimo na transcrição de um determinado gene, levando a um pequeno decréscimo na produção da respectiva proteína. Esta transcrição diminuída pode então levar a diminuição da proteção das Ilhas CpG contra a metilação. Esta perda, por sua vez, resulta em aumento gradual na metilação de sítios individuais CpG no interior da ilha, podendo resultar em metilação progressiva e heterogênea e perda transcricional variável além de decréscimo variável na produção da proteína (JONES; BAYLIN, 2002).

Figura 5: Um modelo epigenético para o início e progressão do câncer. A figura mostra cinco ilhas CpG e seus sítios CpG vizinhos. No início do processo neoplásico, a proteção de alguns sítios CpG contra a metilação é perdida. Metilação *de novo* ocorre nos sítios CpG flancueadores e progressivamente se espalha em direção ao centro da ilha CpG, resultando no silenciamento do gene correspondente (NEPHEW; HUANG, 2003).

1.5 Métodos para detecção de genes hipermetilados

As primeiras análises da metilação do DNA em *loci* gênicos específicos só foram possíveis com o advento das enzimas de restrição sensíveis a metilação em conjunto com a análise por *Southern blotting*. No entanto, o estudo da metilação do DNA obteve um grande avanço com o desenvolvimento da técnica de conversão do DNA genômico pelo bissulfito de sódio, que é utilizado em um grande número de técnicas para a análise da metilação do DNA: MSP (*Methylation Specific PCR*), MS-SNuPE (*Methylation-sensitive single nucleotide primer extension*), COBRA (*Combined bisulphite restriction analysis*) além do BSP (*Bisulphite-sequencing PCR*) (LAIRD, 2003).

A reação com bissulfito foi primeiramente descrita no início dos anos 70 e usada por Frommer e colaboradores em 1992 para distinguir entre as citosinas não-metiladas e citosinas metiladas do DNA (LI; DAHIYA, 2002). Nesta modificação química todas as citosinas não-metiladas são convertidas em uracil, mas aquelas que estão metiladas são resistentes a esta modificação e permanecem como citosinas (figura 6) (HERMAN *et al.*, 1996). As seqüências dos *primers* para as metodologias baseadas na modificação do DNA pelo bissulfito e que utilizam o PCR (*Polymerase Chain Reaction*), devem ser desenhadas com base na seqüência do DNA após o tratamento com o bissulfito (HERMAN *et al.*, 1996).

Figura 6: Representação esquemática da modificação das citosinas não metiladas em uracil pelo método de conversão do DNA por bissulfito.

1.6 Aplicações clínicas dos estudos sobre Metilação

O conhecimento da hipermetilação de Ilhas CpG de genes supressores tumorais pode se tornar uma ferramenta poderosa na transferência essencial da pesquisa em laboratório para a prática clínica. Em contraste com marcadores genéticos, em que mutações ocorrem em sítios múltiplos e que podem ser de tipos muito diferentes, a hipermetilação de promotores ocorre somente dentro das Ilhas CpG. Além disso, a hipermetilação é um sinal que pode ser facilmente observado em pequenos níveis no genoma, enquanto mudanças genéticas particulares, como a perda de heterozigosidade e deleções homozigotas, não podem ser tão facilmente detectadas (ESTELLER, 2003).

Somente genes associados a ilhas CpG não metiladas em células normais podem ser utilizados como marcadores para construção de um perfil de metilação em processos tumorigênicos, mas através da combinação de três ou quatro marcadores de metilação, pode-se extrair uma maior quantidade

de informação, uma vez que eventos de hipermetilação em loci diferentes não são relacionados. Para que marcadores epigenéticos sejam clinicamente utilizáveis, são necessários meios de detecção de hipermetilação de genes supressores tumorais mais eficientes e, de preferência, não-radiativos (ESTELLER, 2003). O impulso para os estudos sobre metilação do DNA em câncer é proveniente da identificação e caracterização diversos supressores de tumor como por exemplo, BRCA1, hMLH1, p16INK4a e VHL (Tabela 1) (ESTELLER, 2003).

Tabela 1: Hipermetilação do DNA de alguns genes supressores tumorais.

Hipermetilação	Localização Tumoral	Resultado
<i>BRCA1</i>	Mama, ovário	Defeitos no reparo do DNA
<i>GSTP1</i>	Próstata, mama, rim, fígado	Defeitos no reparo do DNA
<i>HMLH1</i>	Cólon, estômago, endométrio	Defeitos no reparo de mau-pareamento
<i>MGMT</i>	Cérebro, linfoma, pulmão, cólon	Quimiosensibilidade
<i>P15INK4b</i>	leucemia	Entrada no ciclo celular
<i>RAR2</i>	Cólon, pulmão, linfoma, mama	Ausência de resposta a retinóides
<i>CRBP1</i>	Linfoma, cólon, pulmão, fígado	Ausência de resposta a retinóides
<i>P14ARF</i>	Cólon, estômago	Ativação de MDM2, inativação de p53
<i>DAPK</i>	Linfoma	Inibição da apoptose
<i>P73</i>	Leucemia, linfoma	Desconhecido

A hipermetilação de promotores em Ilhas CpG em genes supressores de tumor ocorre no início do processo de tumorigênese. Este achado possui implicações na detecção precoce do câncer, especialmente em pessoas com alto risco hereditário, pois o padrão de hipermetilação de Ilhas CpG é o mesmo em cânceres familiares e esporádicos (ESTELLER, 2003).

Ao contrário das mudanças genéticas em câncer, mudanças epigenéticas são potencialmente reversíveis. Assim, existe a

possibilidade de reativação de genes epigeneticamente silenciados para benefícios terapêuticos. Estudos mostram que é possível reativar genes silenciados por metilação utilizando agentes demetilantes como 5-azacitidina (ESTELLER; HERMAN, 2002). Esses agentes inibem as DNA metiltransferases e causam hipometilação global. Baixas doses de 5-azacitidina, associadas com inibidores de desacetilases de histonas como, por exemplo, a tricostatina, também podem reativar genes supressores de tumor (figura 7) (ESTELLER, 2003).

Figura 7. Representação esquemática da demetilação de regiões promotoras após tratamento com agentes demetilantes (ESTELLER, 2003).

Está bem determinado que mudanças genéticas, como mutações e deleções, exercem um papel funcional no silenciamento de genes supressores tumorais. Entretanto, a importância funcional da metilação no silenciamento de genes em células cancerosas foi recentemente enfatizada com o relato de que um número crescente de genes relacionados a ilhas CpG

encontram-se metilados em câncer. Através da utilização de drogas demetilantes o controle tumoral tem sido atingido experimentalmente.

Desta forma, é importante compreender os padrões de metilação em tecidos normais e tumorais com a finalidade de se identificar genes afetados durante o processo de tumorigênese. (RUSH; PLASS, 2002).

1.7 Câncer de Cabeça e Pescoço

Carcinomas de cabeça e pescoço representam a sexta maior causa de câncer no mundo e pelo menos 90% deles são do tipo epidermóide. Ao longo dos últimos 20 anos, o diagnóstico e tratamento têm melhorado através da combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, porém a taxa de sobrevivência, que é de aproximadamente cinco anos, não sofreu alterações consideráveis e se mantém entre uma das mais baixas entre todos os tipos de câncer (HARDISSON, 2003).

A incidência de câncer no trato digestivo superior tem permanecido estável na última década em aproximadamente 45000 novos casos por ano. A taxa de mortalidade também tem permanecido estável em 12300 mortes por ano. De acordo com McMahon e Chen (2003), o câncer de cabeça e pescoço contribuiu com 6,6% de todos os casos novos de câncer entre 1985-1995. A carência de resultados positivos no tratamento do câncer de cabeça e pescoço reforça a importância de mais estudos genéticos na tentativa de se compreender os mecanismos moleculares envolvidos no câncer com maior precisão. As alterações moleculares observadas no câncer de cabeça e pescoço são devidas principalmente à ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, levando a desregulação da proliferação celular. Estas alterações incluem amplificação gênica e hiperexpressão de oncogenes como o *ras*, *myc*, *EGFR* e *cyclin D1*, além de mutações pontuais e deleções que levam a inativação de genes como *p16* e *TP53* (HARDISSON, 2003).

Atualmente há um número crescente de evidências epidemiológicas de estudos do tipo caso-controle que indicam que a história familiar é um fator de risco (aumento relativo de 3,5) para uma parcela dos casos de câncer de cabeça e pescoço. Adicionalmente, o consumo de álcool tem contribuído para um aumento significativo no risco (CHIN, 2004). Porém, as alterações moleculares que fundamentam o comportamento maligno e progressão do pâncre de cabeça e pescoço não estão completamente estabelecidas (HARDISSON, 2003).

Os genes supressores tumorais atuam como tradutores de sinal negativo de crescimento e estão envolvidos na regulação do ciclo celular e apoptose. Estes genes podem ter sua função alterada por muitos mecanismos incluindo mutações pontuais, deleções ou ligação com proteínas virais e celulares, além de mecanismos epigenéticos (CHIN, 2004). Estudos recentes relatam a relação entre a expressão aberrante de componentes da via do ácido retinóico e o câncer de cabeça e pescoço. Em seu trabalho, Kwong *et al.* (2005) encontraram uma alta frequência de hipermetilação dos promotores dos genes *CRBPI* e *CRBPV* (88% e 54%, respectivamente) em tumores nasofaríngeais primários, sugerindo que a diminuição ou perda da expressão destes genes, mediada por mecanismos epigenéticos, seja importante no desenvolvimento deste tipo de tumor.

Entretanto, o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é caracterizado por uma grande heterogeneidade em seu comportamento biológico, respondendo diferencialmente ao mesmo tratamento. Por tudo isso, é de fundamental importância a identificação de marcadores que permitam a caracterização do estadiamento de tumores de cabeça e pescoço (HARDISSON, 2003).

2. OBJETIVO

- Identificar genes candidatos a estarem regulados por metilação no câncer de cabeça e pescoço;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de Células

Para a análise de expressão gênica e da metilação foram utilizadas quatro linhagens de células de câncer de cabeça e pescoço: FaDu (ATCC, HTB-43), UM-SCC-14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-38 (Tabela 2), as três últimas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Thomas E. Carey, da Universidade de Michigan, USA. As células foram cultivadas em duplicata durante aproximadamente quatro semanas em garrafas plásticas de cultura com meio MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina e estreptomicina mantidas em estufa a 5% de CO₂ e 37°C.

Tabela 2. Linhagens celulares utilizadas no estudo e suas características.

Linhagem	Características	Grau
FADU	linhagem tumoral proveniente de carcinoma epidermóide de células escamosas da faringe de grau I	I
UM-SCC-14A	linhagem tumoral derivada de recidiva de tumor de assoalho de boca previamente submetido à radioterapia	Moderadamente bem diferenciado
UM-SCC-17A	linhagem tumoral proveniente de tumor primário de supraglote	Moderadamente bem diferenciado
UM-SCC-38	linhagem tumoral proveniente de tumor primário de tonsila pilar sem tratamento quimioterápico prévio	Moderadamente diferenciado

Uma garrafa de cada linhagem foi tratada com 2,5µM do agente demetilante 5-aza-2-deoxicitidina e outra garrafa foi utilizada como controle (sem tratamento) (figura 8). Após quatro dias de cultivo foi realizada a

extração do RNA total das células, porém antes foram realizadas análises de citometria utilizando-se iodeto de propídeo como marcador da viabilidade celular.

Figura 8: Esquema de cultivo e tratamento da linhagem celular FaDu.

3.2 Extração de RNA em Trizol

O RNA total foi isolado pelo método TRIZOL *Reagent* (Life technologies, USA – Molecular Research Center, Inc) de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. Posteriormente, foi realizada quantificação por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm.

3.3 Síntese de cDNA

A partir de 25 µg de RNA extraído da linhagem FaDu, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando 1 µL da enzima *Superscript II RTTM* (Invitrogen), 1µL de oligo dT, 1µL de DNTP 10mM, 4 µL de *Buffer* 5X e 2 µL DTT, para obtenção da primeira fita de cDNA. Para a obtenção do cDNA de fita dupla foram utilizados 4 µL de *E. coli* DNA Polimerase, 1µL de *E. coli* DNA ligase, 1µL de *E. coli* RNase H, 30 µL de 5X Second strand Buffer e 3µL de DNTP 10 mM. Em seguida, os cDNAs foram checados através de PCR com *primers* para a *β-actina* e *GAPDH* para avaliar a qualidade da síntese. Cinco microlitros do produto do PCR foram então checados em gel de agarose 1,5 % e visualizados em trans-iluminador UV.

3.4 Biblioteca Subtrativa – RaSH (Rapid Subtraction Hybridization)

O método do RaSH foi descrito por Jiang e colaboradores em 2000 e utilizando-se desta metodologia, os RNAs transcritos em uma cultura tratada com o agente demetilante 5-aza-2-deoxicitidina, são subtraídos a partir dos RNAs obtidos da amostra controle (sem tratamento), e assim, são identificados os genes que são expressos exclusivamente na amostra tratada.

Para a construção da biblioteca subtrativa (RaSH) somente a linhagem de células FaDu (linhagem de carcinoma hipofaríngeal) foi utilizada.

3.5 Digestão e ligação dos adaptadores

Os cDNAs foram digeridos com a enzima de restrição MbO1 (GIBCO) a 37°C por 1 hora com posterior extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol.

Com a digestão das duas amostras com MbO1, foram gerados sítios nos cDNAs que são complementares aos dos adaptadores. Os cDNAs digeridos foram então ligados aos adaptadores XDPN-14 (CTGATCACTCGAGA) e XDPN-12 (GATCTCTCGAGT) em 8 µL de tampão DNA ligase 5X (GIBCO/BRL), e submetidos a condições de temperaturas que permitiram esta ligação. A ligação dos adaptadores restaura o sítio de restrição dos cDNAs os quais na etapa seguinte foram amplificados por PCR.

3.6 PCR e Purificação do Produto do PCR

Após a reação de ligação, as amostras foram diluídas para um volume final de 100 µL com tampão LoTE. Em seguida foram realizadas 25 reações de PCR (1 ciclo de 5 min a 72° C, 25 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 55° C, 1 min a 72° C e um ciclo de 3 min a 72° C) por amostra onde foram utilizados 2 µL do produto de ligação e *primer* XDPN-18 (CTGATCACTCGAGAGATC) que se ligou aos adaptadores. O volume final de cada reação será de 50 µL e ao finalizar as reações, todos os PCRs (para cada amostra – controle e tratada) foram misturados, seguido de extração com fenol/clorofórmio, precipitação com etanol e ressuspensão do “pelet” em 100 µL de LoTE.

3.7 Digestão do Tester

Tester é a denominação dada a amostra a ser testada de onde são subtraídos os RNAs diferencialmente expressos a partir da amostra que dirigiu esta subtração, portando, da amostra *driver*. Foram realizadas duas subtrações: uma com a amostra não tratada como tester e a outra com a amostra tratada como tester. Em cada uma delas 10 µg de cada uma das amostras *Driver* (não tratada e tratada) foram digeridos com 2 µL da enzima XhoI (GIBCO).

3.8 Subtração das amostras

O produto desta digestão serviu como *Tester* para a realização da subtração. Cem nanogramas da amostra *tester* foram misturados a 5 µg da amostra *driver*. As subtrações foram realizadas em 16,6 µL de solução de hibridação (0,5 M NaCl; 50mM Tris, pH:7,5; 0,2% SDS; formamida 40%) e após desnaturação (100° C - 5 min) a solução foi incubada a 42° C durante 48 horas.

Esta subtração baseia-se inicialmente na separação das fitas dos cDNAs tanto do *tester* quanto do *driver* (100°C) e posterior hibridação entre as mesmas (42°C). No entanto as cópias de cDNAs que são exclusivas do *tester* não serão hibridizadas e conseqüentemente serão as únicas cópias de cDNAs com sítios XhoI nas extremidades.

3.9 Clonagem e transformação bacteriana

Três microlitros da mistura da subtração foram clonados em 0,5 μL de plasmídeo pZERO-1 (*Invitrogen*) digerido com XhoI, processo com duração de 3 horas a uma temperatura de 16°C. Em seguida, 1 μL do plasmídeo clonado foi inserido em bactérias competentes através de eletroporação.

Foram adicionados 500 μL de meio líquido SOC a mistura que foi então mantida no *Shaker* a 37°C e 200rpm. Após 1 hora, foram acrescentados mais 500 μL de SOC com posterior distribuição das bactérias em placas com meio ágar *LB Low Salt* contendo o antibiótico Zeocin na concentração de 50mg/mL.

3.10 Análise dos Transformantes

As colônias formadas foram semeadas em placas de cultura de 96 poços contendo meio líquido 2xYT com zeocin 50mg/mL. Uma alíquota desta cultura foi utilizada para reação de PCR, com *primers* universais M13, nos dois sentidos (figura 9). Os insertos amplificados foram utilizados para a reação de sequenciamento em seqüenciador automático MegaBace™ 1000 (Amesham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) utilizando DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit (Amesham Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Figura 9. Clonagem e sequenciamento da biblioteca subtrativa. A) representação esquemática dos clones em meio sólido; B) produto da amplificação direta dos clones; C) seqüência gerada a partir do PCR de um clone.

As seqüências geradas foram analisadas no Laboratório de Bioinformática do Centro Regional de Hemoterapia (Fundação Hemocentro de

Ribeirão Preto) através de comparações com banco de dados públicos, utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) para realizar buscas por similaridades com outras seqüências já agrupadas e classificadas no *GeneBank*.

O resultado desta análise consiste numa lista de genes que estão diferencialmente expressos na linhagem FaDu após o tratamento com o agente demetilante 5-aza-2-deoxicitidina.

Posteriormente, foram realizadas análises de contagem para determinação do número de genes exclusivos de cada cultura, bem como o número de genes comuns às duas culturas.

A seleção dos genes foi baseada em dados obtidos das bibliotecas de RaSH. Os genes também foram submetidos à revisão bibliográfica minuciosa para que fosse averiguada sua possível relação com processos de tumorigênese.

Os genes foram então selecionados quanto a sua função e quanto à presença de ilhas CpG na sua região promotora. A presença das ilhas CpG dos genes foi investigada pelo programa BLAST (Release Março/2006) (*Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL *et al.*, 1990), com o auxílio do programa *MethPrimer – Design Primers for Methylation PCRs* (LI; DAHIYA, 2002; <http://itsa.ucsf.edu/~urolab/methprimer/>). Para esta finalidade, foram selecionados 1000pb localizados anterior ao primeiro éxon de cada gene.

3.11 Classificação Funcional

Para a análise da classificação funcional dos *clusters* encontrados foi utilizada a ferramenta Gene Classification Browser, desenvolvida no Laboratório de Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto.

A função biológica e o papel de uma determinada proteína em um organismo podem freqüentemente ser transferidos para outras espécies. Partindo desta premissa, um consórcio internacional chamado Gene Ontology (GO) elaborou uma seleção funcional para categorizar os mais variáveis tipos de produtos gênicos (<http://www.gdm.fmrp.usp.br>).

O banco de dados é baseado em três parâmetros independentes: processo biológico, componente celular e função molecular. O processo biológico menciona para qual objetivo biológico o gene ou produto contribui. A função molecular é definida como a atividade bioquímica, incluindo estruturas ou ligantes específicos, de um determinado produto gênico. Os componentes celulares mencionam o lugar nas células onde o produto gênico é ativo (<http://www.gdm.fmrp.usp.br>).

O resultado consiste em uma classificação funcional no nível selecionado, em outros níveis, razão, intervalo de confiança, intervalo de erro e um gráfico mostrando a porcentagem de cada nível, a comparação das duas razões, e o intervalo de confiança para a diferença entre os parâmetros. Neste trabalho foram feitas análises relacionadas ao papel biológico dos produtos codificados pelos genes analisados no nível três de classificação, que relaciona os genes envolvidos em uma determinada categoria, como metabolismo e apoptose.

3.12 Validação dos dados obtidos no RaSH

Após a análise dos genes identificados pela biblioteca subtrativa, o método RT-PCR semi-quantitativo foi utilizado para a análise da expressão diferencial dos seguintes genes selecionados para validação: PLAU, CD82, RBBP4, AOF2, TMSB10, HSPA5, LAMC2.

Para esta fase o cDNA utilizado foi confeccionado a partir de 2µg de RNA total com adição de 1 µL de Oligo DT, 4µL de 5X First Strand

Buffer, 2µL de DNTP 10 mM, 1 µL de Enzima *Superscript II RTTM* e 2µL de dTT. Todos os reagentes utilizados pertencem a marca Invitrogen.

Todos os primers para os genes foram desenhados de modo a amplificar especificamente os genes desejados, o que foi confirmado através de alinhamento contra o banco de dados do NCBI, através da ferramenta *BLAST*, disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

As seqüências dos *primers* e a temperatura de anelamento para cada gene estão descritos na tabela 3. O gene constitutivo GAPDH foi utilizado como normalizador.

Todas as reações de RT-PCR semiquantitativo foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems) utilizando 28 ciclos. O cDNA foi diluído de maneira seriada (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128) para cada linhagem não-tratada e tratada e essas amostras assim diluídas foram utilizadas para as reações de amplificação. O nível de expressão do gene foi baseado na maior diluição onde houve amplificação.

Tabela 3. Genes estudados, sequência dos *primers*, método utilizado e temperatura de anelamento.

Gene	Seqüência dos Primers	T
PLAU	F: GGACTACATCGTCTACCTGG	61°C
	R: GGTCAGCAGCACACAGCATT	
CD82	F: GCATCGTGACTGAGCTCATT	57°C
	R: CGATTCATGAGCTCAGCGTT	
RBBP4	F: CCACTCAGTTGATGCTCACA	56°C
	R: GCCACACTTGCATGATATTG	
AOF2	F: GGTGAGCTCTTCCTCTTCTG	58°C
	R: CCAGATGATCCTGCAGCAAC	
TMSB10	F: CGATAAGGCCAAGCTGAAGA	56 °C
	R: TCTATAATATCCCGGGGCAA	
HSPA5	F: GGTGTCATGACCAAAGTAT	56°C
	R: GCGATTCTGGTCATTGGTGA	
LAMC2	F: CCAATGTGACAGCAGATGGA	56°C
	R: CGTCTAATGTGTTGAGTGTG	
GAPDH	F: TTAGCACCCCTGGCCAAGG	55°C
	R: CTTACTCCTTGGAGGCCATG	

Os genes que confirmarem o aumento em sua expressão após o tratamento com o agente demetilante serão submetidos ao sequenciamento de sua região promotora após tratamento com bissulfito de sódio.

4. RESULTADOS

4.1 Cultura de Células

4.1.1 Teste de viabilidade

A análise de viabilidade celular foi realizada por Citometria de Fluxo no equipamento FacSort – BD – San Jose-CA nas culturas não-tratada e tratada da linhagem FaDu revelando viabilidade de 72,42% e 91,41%, respectivamente (figura 10).

A

B

Figura 10. Gráfico com o resultado da análise de Citometria de células da linhagem FaDu A) não-tratada e B) tratada com 5-aza-2-deoxicitidina.

4.2 RaSH (*Rapid Subtraction Hybridization*)

Para anotação das seqüências obtidas foi utilizado o programa chamado GEAP (Generic Est Annotation Pipeline), desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, um sistema genérico de anotação de ESTs que utiliza linguagem de programação Perl, arquivos de configuração no formato XML, servidor de bancos de dados MySQL e programas para análise de seqüências (PINHEIRO et al., 2002).

Um total de 1.773 clones foi seqüenciado e anotado contra diferentes bancos de dados. Cerca de 50% dos clones foram obtidos para cada linhagem, sendo que 73% dos clones da linhagem não-tratada foram anotados como genes conhecidos, enquanto que na linhagem tratada apenas 49% tiveram a mesma anotação. Essa diminuição pode ser em consequência do aumento de clones anotados como genes mitocondriais, muito superior na linhagem tratada (tabela 4). A tabela 5 mostra os dez genes com maior número de clones exclusivos da linhagem FaDu não-tratada e tratada e os dez genes com maior número de clones comuns às duas bibliotecas.

Tabela 4. Número de seqüências obtidas a partir das culturas não-tratada e tratada distribuídas de acordo com classificação dos genes a elas relacionados.

	Linhagem FaDu não-tratada	%	Linhagem FaDu tratada	%	Total
Genes conhecidos	651	0.730	430	0.490	1081
Unigene	3	0.003	7	0.007	10
ESTs	5	0.005	2	0.002	7
Ribossomal	5	0.005	12	0.014	17
Mitocondrial	233	0.260	425	0.480	658
Total	897	0.51	876	0.49	1.773
Total sem redundância	234	0.48	246	0.51	480

Tabela 5. Resultado parcial do RaSH, mostrando os genes com maior número de clones nas culturas não-tratada e tratada e respectivo número de clones.

	Não-Tratada	Tratada
LCN2	50	
KRT5	13	
ALDH3A1	11	
TUBB	4	
PCBP2	4	
FOSL1	4	
RPS9	3	
RPL27	3	
EIF3S5	3	
AHCY	3	
TCP1		5
ANXA1		5
LAMC2		4
HSPA5		4
RBBP4		3
SP110		3
AOF2		2
CD82		1
NECAP1		1
MDN1		1
RPLP0	51	9
RPS5	46	2
KRT18	36	9
IFITM3	13	32
PLAU	1	3
LDHA	1	21
PSMC1	3	11
TMSB10	1	4
PKM2	29	10
KRT19	20	3

4.3 Mapeamento dos genes clonados em regiões de perda cromossômica ou LOH (*Loss Of Heterozygosity*)

A tabela 6 retrata o resultado do mapeamento dos genes em 23 regiões de perda cromossômica distribuídas em 14 cromossomos. Essas regiões estão associadas a diferentes tumores de cabeça e pescoço. Do total de genes clonados, 15% (63 genes) estão situados na região de LOH. Destes, 35% foram específicos da cultura não-tratada, 49% específicos da cultura tratada e 16% comuns às duas culturas. Curiosamente, 32% dos genes foram mapeados nas regiões 11q21-q23 e 11p14-pter, com maior contribuição da cultura tratada (figura 11).

Tabela 6. Número de genes localizados em regiões de perda cromossômica associada a tumores de Cabeça e Pescoço.

Cromossomos	Regiões de perda cromossômica	Número de genes		
		Não-tratado	Tratado	Comuns
1	1p21-p22	1	1	2
2	2q35-q37		3	1
3	3p11-pter	2		1
4	4p14-pter 4q31.1-qter 4q32-qter		1	
5	5q15-q31 5q33-q35	5	1	1
6	6q25-qter 6q14-q16			
9	9q13-q21.3 9p21-pter		2	
11	11q21-q23 11p14-pter	6	11	3
12	12q21		6	
13	13q12-q22 13q21-q31		2	1
18	18q12 18q21-qter	1		
21	21q21			
22	22q12.3-qter	4		
X	Xp11.4-p21 Xq21-qter	2	4	1
Total de genes		21	31	10

Figura 11. Genes encontrados nas bibliotecas subtrativas não-tratada e tratada mapeados em regiões de LOH (*Loss Of Heterozygosity*).

4.4 Classificação Funcional

O resultado da classificação funcional para os genes encontrados nas culturas celulares tratada e não-tratada com diferenças estatisticamente significante, $p < 0,05$ é mostrado na figura 12.

Figura 12. Análise comparativa da classificação funcional dos genes clonados da linhagem tratada e não-tratada.

Através desta análise observa-se que dentre os genes analisados, há uma predominância do número de genes envolvidos nos processos relacionados ao metabolismo (65% e 74%) e processos fisiológicos celulares (84% e 81%), respectivamente nas culturas celulares tratada e não-tratada.

Observa-se também que em algumas categorias como comunicação celular, resposta a estímulos e regulação negativa de processos biológicos, o número de genes envolvidos é maior na cultura celular tratada do que na não-tratada.

4.5 Análise dos Genes com ilhas CpG

A análise das regiões promotoras dos genes clonados em nosso estudo revelou que 92% deles estão associados a ilhas CpG. Em relação aos genes específicos da linhagem tratada, 93% deles possuem ilhas CpG (Tabela 7).

Tabela 7. Número de genes associados à Ilha CpG identificados em nosso estudo.

Número de genes únicos		Ilha CpG	
<i>Específicos tratada</i>	181	169	(93%)
<i>Específicos não-tratada</i>	169	153	(91%)
<i>Comuns</i>	65	58	(89%)
<i>Total</i>	415	380	(92%)

4.6 Descrição dos genes selecionados e Validação dos dados obtidos no RaSH

Uma vez que a metilação leva a diminuição gradual da expressão gênica, o método de RT-PCR semi-quantitativo foi utilizado para validação da expressão diferencial dos genes candidatos (PLAU, CD82, RBBP4, AOF2, TMSB10, HSPA5, LAMC2) apontados pela técnica RaSH selecionados anteriormente.

PLAU (Plasminogen activator urokinase)

O gene PLAU (Plasminogen ativador urokinase) codifica um membro de uma família de serina-proteases envolvido na degradação de vários componentes da matriz extracelular, promovendo crescimento, invasão e metástase em diversas malignidades incluindo o câncer (GUO, *et al.*, 2002).

Para investigar a possibilidade de metilação aberrante dos dinucleotídeos CpG na região proximal do gene PLAU, a estrutura deste gene foi examinada com base no programa da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) (release de Março de 2006).

Figura 13. Arquitetura genômica do gene humano PLAU. A) Localização do gene PLAU no cromossomo humano número 10. B) estrutura de íntrons e éxons do gene PLAU. C) Região 5' do gene PLAU acrescida de 1000 pares de base *upstream* ao primeiro éxon, mostrando a localização da ilha CpG na sequência do gene submetida ao programa.

Análises do gene PLAU mostraram que este gene está contido em um intervalo genômico de 6365 pb e é composto por 11 éxons (Figura 13 B), sendo o primeiro éxon responsável pela região 5' não-traduzida do transcrito, mas não pelo sítio de início da tradução (ATG). Uma inspeção mais detalhada da região 5' do gene PLAU mostrou que essa região é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG que inclusive engloba o primeiro éxon do gene. (Figura 13 C).

O resultado da análise de expressão gênica mostrou um pequeno aumento na expressão do gene PLAU somente na linhagem UM-SCC-38A após o tratamento com 5-aza-2-deoxicitidina (Figura 14).

Figura 14. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene PLAU.

CD82 (CD82 molecule)

O gene CD82 codifica uma glicoproteína transmembrana que é membro da família tetraspanina e um supressor de metástase envolvido em processos biológicos que variam de fusão, adesão e migração a apoptose e alterações na morfologia da célula (TONOLI, BARRET, 2005). Sua hipoexpressão está associada a estágios avançados de muitos tipos de câncer (CHEN, *et al.*, 2004), (LIU, *et al.*, 2003), (SAUER, *et al.*, 2003) e correlacionada com a aquisição de potencial metastático (STARK, *et al.*, 2005), (JEE, *et al.*, 2006).

Para investigar a possibilidade de metilação aberrante dos dinucleotídeos CpG na região 5' do gene CD82, a estrutura deste gene foi examinada utilizando-se o programa da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) (release de Março de 2006) onde observou-se que o gene CD82 está mapeado no cromossomo 11p11.2 (Figura 15 A).

Figura 15. Arquitetura genômica do gene humano CD82. A) Localização do gene CD82 no cromossomo humano número 11. B) estrutura de íntrons e éxons do gene CD82. C) Região 5' do gene CD82 acrescida de 1000 pares de base *usptream* ao primeiro éxon, mostrando a localização de três ilhas CpG na sequência do gene submetida ao programa.

Análises do gene CD82 mostraram que este gene está contido em um intervalo genômico de 54173 pb e é composto por 10 éxons (Figura 15 B), sendo o éxon 1 responsável pela região 5' não-traduzida do transcrito, mas não pelo sítio de início da tradução (ATG). Uma inspeção mais detalhada da região 5' do gene CD82 mostrou que essa região é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG. (Figura 15 C).

O resultado da análise de expressão gênica mostrou aumento na expressão do gene CD82 após o tratamento com 5-aza -2-deoxicitidina nas linhagens UM-SCC-14A e UM-SCC-38A (figura 16).

Figura 16. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene CD82.

RBBP4 (Retinoblastoma binding protein 4)

Mapeado no cromossomo 1p35.1 (Figura 17 A), o gene RBBP4 está contido em um intervalo genômico de 29429 pb e é composto por 12 éxons (Figura do 17 B). A região 5' do gene é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG. (Figura 17 C).

Figura 17. Arquitetura genômica do gene humano RBBP4. A) Localização do gene RBBP4 no cromossomo humano número 1. B) estrutura de íntrons e éxons do gene RBBP4. C) Região 5' do gene RBBP4 acrescida de 1000 pares de base *upstream* ao primeiro éxon, mostrando a localização de duas ilhas CpG na sequência do gene submetida ao programa.

O resultado das análise de expressão gênica mostrou aumento na expressão do gene RBBP4 após o tratamento com 5-aza -2-deoxicitidina nas linhagens UM-SCC-14A e UM-SCC-38A (figura 18), sugerindo que o tratamento com o agente demetilante tenha restaurado ou aumentado a expressão deste gene nestas linhagens.

Figura 18. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene RBBP4.

AOF2 (amine oxidase (flavin containing) domain 2)

Já o gene AOF2 (amine oxidase (flavin containing) domain 2) codifica uma proteína componente de diversos complexos desacetiladores de histonas e que está envolvida em um grande número de processos biológicos como modificação da cromatina e regulação da transcrição (METZGER, *et al.*, 2005).

A estrutura deste gene foi analisada no programa da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) (release de Março de 2006) onde se observou que o gene AOF está mapeado no cromossomo 1p36.12 (Figura 19).

Figura 19. Arquitetura genômica do gene humano AOF2. A) Localização do gene AOF2 no cromossomo humano número 1. B) estrutura de íntrons e éxons do gene AOF2. C) Região 5' do gene AOF2 acrescida de 1000 pares de base *upstream* ao primeiro éxon, mostrando a localização de uma ilha CpG na sequência do gene submetida ao programa.

O gene AOF2 está contido em um intervalo genômico de 64239 pb e é composto por 19 éxons (Figura 19 B). Uma inspeção mais detalhada da região proximal do gene AOF2 mostrou que essa região é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG (Figura 19 C).

A análise de expressão gênica mostrou aumento na expressão do gene AOF2 após o tratamento com 5-aza -2-deoxicitidina nas linhagens UM-SCC-14A e UM-SCC-38A (figura 20).

Figura 20. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene AOF2.

TMSB10 (thymosin, beta 10)

O gene TMSB10 (thymosin, beta 10) codifica uma proteína envolvida na organização do citoesqueleto e biogênese, além de agir como um potente inibidor da angiogênese e do crescimento tumoral devido a sua interação com Ras (LEE, *et al.*, 2005).

A estrutura do gene também foi analisada no programa da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) (release de Março de 2006).

Figura 21. Arquitetura genômica do gene humano TMSB10. A) Localização do gene TMSB10 no cromossomo humano número 2. B) estrutura de íntrons e éxons do gene TMSB10. C) Região 5' do gene TMSB10 acrescida de 1000 pares de base *usptream* ao primeiro éxon, mostrando a localização de duas ilhas CpG na sequência do gene submetida ao programa.

O gene TMSB10 está contido em um intervalo genômico de 1037pb e é composto por 3 éxons (Figura 21 B). Uma inspeção mais detalhada

da região proximal do gene TMSB10 mostrou que essa região é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG (Figura 21 C).

A análise de expressão gênica por RT-PCR semiquantitativo mostrou aumento na expressão do gene TMSB10 após o tratamento com 5-aza-2-deoxicitidina somente na linhagem celular UM-SCC-38A (figura 22).

Figura 22. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene TMSB10.

AMC2 (laminin, gamma 2)

As Lamininas, principais constituintes da membrana basal, são uma família de proteínas extracelulares envolvidas em uma grande variedade de processos biológicos que incluem adesão celular, diferenciação, migração, sinalização e metástase (KLEINMAN, *et al.*, 1985). São compostas por três cadeias distintas: laminina alfa, beta e gama e cada uma das cadeias é codificada por um gene diferente, com diversas isoformas.

O gene LAMC2 (laminin, gamma 2) codifica a cadeia gama 2, expressa em muitos tecidos fetais e que, em conjunto com as cadeias alfa 3 e beta 3 constitui a laminina 5, que por sua vez, é parte integrante dos filamentos que conectam células epiteliais a membrana basal (GIANNELLI; ANTONACI, 2000).

A estrutura do gene também foi analisada no programa da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) (release de Março de 2006) onde se observou que o gene LAMC2 está mapeado no cromossomo 1q25.3 (Figura 23 A).

Figura 23. Arquitetura genômica do gene humano LAMC2. A) Localização do gene LAMC2 no cromossomo humano número 1. B) estrutura de íntrons e éxons do gene LAMC2. C) Região 5' do gene LAMC2 acrescida de 1000 pares de base *usptream* ao primeiro éxon, mostrando a localização de duas ilhas CpG na sequência do gene submetida ao programa.

O gene LAMC2 está contido em um intervalo genômico de 55000pb e é composto por 22 éxons (Figura 23 B). Uma inspeção mais detalhada da região proximal do gene mostrou que essa região é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG (figura 23 C).

A análise de expressão gênica por RT-PCR semiquantitativo mostrou um aumento na expressão do gene LAMC2 após o tratamento com 5-aza -2-deoxicitidina nas linhagens UM-SCC-14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-38A (figura 24).

Figura 24. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene LAMC2.

HSPA5 (heat shock 70kDa protein 5 ou glucose-regulated protein, 78kDa))

Finalmente, a proteína GRP78 ou HSPA5 é responsável por mecanismos protetores contra estresse fisiológico. Esta proteína se localiza no lúmen do retículo endoplasmático, onde funciona como uma chaperona de forma dependente de ATP. Ela se liga a polipeptídeos recém sintetizados de forma transitória e não-covalente para facilitar a montagem e empacotamento apropriado, evitando a degradação (FERNANDEZ, *et al.*, 2000).

A estrutura do gene foi analisada no programa da Universidade da Califórnia em Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/>) (release de Março de 2006) onde observou-se que o gene HSPA5 está mapeado no cromossomo 9q33.3 (Figura 25 A).

Figura 25. Arquitetura genômica do gene humano HSPA5. A) Localização do gene HSPA5 no cromossomo humano número 9. B) estrutura de íntrons e éxons do gene HSPA5. C) Região 5' do gene HSPA5 acrescida de 1000 pares de base *upstream* ao primeiro éxon, mostrando a localização de duas ilhas CpG na sequência do gene submetida ao programa.

O gene HSPA5 está contido em um intervalo genômico de 6476 pb e é composto por 8 éxons (Figura 25 B). Uma inspeção mais detalhada da região proximal do gene HSPA5 mostrou que essa região é rica em dinucleotídeos CG, possuindo os critérios que definem uma ilha CpG (figura 25 C).

O resultado da análise de expressão gênica mostrou aumento na expressão do gene HSPA5 após o tratamento com 5-aza -2-deoxicitidina nas linhagens UM-SCC-14A e UM-SCC-38A (figura 26).

Figura 26. Perfil eletroforético de RT-PCR semiquantitativo para o gene HSPA5.

5. DISCUSSÃO

Alterações gênicas têm sido largamente descritas no câncer de cabeça e pescoço, incluindo mutações no gene *p53*, hiperexpressão da ciclina D1 (XU, *et al.*, 1998), e metilação de promotores de genes supressores de tumor (SHINTANI, *et al.*, 2001). Este último fator se tornou bastante importante como marcador tumoral devido a sua alta frequência de ocorrência, facilidade de detecção e principalmente pela possibilidade de ser revertido com drogas apropriadas.

Tuynder e colaboradores (2002) realizaram um estudo com o objetivo de explicar algumas propriedades moleculares e fenotípicas do processo de reversão tumoral. Para tanto, através de uma metodologia apropriada, analisaram a expressão diferencial de genes entre células tumorais parentais e suas células filhas com fenótipo maligno revertido, identificando assim vários genes que foram ativados ou inibidos durante esse processo.

O tratamento de células FaDu com 5-aza-2-deoxicitidina pode ser caracterizado, em parte, como uma tentativa de reversão da transformação celular pelo menos no que se refere aos processos celulares afetados direta ou indiretamente pela metilação. Neste trabalho, a investigação foi conduzida com base no fato de que o fenótipo do câncer resulta muito mais da expressão alterada do gene do que propriamente de uma mutação (SAGER, 1997).

A análise de expressão entre culturas de células não-tratada e tratada com agentes demetilantes, pode informar não só quais os genes metilados, como também aqueles que são afetados pelo silenciamento mediado pela metilação e que conseqüentemente poderão estar envolvidos na tumorigênese do câncer de cabeça e pescoço. Com esta finalidade, nosso grupo realizou uma análise de bibliotecas subtrativas de uma linhagem de cabeça e pescoço não-tratada contra a mesma linhagem tratada com agente demetilante.

A relação dos genes identificados na cultura tratada reflete teoricamente o efeito do agente demetilante, gerando uma lista de genes metilados no estado tumoral. Neste trabalho, as análises se concentraram principalmente na na cultura tratada, com o objetivo de identificar genes que metilados no câncer de cabeça e pescoço e que, portanto, tiveram expressão exclusiva ou aumentada após o tratamento com o agente demetilante. Sete genes (PLAU, CD82, RBBP4, AOF2, TMSB10, LAMC2 e HSPA5) foram selecionados com base no número de clones na cultura tratada e em informações sobre o seu papel em processos biológicos como morfogênese, comunicação celular e metabolismo.

Para validação da expressão diferencial destes genes por RT-PCR foram utilizadas, além da linhagem celular FaDu, outras três linhagens de câncer de cabeça e pescoço que receberam o mesmo tratamento com agente demetilante. Os resultados desta validação corroboraram os dados obtidos no RaSH apenas nas linhagens UM-SCC14A, UM-SCC-17A e UM-SCC-38A.

Com relação ao gene PLAU, estudos sugerem que a combinação de atividade elevada de DNA metiltransferases com atividade reduzida de demetilases contribui para a metilação e silenciamento deste gene em células tumorais de mama MCF-7 (GUO, *et al.*, 2002). Em seu trabalho, Pakneshan e colaboradores (2004) examinaram o estado da metilação do promotor do gene PLAU e seu nível de expressão em células epiteliais normais de mama e em linhagens tumorais de mama. Como resultado, observaram que a expressão de PLAU era detectada somente em linhagens tumorais de mama altamente invasivas, em consequência da hipometilação progressiva de seu promotor. Em células normais e tumorais com baixo potencial invasivo o promotor do gene PLAU encontrava-se metilado, resultando na baixa expressão do gene. Além disso, há evidências de que este gene esteja sob o controle da metilação também em tumores gástricos e de próstata (YAMASHITA, *et al.*, 2006), (WANG, *et al.*, 2005). Em nosso estudo, apenas a linhagem UM-SCC-38A mostrou um pequeno aumento da expressão do gene PLAU após o tratamento com 5-aza-2-deoxicitidina.

Já para o gene CD82, estudos recentes sugerem que a perda de sua função é devida a um mecanismo que inclui alterações transcricionais e pós transcricionais (TONOLI, BARRET, 2005), uma vez que diversos trabalhos realizados não apontam evidências da existência de mutações em regiões codificadoras deste gene (UZAWA, *et al.*, 2002).

Embora alguns estudos não tenham encontrado relação entre a diminuição da expressão de CD82 em tumores e a hipermetilação do promotor deste gene (UZAWA, *et al.*, 2002), (SEKITA, *et al.*, 2001), (JACKSON, *et al.*, 2000) Drucker *et al.* (2006) investigaram a metilação do promotor de CD82 pacientes de mieloma múltiplo. A retomada da transcrição do gene após tratamento com agente demetilante sugeriu a significância do mecanismo de metilação em sua regulação.

O gene RBBP4 (Retinoblastoma binding protein 4) codifica uma proteína nuclear pertencente a uma subfamília de proteínas altamente conservadas. Embora não existam informações sobre o seu mecanismo de regulação sabe-se que ela faz parte de um complexo protéico que tem sido relacionado ao remodelamento da cromatina e repressão transcricional associada à desacetilação de histonas. Esta proteína também faz parte de complexos co-repressores que são componentes importantes do silenciamento transcricional e acredita-se que também possa participar da regulação da proliferação celular (QIAN, *et al.*, 1993).

Em seu estudo, Hakimi *et al.* (2002), sugerem que o gene AOF2 participe da repressão de genes neuro-específicos através do elemento cis-regulatório conhecido como elemento repressor 1 (RE1). Já Metzger *et al.* (2005) reportam que AOF2 interage com o receptor de andrógeno *in vitro* e *in vivo*, estimulando a transcrição dependente do receptor de estrógeno. Eles relacionam a demetilação de uma histona repressiva à ativação de genes dependentes do receptor de andrógeno, fornecendo um mecanismo pelo qual as demetilases controlam a expressão de genes específicos.

Lee *et al.* (2001) reportaram a diminuição da expressão do gene TMSB10 em tecidos tumorais de ovário. Esses pesquisadores observaram que, quando expresso em células tumorais de ovário, o gene funciona como um

supressor tumoral, por levar ao rompimento da estrutura da actina, proporcionando um aumento na taxa de apoptose.

Posteriormente, Lee *et al.* (2005) mostraram que a inibição da transdução de sinal de Ras por timosina B10 resulta em efeitos antiangiogênicos e antitumorais, sugerindo que esse gene seja importante para o desenvolvimento de terapias contra o câncer. Não há relatos, porém, de que este gene esteja sob o controle da metilação.

Com relação ao gene LAMC2, embora Patel *et al.* (2002) tenham observado aumento na expressão de laminina-gama-2 em carcinoma de cabeça e pescoço, diversos trabalhos relatam o silenciamento epigenético de LAMC2 em câncer de pulmão (SATHYANARAYANA, *et al.* 2003), mama (SATHYANARAYANA, *et al.* 2003), próstata (SATHYANARAYANA, *et al.* 2003) e bexiga (SATHYANARAYANA, *et al.* 2004).

Finalmente, embora o gene HSPA5 (heat shock 70kDa protein 5 ou glucose-regulated protein, 78kDa) seja constitutivamente expresso, sua expressão é aumentada em células submetidas a situações de estresse (LEE, 2005). Devido à baixa vascularização, tumores sólidos geralmente possuem regiões submetidas à deprivação de glicose e hipoxia, resultando em acidose e alterações no metabolismo celular (XING, *et al.*, 2006). Embora existam estudos relacionando a hiperexpressão de GRP78 e câncer (LUK, *et al.*, 2006), (FERNANDEZ, *et al.*, 2000), (XING, *et al.*, 2006), não há informações sobre os mecanismos que controlam esta ativação.

Embora todos os genes candidatos tenham mostrado aumento em sua expressão após o tratamento com 5-aza-2-deoxicitidina em pelo menos uma das linhagens estudadas, nós consideramos que este aumento tenha sido pequeno. No entanto, ressaltamos que nenhuma inferência pode ser feita a respeito da importância dessas pequenas alterações na dinâmica de diversos processos celulares, de forma que mesmo uma pequena alteração como a encontrada pode trazer consequências importantes na fisiologia da célula.

De qualquer maneira, após as análises de expressão gênica deverão ser realizados estudos da metilação da região promotora dos

genes pelo método de sequenciamento após modificação do DNA por bissulfito. Embora esta estratégia tenha sido tentada diversas vezes, os resultados não foram informativos para a caracterização do estado de metilação destes genes. Além disso, análises em amostras de tumores e tecido normal também seriam importantes e acrescentariam informações sobre o espectro do estado de metilação em tumores de cabeça e pescoço.

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste estudo foram:

- A abordagem utilizada neste trabalho foi eficiente na geração de uma lista de genes candidatos ao controle por metilação.
- 93% dos genes identificados após o tratamento com o agente demetilante 5-aza-2-deoxicitidina estão associados a ilhas CpG. Tais ilhas incluem a região promotora do gene e regiões codificadoras.
- 15 % dos genes identificados estão mapeados em regiões de perda cromossômica. Este fato em conjunto com a metilação destes genes pode explicar a heterogeneidade de expressão em diferentes tumores.
- Entre os genes encontrados na biblioteca tratada com 5-aza-2-deoxicitidina, os genes PLAU, CD82, RBBP4, AOF2, TMSB10, HSPA5, LAMC2 foram selecionados e todos mostraram aumento de sua expressão em pelo menos uma das quatro linhagens celulares após o tratamento com o agente demetilante, corroborando os dados obtidos no RaSH. Destes, três genes (RBBP4, TMSB10 e HSPA5) não possuem informações sobre seus respectivos mecanismos de regulação ou associação com a metilação.

7. REFERÊNCIAS

Al, L. *et al.* Epigenetic silencing of the tumor supressor cystatin M occurs during breast cancer progression. **Cancer Res**, n. 66, v. 16, p. 7899-7909, 2006.

ALTSCHUL, S.F. *et al.* Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.**, n. 215, v. 3, p. 403-410, 1990.

BESTOR, T. *et al.* Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **J Mol Biol.**, n.203, p. 971-983, 1988.

CHEN, Z. *et al.* CD82 and CD63 in thyroid cancer. **Int J Mol Med.**, n. 14, v. 4, p. 517-527, 2004.

CHIN, D. *et al.* Molecular Introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. **The British Association of Plastic Surgeons**, n. 57, p. 595-602, 2004.

COSTA, F.F. *et al.* ADAM23 methylation and expression analysis in brain tumors. **Neuroscience letters**, n. 380, p. 260-264, 2005.

DRUCKER, L. *et al.* Promoter hypermethylation of tetraspanin members contributes to their silencing in myeloma cell lines. *Carcinogenesis*, n. 2, v. 27, 197-204, 2006.

ESTELLER, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. **Oncology**, n. 4, p. 351-358, 2003.

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

EHRlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene**, n. 21, p. 5400-5413, 2002.

FERNANDEZ, P.M. *et al.* Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. **Breast Cancer Research and Treatment**, m. 59, p. 15-26, 2000.

GALM, O.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. **Blood Reviews**, n. 20, p. 1-13, 2006.

GAUDET, F. *et al.* Induction of tumors in mice by by genomic hypomethylation. **Science**, n. 300, p. 489-492, 2003.

GIANNELLI, G.; ANTONACI, S. Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. **Clin. Exp. Metastasis**, n. 18, p. 439-443, 2000.

GUO, Y. *et al.* Regulation of DNA methylation in human breast cancer. **The Journal of Biological Chemistry**. n. 44, v. 277, p. 41571-41579, 2002.

GUO, M. *et al.* Hypermethylation of the GATA gene family in esophageal cancer. **Int. J. Cancer**, n. 119, p. 2078-2083, 2006.

HAKIMI, M-A. *et al.* A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, n. 11, v. 99, p. 7420-7425, 2002.

HARDISSON, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol.**, n. 260, p. 502-508, 2003.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. **Mol Cell Biol.**, n. 18, p. 6538-6547, 1998.

HERMAN, JG. *et al.* Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, n. 93, p. 9821-9826, 1996.

JACKSON, P. *et al.* Methylation of a CpG island within the promoter region of the KAI1 metastasis suppressor gene is not responsible for down-regulation of KAI1 expression in invasive cancer of cancer cell lines. **Cancer Lett.**, n. 157, v. 2, p. 169-176, 2000.

JEE, B.K. *et al.* KAI1/CD82 suppresses tumor invasion by MMP9 inactivation via TIMP1 up-regulation in the H1299 human lung carcinoma cell line. **Biochemical and biophysical research communications**, n. 342, p. 655-661, 2006.

JIANG, H. *et al.* RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. **PNAS**. n. 97, p. 12684 – 12689, 2000.

JONES, PA.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of Epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet.**, n. 6, p. 415-428, 2002.

KLEINMAN, H.K. *et al.* Biological activities of laminin. **J Cell Biochem.**, n. 27, p. 317-325, 1985.

KWONG, J. *et al.* Epigenetic silencing of cellular retinol-binding proteins in nasopharyngeal carcinoma. **Neoplasia**, n. 1, v. 7, p. 67-74, 2005.

LAIRD, PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews**, n. 3, p. 253-266, 2003.

LEE, A.S. The ER chaperone and signaling regulator GPR78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, n. 32, p. 373-381, 2005.

LEE, S-H. *et al.* Overexpression of the thymosin B-10 gene in human ovarian cancer cells disrupts F-actin stress fiber and leads to apoptosis. **Oncogene**, n. 20, p. 6700-6706, 2001.

LEE, S-H. *et al.* Thymosin B10 inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with Ras function. **Cancer Res.**, n. 65, v. 1, p. 137-147, 2005.

LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, n.18, v. 11, p. 1427-1431, 2002.

LIU, F.S. *et al.* KAI1 metastasis suppressor protein is down-regulated during the progression of human endometrial cancer. **Clin Cancer Res.**, n. 9, v. 4, p. 1393-1398, 2003.

LUK, J.M. *et al.* Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (Hsp27, Hsp70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. **Proteomics**, n. 6, v. 3, p. 1049-1057, 2006.

MCMAHON, S.; CHEN, A. Head and Neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, n. 22, p. 21-24, 2003.

METZGER, E. *et al.* LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. **Nature**, n. 437, v. 15, p. 436-439, 2005.

MUKAI, T.; SEKIGUCHI, M. Gene silencing in phenomena related to DNA repair. **Oncogene**, n. 21, p. 9033-9042, 2002.

NEPHEW, KP; HUANG, THM. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. **Cancer Letters**, n. 190, p. 125-133, 2003.

PAKNESHAN, P.; TETU, B.; RABBANI, S.A. Demethylation of urokinase promoter as a prognostic marker in patients with breast carcinoma. **Clin Cancer Res.**, n.10, v. 9, p. 3035-3041, 2004.

PATEL, V. *et al.* Laminin- γ 2 overexpression in head-and-neck squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, n. 99, p. 583-588, 2002.

PINHEIRO, D. G.; CUNHA, M. A. V.; SILVA, I. T.; ZAGO, M. A.; SILVA JR, W. A. Sistema genérico de anotação de ESTs. Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática, Centro de Terapia Celular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. **VIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde**, 2002.

QIAN, Y-W. *et al.* A retinoblastoma-binding protein related to a negative regulator of Ras in yeast. **Nature**, n. 364, p. 648-652, 1993.

RUSH, L.J.; PLASS, C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. **Cancer Letters**, n. 185, p. 1-12, 2002.

SAGER, R. Expression genetics in cancer: Shifting the focus from DNA to RNA. **Proc. Acad. Sci. USA.**, n. 94, v. 3, p. 952-955, 1997.

SATHYANARAYANA, U.G. *et al.* Aberrant promoter methylation of laminin-5-encoding genes in prostate cancer and its relationship to clinicopathological features. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 6395-6400, 2003.

SATHYANARAYANA, U.G. *et al.* Aberrant promoter methylation and silencing of laminin-5-encoding genes in breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 6389-6394, 2003.

SATHYANARAYANA, U.G. *et al.* Aberrant inactivation of laminin-5-encoding genes in lung cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 2665-2672, 2003.

SATHYANARAYANA, U.G. *et al.* Molecular detection of noninvasive and invasive bladder tumor tissues and exfoliated cells by aberrant promoter methylation of laminin-5 encoding genes. **Cancer research**, n. 64, p. 1425-1430, 2004.

SAUER, G. *et al.* Expression of tetraspanin adaptor proteins below defined threshold values is associated with in vitro invasiveness of mammary carcinoma cells. **Oncol. Rep.**, n. 10, v. 2, p. 405-410, 2003.

SEKITA, N. *et al.* Epigenetic regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene in human prostate cancer cell lines. **Jpn J Cancer Res.**, n. 92, v. 9, p. 947-951, 2001.

SHINTANI, S. *et al.* Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, n. 37, v. 6, p. 498-504, 2001.

STARK, A.M. *et al.* Reduced metastasis-suppressor gene mRNA-expression in breast cancer brain metastases. **J Cancer res Clin Oncol.**, n. 131, p. 191-198, 2005.

STRATHDEE, G.; BROWN, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. **Expert Rev Mol Med.**, Glasgow, n. 4, p. 1-17, 2002.

TATE, P.H.H.; BIRD, A.P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. **Curr Opin Genet Dev.**, n. 3, p. 226-231, 1993.

TONOLI, H.; BARRET, J.C. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? **Trends in molecular medicine**, n. 12, v. 11, p. 563-570, 2005.

TUYNDER, M. *et al.* Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through *tpt1/TCTP* and *SIAH-1*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 99, p. 23, p. 14976-14981, 2002.

TYLER, J.K.; KADONAGA, J.T. The “dark side” of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. **Cell**, n. 99, p. 446-446, 1999.

UZAWA, K. *et al.* High prevalence of decreased expression of KAI1 metastasis suppressor in human oral carcinogenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 828-835, 2002.

WANG, Y. *et al.* Survey of differentially methylated promoters in prostate cancer cell lines. **Neoplasia**, n. 8, v. 7, p. 748-760, 2005.

XING, X. *et al.* Overexpression of glucose-regulated protein 78 in colon cancer. **Clinica Chimica Acta.**, n. 364, p. 308-315, 2006.

XU, J. *et al.* Alterations of p53, cyclin D1, Rb, and H-ras in human oral carcinomas related to tobacco use. **Cancer**, n. 83, v. 2, p. 204-212, 1998.

YAMASHITA, S. *et al.* Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2' -deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. **Cancer Sci.**, n. 1, v. 97, p. 64-71, 2006.

<http://itsa.ucsf.edu~urolab/methprimer/>

<http://www.gdm.fmrp.usp.br>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

<http://genome.ucsc.edu/>)