UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**O papel da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de
DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral**

Maryna Aguilar Tannous

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

O papel da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Maryna Aguilar Tannous

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 03/10/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Tannous, Maryna Aguilar.

O papel da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral. Ribeirão Preto, 2014.

122 p.: il. ; 30 cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Leopoldino, Andréia Machado.

1. SET/I₂PP2A/TAF-I β . 2. Metilação de miRNA. 3. Reparo de DNA. 4. ATM. 5. DDR. 6. DSB.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Maryna Aguilar Tannous

Título do trabalho: O papel da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Andréia Machado
Leopoldino

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha mãe, Anastácia, pelo amor incondicional,
carinho, sabedoria e compreensão.

À minha irmã, Monique, que eu tanto amo
e que sempre me apoiou em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos da vida. Em especial a minha mãe e irmã, que sempre estiveram presentes e são fundamentais em minha vida.

Às minhas amigas, Camila Palma, Camila Devicaro, Damilly, Geisa, Joana, Laís e Rafaella, pelo companheirismo, pelas alegrias e também problemas compartilhados desde a graduação. Obrigada pela amizade, que será para a vida toda.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Andréia Machado Leopoldino, pela oportunidade de trabalho no Laboratório de Marcadores e Sinalização Celular no Câncer (MSCC), pelo auxílio em todos os momentos da realização do projeto de mestrado e acima de tudo pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório MSCC, Camila, Renata, Karina, Lays, Neto, Lucas e Cristiana, pela ajuda intelectual e técnica durante a realização desse trabalho e, principalmente, pelos ensinamentos, amizade e diversos momentos bons compartilhados.

Ao Prof. Dr. Carlos Curti, que ajudou no desenvolvimento desse trabalho, por todas as correções e sugestões.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira, pela disponibilização do espaço físico e equipamentos indispensáveis ao desenvolvimento do projeto e pelas valiosas conversas e conselhos.

Aos amigos dos laboratórios dos Professores Sérgio Akira e Carlos Curti, Emerson, Fernanda, Hamilton, Lais, Silveli, Amanda e Valéria, por todos os bons momentos compartilhados e pela ajuda intelectual e técnica quando precisei. Aos técnicos, Antônio e Franco, que também foram importantes nesse meu caminho.

Ao Dr. Harley Francisco de Oliveira e ao físico Leonardo Amaral pela oportunidade de uso do equipamento para irradiação das células no departamento de radioterapia do Hospital das Clínicas de Ribeirão.

A todos os funcionários da pós-graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, em especial ao Henrique, pela grande ajuda durante essa caminhada.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro para a pesquisa e pela bolsa de mestrado (processo 2012/12928-5), e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa durante o primeiro ano de mestrado.

Aos Professores integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem parte de seu tempo para a análise desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, meu sincero agradecimento.

Não faças do amanhã
o sinônimo de nunca,
nem o ontem te seja o mesmo
que nunca mais.
Teus passos ficaram.
Olhes para trás...
mas vá em frente,
pois há muitos que precisam
que chegues para poderem seguir-te.

Charlie Chaplin

RESUMO

Tannous, M. A. O papel da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de DNA em células humanas de carcinoma espinocelular oral. 2014. 118f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

O início e a progressão do carcinoma espinocelular oral (CEO) são caracterizados pela aquisição de alterações genéticas e epigenéticas. A proteína SET é descrita como uma oncoproteína e, recentemente, o seu acúmulo foi mostrado em CEO. Diversas funções têm sido atribuídas à SET, tais como controle do ciclo celular, sobrevivência celular, migração celular, acetilação de histonas, e resposta ao estresse oxidativo. Este contexto sugere a SET como alvo terapêutico, mas primeiramente, é essencial entender a sua ação na tumorigênese e progressão em CEO. A hipótese central no presente estudo refere-se ao papel da SET na instabilidade genômica e reparo de DNA, bem como na regulação epigenética da expressão de miRNA, com impacto no desenvolvimento e progressão de CEO. O silenciamento estável de RNA foi realizado usando plasmídeo contendo *short hairpin RNA* contra SET (shSET) em linhagens de CEO *in vitro* (HN12 e Cal27) e *in vivo* (tumores xenoinxerto de HN12). Efeitos da redução da SET em CEO, *in vitro* e *in vivo*, foram avaliados no perfil de metilação (MSP, *methylation specific PCR*), expressão de miR-9 (qRT-PCR) e reparo de DNA (reparo *mismatch* e de quebra de fita dupla - DSB). A instabilidade genômica foi abordada por meio de cinco microssatélites (PCR convencional) para avaliar a instabilidade de microssatélites (MSI), e ensaio cometa para avaliar danos ao DNA (SSB, DSB, cross-link, etc.). O *status* de proteínas envolvidas em reparo de DSB (ATM, BRCA1 e MLH1) foi avaliado por imunofluorescência e *Western blotting* (WB). A resposta aos danos no DNA (DDR) induzidos por radioterapia (raios-X) foram analisados nas células HN12 por meio de ensaios clonogênico e de ciclo celular; proteínas associadas à apoptose, autofagia, ciclo celular e reparo foram avaliadas por WB. A redução da SET nas células HN12 modificou a transcrição dos *loci* codificantes do miR-9 por meio da reversão parcial de hipermetilação, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para o *locus* *miR-9-1*, e *in vitro* para o *miR-9-3*, com aumento nos níveis de miR-9 e miR-9*. A análise de 5 microssatélites mostrou alteração no perfil alélico de dois marcadores, *D5S346* e *D2S123*, nas células HN12 shSET e nos tumores xenoinxerto da HN12 shSET (*in vivo*) em relação aos respectivos controles, o que sugere a presença de MSI e é um indício do papel da SET no reparo de DNA tipo *mismatch*. A linhagem HN12 shSET apresentou diminuição de danos no DNA e aumento das proteínas de reparo de DSB, MLH1, ATM, p-ATM e BRCA1 em relação a células HN12 shCTRL. Na DDR induzida por raios-X as células HN12 shSET apresentaram nas primeiras 48 horas uma menor perda de viabilidade (menor % em sub G0/G1), com parada em G2/M, maior nível de ATM ativa, aumento dos níveis de p21 e LC3B-II, além de menor clivagem de PARP e caspase-8 em relação as células HN12 shCTRL; isto sugere uma melhor resposta a danos de DSB e ativação de vias de sobrevivência nas células HN12 shSET. Entretanto, após 12 dias de radioterapia as células HN12 shSET mostraram uma tendência a menor sobrevivência. Portanto, os nossos resultados indicam o envolvimento da SET na regulação transcricional do miR-9, nas vias de reparo do tipo *mismatch* e de DSB em CEO, com potenciais implicações tanto na tumorigênese quanto na progressão da doença.

Palavras-chave: 1. SET/I₂PP2A/TAF-I β . 2. Metilação de miRNA. 3. Reparo de DNA. 4. ATM. 5. DDR. 6. DSB.

ABSTRACT

Tannous, MA. The role of SET protein in miR-9 methylation profile and DNA repair in human oral squamous cell carcinoma. 2014. 118f. Thesis (Master's degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) onset and progression are characterized by acquisition of genetic and epigenetic alterations. SET protein is known as an oncoprotein and, recently, its accumulation was demonstrated in OSCC. Several functions have been attributed to SET, such as cell cycle control, cell survival, cell migration, histone acetylation, and response to oxidative stress. This context outstands SET as a therapeutic target, but first, it is essential to understand its role in tumorigenesis and progression in OSCC. The central hypothesis of this study refers to SET role in genomic instability and DNA repair, as well as miRNA epigenetic regulation, with impact in OSCC development and progression. Stable SET knockdown (shSET) was achieved using short hairpin RNA against SET mRNA *in vitro* (HN12 and Cal27, OSCC cell lines) and *in vivo* (HN12 xenografts tumors). Effects of SET knockdown were assessed in OSCC, *in vitro* e *in vivo*, regarding DNA methylation (MSP, methylation specific PCR) and expression of miR-9 (qRT-PCR), and DNA repair (mismatch and double-strand breaks/DSB repair). Genomic instability was addressed by means of five microsatellites (conventional PCR) to assess microsatellite instability (MSI), and comet assay to assess DNA damage (SSB, DSB, cross-link, etc.). The status of proteins involved in DSB repair (ATM, BRCA1 and MLH1) was assessed by immunofluorescence and Western blotting (WB). The DNA damage response (DDR) induced by ionizing radiation (X-rays) was assessed in HN12 cells through clonogenic and cell cycle assays; proteins associated with apoptosis, autophagy, cell cycle and repair were assessed by WB. SET knockdown in HN12 cells modified miR-9 transcription through hypermethylation partial reversal for miR-9-1 locus, both *in vitro* and *in vivo*, and for miR-9-3 *in vitro*, with increase of miR-9 and miR-9* levels. Analysis of 5 microsatellites showed changes in the allelic profile of two markers, *D5S346* and *D2S123*, in HN12 shSET cells (*in vitro*) and HN12 shSET xenografts tumors (*in vivo*) compared to their controls, suggesting MSI and it's a clue of SET role in mismatch repair. HN12 shSET cells showed decreased DNA damage and increased DSB repair protein levels (MLH1, ATM, p-ATM and BRCA1) compared to HN12 shCTRL. In the first 48 hours, HN12 shSET X-rays-induced DDR showed lower loss of viability (lower % in subG0/G1), increased G2/M checkpoint, higher levels of active ATM, p21, LC3B-II, and less PARP and caspase-8 cleavage than HN12 shCTRL. These results suggest a higher efficiency of DSB damage response and activation of survival pathways in the presence of SET knockdown. However, 12 days after radiotherapy, HN12 shSET cells presented a tendency for higher intrinsic radiosensitivity in relation to control. Therefore, our findings indicate a SET involvement in miR-9 transcriptional regulation, and in mismatch and DSB repair, with potential implications in oral tumorigenesis and progression.

Key-words: 1. SET/I₂PP2A/TAF-I β . 2. miRNA methylation. 3. DNA repair. 4. ATM. 5. DDR. 6. DSB.

RESUMEN

Tannous, M. A. Función de la proteína SET en el perfil de metilación del miR-9 y en la reparación del DNA en el carcinoma oral de células escamosas humano. 118f. 2014. Tesis (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

El inicio y la progresión del carcinoma de células escamosas oral (CEO) se caracterizan por la adquisición de alteraciones genéticas y epigenéticas. Se describe la proteína SET como una oncoproteína y recientemente se demostró su acumulación en CEO. Varias funciones se han atribuido a SET, como el control del ciclo celular, la sobrevivencia y migración celular, la acetilación de histonas y la respuesta al estrés oxidativo. Este contexto sugiere la utilización de SET con objetivo terapéutico, pero su acción en la tumorigénesis y progresión del cáncer oral aún es poco conocida. La hipótesis central de este estudio se refiere al papel de la proteína SET en la inestabilidad genómica y la reparación del ADN, así como en la modificación epigenética de los miRNAs con influencias en el desarrollo y progresión de CEO. El silenciamiento estable de la proteína SET se logró utilizando el *short hairpin RNA* contra el mRNA de SET (shSET) en líneas de CEO *in vitro* (HN12 y Cal27) e *in vivo* (tumores xenoinjertos de HN12). Los efectos de la reducción de SET en el perfil de metilación (MSP, PCR específica para metilación), en la expresión de miR-9 (QRT-PCR) y la reparación del ADN (reparación de mal apareamiento y de la rotura doble de la cadena de ADN/DSB) se han evaluado *in vitro* e *in vivo*. Cinco microsatélites fueron analizados por PCR convencional para evaluar la inestabilidad de microsatélites (MSI) y se cuantificaron los daños de ADN por el ensayo cometa en líneas HN12 y Cal27 (shCTRL y shSET). Se han analizado las proteínas implicadas en la reparación de DSB (ATM, BRCA1 y MLH1) por inmunofluorescencia y *Western Blot* (WB). Por último, se analizó la respuesta al daño del ADN (DDR) inducida por radiación (rayos-X) en células HN12 shSET y shCTRL por el ensayo clonogénico, de ciclo celular y el análisis de proteínas de la apoptosis, autofagia, ciclo celular y reparación por WB. La reducción de SET cambió la transcripción de los *loci* de miR-9 por medio de reversión parcial de la hipermetilación del *locus* miR-9-1 *in vitro* e *in vivo* y del *locus* miR-9-3 *in vitro* con impacto sobre los niveles de miR-9 y miR-9*. El perfil alélico de cinco microsatélites mostró cambios en dos marcadores, *D5S346* y *D2S123* en HN12 shSET y tumores de xenoinjertos de HN12 shSET (*in vivo*) en comparación con sus respectivos controles. Entonces, se sugiere aumento de MSI y la participación de SET en la reparación de mal apareamiento. La línea HN12 shSET condujo a la disminución de los daños en ADN y al aumento de las proteínas de reparación de DSB, MLH1, ATM, p-ATM y BRCA1, en comparación con la HN12 shCTRL. En las primeras 48 horas de la DDR inducida por rayos-X, HN12 shSET se mostró con mayor viabilidad celular (menor % en sub G0/G1), mayor parada en G2/M, mayor nivel de ATM activo, p21, LC3B-II y menor clivaje de PARP y caspasa-8 que HN12 shCTRL. Esto sugiere una mejor respuesta al daño de DSB y la activación de las vías de sobrevivencia con la reducción de SET. Sin embargo, después de 12 días de radioterapia, HN12 shSET presentó una tendencia a disminuir la sobrevivencia. Por lo tanto, nuestros resultados indican la participación de SET tanto en la regulación transcripcional de miR-9 como en las vías de reparación de mal apareamiento y DSB en CEO con implicaciones en la tumorigénesis y en la progresión de la enfermedad.

Palabras clave: 1. SET/I₂PP2A/TAF-I β . 2. Metilación de miRNA. 3. Reparación del ADN. 4. ATM. 5. DDR. 6. DSB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A cascata de sinalização de DDR e ATM.....	28
Figura 2. Indução do <i>checkpoint</i> em G1/S em resposta a DSB.....	30
Figura 3. Indução do <i>checkpoint</i> em G2/M em resposta a DSB.....	31
Figura 4. As vias intrínseca e extrínseca de sinalização apoptótica.	33
Figura 5. Via apoptótica dependente de p53 em resposta a DSB	35
Figura 6. Processamento de miRNAs.....	37
Figura 7. Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho.....	43
Figura 8. Redução da proteína SET nas linhagens HN12 e Cal27 com shRNA para SET (shSET) comparado ao controle (shCTRL).....	61
Figura 9. MSP para os alelos materno (metilado) e paterno (não metilado) do gene <i>SNRPN</i> usado como teste de eficiência da conversão por bissulfito de sódio.....	62
Figura 10. A redução da SET na linhagem HN12 diminui a hipermetilação do <i>miR-9-1</i> e <i>miR-9-3</i>	63
Figura 11. Análise de metilação do DNA nos <i>loci miR-9-1</i> e <i>miR-9-3</i> por MSP nos tumores xenoenxerto formados pelas células HN12 shCTRL e HN12 shSET em camundongos nude..	64
Figura 12. Quantificação dos níveis do miR-9 (sense) e miR-9* (anti-sense) por RT-qPCR nas células HN12shCTRL e HN12shSET (A) e nos tumores xenoenxerto de camundongos (B). 64	64
Figura 13. Análise da MSI nas linhagens HN12 e Cal27 (A) e nos tumores xenoenxerto da HN12 (B) com e sem a redução da SET.....	66
Figura 14. Análise de danos espontâneos no DNA pelo ensaio cometa nas células HN12 e Cal27 com e sem redução da SET	67
Figura 15. A redução da proteína SET promoveu aumento da proteína MLH1 no núcleo das células Cal27 e HN12.....	68
Figura 16. A redução da proteína SET permitiu o aumento de ATM no núcleo e de p-ATM (ativa) em HN12.....	69
Figura 17. A redução da proteína SET aumenta os níveis da proteína de reparo BRCA1 no núcleo das células HN12	70
Figura 18. Efeito da redução da SET na capacidade de sobrevivência e proliferação celular com e sem IR.	71
Figura 19. A redução da SET alterou o perfil do ciclo celular nas células HN12 irradiadas com doses crescentes de radiação.....	73
Figura 20. Níveis das proteínas MLH1, p21 e SET em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação.	75
Figura 21. Níveis das proteínas p-ATM, ATM e PARP em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação.	77

Figura 22. Análise das proteínas apoptóticas XIAP (inibidor de apoptose), Survivina (inibidor de apoptose), Caspase-3, Caspase-8 e PARP em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de IR.....	78
Figura 23. Análise da proteína do ciclo celular p21 em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação.	79
Figura 24. Análise das proteínas autofágicas LC3B e p62 em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação..	80
Figura 25. Análise das proteínas apoptóticas Caspase-8 e PARP em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a crescentes doses de radiação.	81
Figura 26. Esquema representativo dos efeitos da redução da SET na linhagem HN12 (CEO) <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Locus, padrão de repetições, <i>primers</i> para PCR e temperatura de anelamento dos 5 microssatélites analisados.....	47
Tabela 2. <i>Primers</i> do gene <i>SNRPN</i> utilizados no MSP para teste de eficiência de conversão do DNA por bissulfito de sódio.....	49
Tabela 3. Relação dos <i>primers</i> utilizados para análise de metilação do miR-9 por MSP.....	50
Tabela 4. Temperaturas de anelamento padronizadas e tamanho dos fragmentos amplificados para cada par de <i>primer</i> do miR-9.....	50
Tabela 5. Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados no ensaio de imunofluorescência para proteínas associadas com reparo de DNA.....	54
Tabela 6. Lista de anticorpos usados no trabalho e suas respectivas diluições.....	58
Tabela 7. Distribuição das células HN12 shCTRL e shSET submetidas a radiação nas fases G1 e S do ciclo celular.....	72

ABREVIATURAS

53BP1	Proteína ligante de p53
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATF3	Fator de ativação de transcrição 3
ATM	Ataxia-telangiectasia mutada
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BASC	Complexo de reparo do genoma associado a BRCA1
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X _L	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BER	Reparo por excisão de base
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BRCA1	Proteína de suscetibilidade ao câncer de mama 1
CDK	Quinase dependente de ciclina
CECCP	Carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço
CEO	Carcinomas espinocelulares orais
CHK1	<i>Checkpoint</i> quinase 1
CHK2	<i>Checkpoint</i> quinase 2
CpG	Dinucleotídeo Citosina – Fosfato – Guanina
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CTCF	Fluorescência celular total corrigida/ <i>corrected total cell fluorescence</i>
CXCR4	Receptor 4 da quimiocina CXC
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DDR	Resposta(s) ao(s) dano(s) de DNA/ <i>DNA damage response</i>
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Media
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Quebra(s) de fita dupla/ <i>double strand-breaks</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
EP	Eficiência de plaqueamento
EUA	Estados Unidos da América
FS	Fração celular sobrevivente
gDNA	DNA genômico
<i>High-LET</i>	Alta transferência linear de energia
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
HPV	Papilomavírus humano
HR	Recombinação homóloga
I2PP2A	Inibidor 2 da proteína fosfatase 2A/ <i>inhibitor 2 of PP2A</i>
IAP	Proteína(s) inibidora(s) da apoptose
INHAT	Inibidor de acetiltransferases
IR	Irradiação
<i>Low-LET</i>	Baixa transferência linear de energia
MDC1	Proteína mediadora do <i>checkpoint</i> em resposta ao dano de DNA 1
miRNA ou miR	microRNA
MLH1	<i>mut-L homologin 1</i>
MMR	Reparo <i>mismatch</i> / Reparo de mal-pareamento
MPT	Modificações pós-traducionais

mRNA	RNA mensageiro
MSI	Instabilidade de microssatélites
MSP	PCR específica para metilação/ <i>Methylation Specific PCR</i>
n	número amostral
NER	Reparo por excisão de nucleotídeo
NHEJ	Junção de extremidade não homóloga
NIDCR	<i>National Dental and Craniofacial Research Institute</i>
NIH	National Institutes of Health
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Iodeto de propídeo
PI3K	Fosfatidilinositol 3'-quinase
PKB ou AKT	Proteína quinase B
PP2A	Proteína fosfatase 2A
pRb	Proteína supressora tumoral de retinoblastoma
pré-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
PUMA	Modulador de apoptose pela regulação positiva de p53
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase usando a transcriptase reversa
SBF	Soro bovino fetal
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI</i>
SNRPN	Ribonucleoproteínas pequenas do núcleo associada ao polipeptídeo N –
éxon α	
SSB	Quebra(s) de fita simples/ <i>single strand-breaks</i>
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TAF-I β	Fator ativador da transcrição I β / <i>Template-activating fator Iβ</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TBS/T	Solução salina tamponada de Tris
Thr	Treonina
u.a.	unidade arbitrária
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
WB	<i>Western blotting</i>

SÍMBOLOS

%	porcentagem
cm	centímetro
g	grama
Gy	gray
kDa	quilo Daltons
kV	quiloVolt
kVp	quiloVolt pico
L	litro
mA	miliAmpere
mL	mililitro
nm	nanômetro
°C	graus Celsius
pb	pares de base
U	units
x g	aceração da gravidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro

SUMÁRIO

1	Introdução.....	20
1.1	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP)	20
1.2	Proteína SET	22
1.3	Resposta ao dano de DNA (DDR)	24
1.3.1	Reparo de Quebras de Fita Dupla (DSB) e radiação ionizante	25
1.4	Regulação do ciclo celular e dano no DNA.....	29
1.4.1	Checkpoint em G1/S.....	29
1.4.2	Checkpoint em G2/M	31
1.5	Apoptose	32
1.5.1	Apoptose e dano no DNA.....	34
1.6	Instabilidade de microssatélites e câncer	35
1.7	miR-9 e câncer	37
2	Objetivos	41
2.1	Objetivo geral	41
2.2	Objetivos específicos	41
3	Material e Métodos.....	43
3.1	Linhagens celulares.....	43
3.1.1	HN12	43
3.1.2	Cal27.....	44
3.1.3	HaCaT.....	44
3.2	Condição de cultura celular	44
3.3	Redução da proteína SET por silenciamento de RNA.....	45
3.4	Tumores xenoinxerto de células HN12 shSET e HN12 shCTRL obtidos em camundongos BALB/c nude	45
3.5	Extração de DNA genômico	46
3.6	Análise de instabilidade de microssatélites (MSI) por PCR convencional.....	47
3.7	Análise de metilação e expressão do miR-9	48
3.7.1	PCR específica para metilação (Methylation Specific PCR – MSP)	48
3.7.2	Análise de expressão do miR-9	51
3.8	Análise do dano e reparo de DNA	52
3.8.1	Ensaio Cometa.....	52
3.8.2	Imunofluorescência de proteínas de reparo: MLH1, ATM e BRCA1	53
3.9	Irradiação das células HN12 com e sem silenciamento da SET	55

3.9.1	Procedimento de irradiação das células.....	55
3.9.2	Ensaio de sobrevivência clonogênico.....	56
3.9.3	Ciclo celular.....	56
3.9.4	Extração e análise de proteínas.....	57
3.9.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 57	
3.9.6	Western blotting (WB)	58
3.10	Análise estatística	59
4	Resultados	61
4.1	Confirmação do silenciamento da proteína SET	61
4.2	Perfil de metilação do miR-9 nas linhagens de CEC oral.....	61
4.2.1	Eficiência da conversão do DNA por bissulfito de sódio.....	61
4.2.2	Perfil de metilação no miR-9.....	62
4.2.3	Expressão do miR-9	64
4.3	Análise de cinco marcadores de instabilidade de microssatélites (MSI).....	65
4.4	Análise de dano e reparo de DNA	66
4.4.1	Análise de danos no DNA	66
4.4.2	Análise de proteínas de reparo do DNA: MLH1, ATM e BRCA1	67
4.5	Resposta a irradiação (IR) por raios-X na linhagem HN12 shSET	70
4.5.1	Capacidade de Sobrevivência e Proliferação Celular.....	70
4.5.2	Análise do ciclo celular	72
4.5.3	Análise de proteínas envolvidas em reparo de DNA, ciclo celular, apoptose e autofagia após IR das células HN12 shCTRL e shSET	73
5	Discussão	83
5.1	SET regula a metilação e expressão do miR-9	83
5.2	A SET tem papel no reparo de DNA do tipo <i>mismatch</i> e de DSB	85
6	Conclusão	94
7	Referências Bibliográficas	96
8	Anexo 1	122

Introdução

1 Introdução

1.1 Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP)

Os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECCP) se referem a tumores de lábio, nariz, cavidade oral, faringe, laringe, glândulas salivares e tireóides, os quais se originam no epitélio estratificado ou escamoso (Pai e Westra, 2009). Esse tipo de câncer é a sexta neoplasia mais comum mundialmente, compreendendo 4% dos casos de câncer em homens e 2% em mulheres (Kamangar, Doros e Anderson, 2006). Os CECCP apresentam fenótipos altamente malignos, caracterizados pela invasão extensa dos tecidos circundantes (linfonodos) e metástases para órgãos distantes (Pulte e Brenner, 2010; Koontongkaew, 2013).

Cerca de 40% dos casos de CECCP são carcinomas espinocelulares orais (CEO). No Brasil foi estimado cerca de 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres para o ano de 2014 (Inca, 2014). E a última estimativa mundial para câncer de boca e lábio apontou que ocorreriam cerca de 300 mil casos novos e 145 mil óbitos, para o ano de 2012 (Inca, 2014). A taxa geral de sobrevida em 5 anos de pacientes acometidos por CEO é cerca de 50-60%, observando-se uma maior sobrevida quando o diagnóstico é precoce e não há metástase para linfonodos e órgãos distantes (<http://www.nidcr.nih.gov/datastatistics/finddatabytopic/oralcancer/oralcancer5yearsurvivalrates>; Boyle e Levin, 2008). Com base nestes dados, é evidente a necessidade de mais pesquisas para se identificar novos biomarcadores que auxiliem no diagnóstico precoce ou prognóstico.

O início e a progressão dos CEC orais é um processo que se caracteriza pela aquisição progressiva de alterações genéticas e epigenéticas. Os resultados fenotípicos dessas alterações estão descritos em diferentes níveis do desenvolvimento do câncer: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais anti-crescimento, inibição de supressores tumorais, capacidade de evadir a apoptose, aumento da angiogênese e invasão, potencial para metástase e evasão da resposta imune (Hanahan e Weinberg, 2011). As principais vias de sinalização alteradas em CECCP abrangem as proteínas ciclina D1, p53, pRb (proteína supressora tumoral de retinoblastoma), EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal), quinases AKT/PI3K (Fosfatidilinositol-3'-quinase), STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) e VEGFR (receptor do fator de crescimento endotelial vascular) (Molinolo *et al.*, 2009; Koontongkaew, 2013). A maioria das alterações epigenéticas que ocorrem durante este processo tumorigênico ainda não é conhecida (Awada e Lalami, 2005).

Os principais fatores ambientais de risco causadores do CECCP são a exposição ao tabaco, o consumo de álcool e a infecção com o papilomavírus humano (HPV), mais comumente o tipo 16 (Boyle e Levin, 2008). A infecção por HPV apresenta-se como o principal agente causador em até 70% dos cânceres de orofaringe, enquanto a exposição ao tabaco e ao álcool é responsável pela maioria dos CECCP que ocorrem na cavidade oral, laringe e hipofaringe (Pai e Westra, 2009).

O fumo é responsável por cerca de 40% dos óbitos por essa neoplasia mundialmente; já o alto grau de etilismo corresponde a, aproximadamente, 16% dos óbitos. O hábito de fumar combinado com o de beber estabelece um sinergismo e aumenta 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer. Adicionalmente, há aumento no risco de acordo com o tempo de uso de tabaco, o número de cigarros fumados por dia e com a frequência de ingestão de bebidas alcoólicas. A incidência maior de CECCP observada entre os homens é devido a sua maior exposição aos fatores de risco, o que está ligado ao fator cultural (Inca, 2011).

O tratamento do câncer da cavidade oral abrange mais comumente o procedimento cirúrgico, radioterapia ou uma combinação de ambos dependendo do local, da extensão do tumor primário e da presença de metástase para os linfonodos cervicais. A cirurgia para retirada dos tumores primários deve abranger toda a lesão tumoral e a margem do tecido não tumoral adjacente. Em lesões extensas, a radioterapia é incluída como tratamento complementar a cirurgia e devem incluir a região dos linfonodos mesmo que não acometidas pelas células tumorais. A dose para o sítio primário varia de 65 Gy a 75 Gy durante 5 a 7 semanas (Inca, 2001).

Essa abordagem tradicional que inclui a ressecção e radioterapia pós-operatória tem apresentado altas taxas de recidiva. Assim, a sensibilização quimioterápica combinada com a radioterapia é uma estratégia utilizada para reduzir a recidiva no cenário pós-operatório (Forastiere *et al.*, 2001). Um quimioterápico muito utilizado em CECCP é a cisplatina, que causa danos (ligações cruzadas nas fitas) no DNA - ácido desoxirribonucleico (Molin e Fayette, 2011).

Apesar dos avanços na combinação de quimioterapia com cirurgia e radioterapia, as taxas de sobrevivência de pacientes com recidiva são baixas (Muller *et al.*, 2008). Sendo assim, muitas estratégias de tratamento têm sido estudadas e avaliadas com o intuito de induzir a sensibilização do tumor à radioterapia e/ou desenvolver novas drogas anticâncer. Por exemplo, um estudo recente em modelos *in vivo* demonstrou que a ação da droga dasatinib (inibidor de EGFR nuclear) sensibiliza os tumores de CECCP à radioterapia por diminuir reparo de danos do DNA causados pela radiação (Stegeman *et al.*, 2013).

Com base no exposto acima, fica claro que há necessidade de pesquisas direcionadas para o melhor entendimento da sinalização molecular da tumorigênese, bem como para o estabelecimento de novos biomarcadores e alvos terapêuticos. As pesquisas básicas são essenciais para a determinação do perfil molecular dos tumores e pacientes, de forma que seja possível a medicina personalizada para tratamentos, prognósticos e acompanhamento dos pacientes com câncer.

1.2 Proteína SET

A proteína SET (I2PP2A – *inhibitor 2 of PP2A* ou TAF-I β - *template-activating factor I β*) é um potente e altamente seletivo inibidor da proteína fosfatase 2A - PP2A (Li e Damuni, 1998) e está localizada no núcleo e citoplasma (Lam, Anthony e Hordijk, 2012). Devido à variedade de substratos que a fosfatase PP2A (supressor tumoral) pode desfosforilar, um grande número de proteínas e vias de sinalização podem ser afetadas pela inibição de PP2A pela SET (tais como AKT, c-Myc, RalA) (Li e Damuni, 1998; Janssens, Goris e Van Hoof, 2005). O gene humano, *SET*, localizado no cromossomo 9, foi originalmente identificado como o produto de fusão SET-CAN produzido por uma translocação somática em leucemia mielóide aguda indiferenciada (Von Lindern *et al.*, 1992). A proteína SET tem sido encontrada em altos níveis em outras doenças, como Alzheimer (Madeira *et al.*, 2005), câncer de mama (Ten Klooster *et al.*, 2007), tumor de Wilms (Carlson *et al.*, 1998), leucemia mielóide aguda (Cristóbal *et al.*, 2012) e CECCP (Patel *et al.*, 2008; Leopoldino, Squarize, *et al.*, 2012a). Em leucemia mielóide aguda foi demonstrado que os pacientes com acumulação da proteína SET apresentam menor tempo de sobrevivência global, sugerindo que essa proteína está ligada a um pior prognóstico (Cristóbal *et al.*, 2012).

A SET foi descrita como um importante inibidor do supressor de metástase NM23-H1 (Kodera *et al.*, 1994) e como uma proteína ligante de p21 (proteína inibitória de quinase dependente de ciclina) com papel na regulação do ciclo celular (Esteve *et al.*, 2003). Além disso, a interação da SET com outras proteínas vem sendo descrita, por exemplo, Vera *et al.* (2006) observou que SET interage com hnRNPA2 durante a inibição de PP2A estimulando a proliferação celular de células tumorais. Klooster *et al.* (2007) observaram que a SET transloca-se para o citoplasma em células que expressam a proteína Rac1 estimulando a migração celular. Adicionalmente, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou que ao transfectar células HeLa com construção de SET mutante (citoplasmática), sem o sinal de localização nuclear, ocorre maior motilidade e invasão celular comparado ao controle transfectado com SET selvagem (Lam, Anthony e Hordijk, 2013).

Outra função da proteína SET é a regulação de acetilação de histonas, sendo uma subunidade do complexo inibidor de acetiltransferases - INHAT (Seo *et al.*, 2001). A SET/INHAT inibe a acetilação de histonas por se ligar e mascarar as lisinas das histonas alvos de acetiltransferases. Além de manter histonas na forma hipoacetilada, a SET/INHAT inibe a desmetilação de sítios hipermetilados do DNA (Cervoni *et al.*, 2002) e, assim, está envolvida na repressão transcricional de regiões específicas do DNA (Kim, Kim, *et al.*, 2012). A relação da SET com a regulação epigenética representa um novo mecanismo que pode explicar a hipermetilação de regiões específicas em células tumorais (Cervoni *et al.*, 2002). Além disso, a SET/INHAT está envolvida com a inibição de acetilação de proteínas não-histonas, como o p53. A SET inibe a atividade de p53 ao se ligar e impedir sua acetilação em lisinas específicas, que é uma modificação pós-traducional importante para a ação como fator de transcrição (Kim, Lee *et al.* 2012).

Segundo nossos resultados, em câncer oral há um acúmulo da proteína SET, a qual atua positivamente na manutenção da AKT fosforilada, ou seja, na sua forma ativa, promovendo aumento da sobrevivência celular e resistência à morte induzida por estresse oxidativo (Leopoldino, Squarize, *et al.*, 2012b). A AKT, também conhecida como proteína quinase B (PKB), está relacionada a diversos processos celulares, como proliferação celular, inibição da apoptose, regulação da transcrição, migração celular (Carnero, 2010). Além disso, nosso grupo de pesquisa descreveu o papel da SET como regulador da via AKT (por meio da inibição da PP2A) e de PTEN (supressor tumoral) em células HEK293T superexpressando a SET. Nesse estudo, a acumulação da SET na ausência de estresse oxidativo desencadeou sinal de sobrevivência celular, havendo um aumento dos níveis de AKT fosforilado, bem como dos níveis de PTEN fosforilado (forma inativa) (Leopoldino, Squarize, Garcia, Almeida, Pestana, Polizello, *et al.*, 2012). Cristóbal *et al.* (2012) demonstraram que há aumento da proliferação celular ligado à inibição da PP2A na linhagem celular de leucemia humana (HEL) transfectada com a SET.

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a SET pode atuar tanto como um oncogene quanto supressor de metástase em CECCP (Sobral *et al.*, 2014). Na linhagem metastática de CEO (HN12) com redução da SET e nos tumores xenoenxerto gerados em camundongos nude a partir dessa linhagem, foram observadas a diminuição de proliferação celular e a sensibilidade a morte celular pelo tratamento com cisplatina *in vivo*, o que remete ao papel da SET como oncogene. Por outro lado, a redução da SET *in vitro* e *in vivo* estimulou a transição epitélio-mesenquimal e induziu o aumento da migração, invasão e metástase, o que sugere a ação da SET como supressora tumoral em CECCP (Sobral *et al.*,

2014). Outras funções da SET foram demonstradas por nosso grupo de pesquisa e referem-se ao papel na detoxificação celular e na resposta ao dano de DNA (Almeida *et al.*, 2012). Nesse trabalho, o acúmulo da SET presente em linhagens de CEO e em HEK293T com superexpressão para SET levou a redução da eficiência da detoxificação celular e prejudicou o reparo de DNA em resposta aos tratamentos com os agentes genotóxicos, cisplatina e álcool.

Embora várias funções tenham sido atribuídas à proteína SET, existem ainda várias lacunas a serem preenchidas.

1.3 Resposta ao dano de DNA (DDR)

O dano no DNA é induzido tanto por processos endógenos da célula quanto por fatores ambientais. Os processos endógenos referem-se à geração espontânea da lesão no DNA durante o metabolismo da célula, como a oxidação de bases (por exemplo, 8-oxoG) causada pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio e os erros de pareamento durante a replicação do DNA (Lindahl e Barnes, 2000; Ciccia e Elledge, 2010). Estima-se que cada célula apresenta até 100.000 lesões espontâneas no DNA por dia (Hoeijmakers, 2009).

Os fatores ambientais que causam lesão no DNA podem ser físicos ou químicos. Os agentes genotóxicos físicos abrangem a radiação ionizante (como, raios-X, raios gama utilizados na radioterapia) e os raios ultravioletas (UV) do sol. A radiação ionizante gera quebras de fita simples (SSB – *single strand-breaks*), quebras de fita dupla (DSB - *double strand-breaks*) e modificações de bases (como oxidação, alquilação, deaminação) que podem indiretamente levar a SSB e DSB. E os raios UV levam a formação de dímeros de pirimidina. Os fatores ambientais químicos abrangem o uso de cigarro, exposição a químicos industriais e a drogas utilizadas em quimioterapia que causam uma variedade de danos e mutações no DNA. Como exemplo de agente utilizado em quimioterapia tem-se a cisplatina que induz a ligação covalente de bases do DNA intra e inter-fitas (Ciccia e Elledge, 2010; Kavanagh *et al.*, 2013).

A variedade e frequência de lesões no DNA podem levar a instabilidade genômica quando não reparadas. Os mecanismos que neutralizam as ameaças à integridade genômica são denominados respostas aos danos do DNA (DDR – *DNA damage response*). A DDR é definida de acordo com o tipo lesão presente no DNA e são divididas em: reparo de excisão de base (BER); reparo por excisão de nucleotídeo (NER); recombinação homóloga (HR); junção de extremidade não homóloga (NHEJ); reparo *mismatch* (reparo de mal-pareamento; MMR). Os diferentes mecanismos de reparo apresentam etapas similares, sendo que

primeiramente o dano é detectado, em seguida há o acúmulo de fatores de reparo do DNA no sítio do dano e por fim, o reparo físico da lesão (Lord e Ashworth, 2012).

A maquinaria de reparo do núcleo é coordenada com um conjunto de mecanismos celulares complementares, como o remodelamento da cromatina para que as proteínas de reparo tenham acesso ao DNA e a interação com a parada do ciclo celular (*checkpoint* necessário para a ocorrência da maioria das DDR). Essas interações permitem que o reparo ocorra antes da mitose da célula, garantindo que o material genético correto seja passado às células filhas. No processo de tumorigênese há um desbalanço entre danos e reparo do DNA, de forma que as células ganham alterações em genes importantes e criam uma janela para a malignização e desenvolvimento do câncer (Lord e Ashworth, 2012).

1.3.1 Reparo de Quebras de Fita Dupla (DSB) e radiação ionizante

As DSB são induzidas por agentes causadores de danos externos, como a radiação ionizante, ou por causas endógenas que ocorrem quando as forquilhas de replicação de DNA encontram lesões não reparadas, provocando estagnação, colapso e quebra na forquilha (Pfeiffer, Goedecke e Obe, 2000). Essas quebras são altamente tóxicas e podem levar a rearranjos no genoma, ineficácia da replicação do DNA nas células e consequente, morte celular ou propagação das alterações para as próximas gerações de células filhas (Shiloh e Ziv, 2013). Dessa forma, defeitos no reparo de DSB estão associados com transtornos do desenvolvimento, imunológicos e neurológicos, e representam uma das principais causas de formação do câncer (Jackson e Bartek, 2009).

A radiação ionizante pode causar DSB pela interação direta com o DNA ou de forma indireta pela geração de espécies reativas de oxigênio. Os raios-X de baixa transferência linear de energia (*low-LET*) usados na radioterapia convencional geram cerca de 70% das DSB pela via indireta. As espécies reativas são produzidas a partir da ionização de moléculas próximas ao DNA. Por outro lado, utilizando feixes de íons pesados de *high-LET* (como íons carbono usados na radioterapia para tratamento do câncer) há maior probabilidade da travessia direta de uma partícula na dupla fita de DNA (Kavanagh *et al.*, 2013).

A fase inicial de resposta ao dano de DSB induzido por radiação ionizante é caracterizada pelo recrutamento de um grupo grande e heterogêneo de proteínas, denominados “sensores” ou “mediadores”, como o complexo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) e γ H2AX, que formam complexos proteicos no sítio da lesão. Os “sensores” estimulam a amplificação do sinal de dano através da ativação de proteínas quinases “transdutoras” de

sinhal, como a ATM, ATR, DNA-PK, que fosforilam proteínas presentes no foco nuclear e proteínas efetoras *downstream* da cascata de reparo. Uma vez ativadas, as proteínas efetoras sinalizam a parada do ciclo celular e o reparo do DNA (por NHEJ ou HR) ou a morte celular por apoptose caso o reparo não seja possível (Figura 1). Esses complexos de proteínas formados no sítio do dano são denominados focos nucleares (*nuclear foci*) e podem ser visualizados em células imunomarcadas em microscópio de fluorescência. A estruturação do foco nuclear é regulada de forma precisa no espaço e tempo (Kavanagh *et al.*, 2013; Shiloh e Ziv, 2013).

A proteína ATM humana (ataxia-telangiectasia mutada) atua como a principal proteína quinase (Ser/Thr – serina/treonina) na sinalização do reparo de DSB e faz parte da família PI3K-like (Shiloh e Ziv, 2013). O gene *ATM* sofre mutação na síndrome humana ataxia-telangiectasia, a qual é marcada por defeitos no reparo de DSB e consequente, instabilidade genômica (Mckinnon, 2012). Após minutos da exposição à radiação ionizante, a ATM é recrutada ao local do dano pelo complexo MRN, que induz a autofosforilação de ATM (Ser1981), ativando-a (Figura 1; Carson *et al.*, 2003; Uziel *et al.*, 2003; You *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que a interação entre domínios específicos de ATM e NBS1 (componente do complexo MRN) é central para o recrutamento e estabilização de ATM nos sítios de DSB (Lee e Paull, 2005; Difilippantonio e Nussenzweig, 2007).

Em seguida, a histona H2AX (Ser139) é fosforilada pela ATM (ativa) na região da cromatina próxima a quebra. A H2AX fosforilada é denominada γ H2AX e sinaliza a presença do dano marcando os nucleossomos de 1 ou mais megabases do DNA ao redor da quebra (Rogakou *et al.*, 1998; Rogakou *et al.*, 1999; Lukas, Lukas e Bartek, 2011). Assim, γ H2AX apresenta papel central na estabilização e no recrutamento de proteínas de reparo ao foco do dano (Lukas, Lukas e Bartek, 2011). H2AX também pode ser fosforilada por outras quinases da família PI3K, como a ATR ativada em forquilhas de replicação estagnadas, SSB e DSB com ressecção de uma das fitas (Ward e Chen, 2001) e DNA-PK requerida para o reparo NHEJ (Park *et al.*, 2003).

A fosforilação de ATM, ATR e H2AX leva a amplificação do sinal de dano e há o recrutamento de grande número de proteínas de reparo e de reguladores do ciclo celular ao foco nuclear, que incluem o MDC1 - proteína mediadora do *checkpoint* em resposta ao dano de DNA 1 (Stewart *et al.*, 2003; Summers *et al.*, 2011), o 53BP1 – proteína ligante de p53 (Ward *et al.*, 2003), BRCA1 - proteína de suscetibilidade ao câncer de mama 1 (Cortez *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2002), CHK1 - *checkpoint* quinase 1 (Zhao e Piwnicka-Worms, 2001), CHK2 – *checkpoint* quinase 2 (Ahn *et al.*, 2000; Falck *et al.*, 2001) e p53 (Canman *et al.*, 1998).

Algumas das proteínas efetoras *downstream* de ATM realimentam a sinalização de reparo, formando um circuito fechado de realimentação que mantém a estrutura e eficácia do foco nuclear (Shiloh e Ziv, 2013).

Estudos mostram que diversas proteínas recrutadas ao sítio do dano, como p53, CHK2, MLH1 (*mut-L homologin 1*) e BRCA1 são fosforiladas e ativadas por ATM (Matsuoka, Huang e Elledge, 1998; Cortez *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2000; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2002; Romeo *et al.*, 2011). Apesar do papel clássico da MLH1 humana no reparo *mismatch*, há a participação dessa proteína na resposta a DSB causado por agentes genotóxicos (Luo, Lin e Lin, 2004; Kim, Rajasekaran e Brown, 2007) e a sua fosforilação (Ser406) é dependente de ATM/ATR em resposta ao agente genotóxico doxorubicina – intercalante de DNA (Romeo *et al.*, 2011). A proteína BRCA1 também integrante do foco nuclear atua como uma ponte entre ATM e seus alvos formando um complexo de proteínas denominado BASC (complexo de reparo do genoma associado a BRCA1) e já foi descrita sua interação com proteínas de reparo *mismatch*, como o MLH1 (Wang *et al.*, 2000; Quaresima *et al.*, 2006).

Esse processo de reconhecimento e amplificação do sinal da DSB é dependente de modificações pós-traducionais – MPT (fosforilação, ubiquitinação, acetilação, metilação, etc) das proteínas recrutadas ao foco e das histonas presentes na região da DSB, além das modificações epigenéticas na região do DNA (Figura 1; Lukas, Lukas e Bartek, 2011). As modificações epigenéticas que ocorrem nas histonas e no DNA possibilitam o remodelamento e relaxamento da cromatina que permitem o acesso ao sítio do dano. Além disso, a regulação epigenética induz a inibição transcricional na região adjacente do dano no DNA, o que previne a geração de transcritos errôneos. Estudo recente demonstrou a ocorrência da repressão transcricional dependente da ativação de ATM na região adjacente a DSB (Shanbhag *et al.*, 2010).

Após a ativação de ATM, fosforilação do H2AX e formação do complexo proteico (foco nuclear), o reparo do DNA ocorre via proteínas efetoras da maquinaria de NHEJ ou HR. A HR atua principalmente nas fases S e G2 do ciclo celular (após a replicação do DNA) e busca restaurar a sequência de DNA original para o sítio onde há o dano. Para isso, a sequência de DNA adjacente à quebra é removida (ressecação) e a sequência homóloga de DNA da cromátide irmã é usada como molde para a síntese da dupla fita. A reparação por esse processo apresenta-se livre de erros (“error-free”). As principais proteínas envolvidas nesse processo são BRCA1, BRCA2, RAD51 recombinase, entre outras (Moynahan e Jasin, 2010). Em contraposição à HR, a NHEJ ocorre durante todo o ciclo celular e não utiliza

sequência de DNA homólogo. A reparação se dá pela ligação direta das extremidades de uma DSB, sendo que pode haver deleção ou mutação na região da lesão durante o processo. As principais proteínas envolvidas nesse processo são 53BP1, heterodímero Ku70-Ku80 (Ku, liga-se as extremidades da quebra), a quinase DNA-PK, entre outras (Lieber e Wilson, 2010). Cada mecanismo de reparo de DSB requer ação sequencial e coordenada de muitas proteínas. E o balanço entre os dois tipos, HR e NHEJ, depende das proteínas recrutadas para o foco nuclear, da interação entre a maquinaria do ciclo celular e a DDR e do grau de ressecção das extremidades de DNA quebradas (competição entre proteção das extremidades das DSB em NHEJ e ressecção na HR) (Chapman, Taylor e Boulton, 2012).

Se o nível de quebras for elevado, é necessária uma resposta secundária que envolve a parada do ciclo celular (*checkpoints*) e ativação da expressão de genes específicos para que o reparo ocorra de forma eficiente. E por fim, se o reparo não for eficiente nos *checkpoints*, as células ativam vias de sinalização apoptóticas (Roos e Kaina, 2013).

Figura 1. A cascata de sinalização de DDR e ATM. A cascata é iniciada pela formação de complexos proteicos no sítio da DSB e pela ativação de proteínas quinases, como a ATM. A ATM transduz o sinal de dano no DNA a proteínas efetoras *downstream*, que podem ativar vias de sobrevivência celular (reparo e *checkpoints* do ciclo celular) ou vias de morte celular (apoptose). Nesse processo de reconhecimento do sítio do dano e transdução de sinal ocorrem MPT nas proteínas de reparo. O destino final da célula depende do balanço finamente regulado entre as vias de sobrevivência e morte celular (modificado de Shiloh e Ziv, 2013).

1.4 Regulação do ciclo celular e dano no DNA

O ciclo celular abrange uma série de eventos que levam uma célula a se replicar e dividir dando origem a duas células filha. O ciclo celular das células eucarióticas possuem dois períodos: a interfase, que inclui as fases G1, S e G2 e em seguida, a fase mitótica (M). Nos intervalos G1 (antecede S) e G2 (antecede M) da interfase ocorre o crescimento das células em tamanho e a biossíntese de proteínas e enzimas havendo o acúmulo de nutrientes e fatores necessários para a duplicação do DNA (G1) e mitose (G2). Na fase S entre G1 e G2 ocorre o processo de duplicação do DNA (replicação). E por fim, na fase M ocorre a mitose (divisão nuclear) e citocinese (divisão citoplasmática), o que resulta na divisão em duas células filhas idênticas. A progressão entre as fases do ciclo celular é regulada pelas ciclinas e quinases dependente de ciclina (CDKs). As Ciclinas são pequenas proteínas que mantêm um ciclo de expressão e degradação ao longo das fases do ciclo celular e quando expressas ativam as CDKs, formando os complexos Ciclina/CDKs. Esses complexos fosforilam proteínas *downstream* reguladoras da progressão do ciclo celular (Alberts, Bray e Lewis, 2010).

Após a indução do dano no DNA (formação de DSB, por exemplo), a progressão do ciclo celular pode ser interrompida (*checkpoints*) ocorrendo o reparo de DNA ou apoptose, dependendo do nível de danos e da eficiência do reparo. A parada do ciclo celular ocorre pela ativação dos *checkpoints* em G1/S, S e G2/M através da inibição dos complexos Ciclina/CDKs que promovem a progressão do ciclo. Os *checkpoints* do ciclo celular previnem a replicação (parada em G1) ou mitose (parada em G2) das células que apresentam danos no DNA (Alberts, Bray e Lewis, 2010). Em células de câncer, há a desregulação do ciclo celular (aumento de CDKs e ausência dos *checkpoints*), o que resulta na proliferação descontrolada e divisões aberrantes (Lapenna e Giordano, 2009).

1.4.1 Checkpoint em G1/S

A transição de G1 para a fase S é iniciada pelo aumento da atividade das proteínas ciclinaD/CDK4/CDK6, o que leva a fosforilação de pRb (no estado hipofosforilado se liga a E2F, inibindo-o) resultando na liberação inicial do fator de transcrição E2F. Essa liberação inicial de E2F ativa uma alça de retroalimentação positiva que envolve o aumento da formação do complexo ciclinaE/CDK2, que também estimula a fosforilação de pRb e a maior liberação de E2F. E2F atua na transcrição dos genes necessários para a replicação e induz a progressão do ciclo para a fase S. Em paralelo a fosforilação do pRb, há a formação do

complexo pre-replicacional (pre-RC) que é requerido para o recrutamento da polimerase na replicação (Deckbar, Jeggo e Löbrich, 2011).

Após a indução de DSB pela radiação ionizante, duas vias paralelas dependentes da ativação de ATM estabelecem o *checkpoint* em G1 inibindo a atividade dos complexos Ciclina/CDKs e a progressão para a fase S (Iliakis *et al.*, 2003; Lukas, Lukas e Bartek, 2004; Bartek e Lukas, 2007). A via dependente de p53 envolve a estabilização do p53 e o aumento da transcrição de p21, inibidor de CDK (Figura 2). Como essa via envolve a ativação transcricional e modificações pós-traducionais, sua completa ativação ocorre horas (4-6 h) após a indução e reconhecimento do dano no DNA. A segunda via de *checkpoint* em G1, ativada mais rapidamente, é independente de p53 e requer a fosforilação (ativação) da CHK2 pela ATM (Figura 2). Assim, durante as primeiras horas após a IR, a parada do ciclo celular em G1 é incompleta e apenas ocorre a diminuição da entrada das células para a fase S e assim, muitas células transitam para a fase S com altos níveis de DSB (Deckbar, Jeggo e Löbrich, 2011). O reparo no *checkpoint* em G1 ocorre somente via NHEJ (Chapman, Taylor e Boulton, 2012).

Figura 2. Indução do *checkpoint* em G1/S em resposta a DSB. Na via de *checkpoint* em G1 dependente de p53, a ATM ativa presente no foco nuclear atua na fosforilação (ativação) de proteínas efetoras, como CHK2 e p53. A CHK2 fosforila e estabiliza p53, prevenindo a sua degradação por proteassoma. Além disso, ATM pode fosforilar p53 diretamente levando ao aumento de p53 nuclear e da atividade transcricional sobre seus genes-alvo. Assim, a p53 induz a parada do ciclo celular através do aumento da expressão de p21 (inibidor de CDK). Em G1, o p21 se liga e inibe os complexos CiclinaE/CDK2 e ciclinaD/CDK4/CDK6, impedindo a fosforilação de pRB. A segunda via de *checkpoint* em G1 é independente de p53. Nela o complexo ATM-CHK2 estimula a destruição da fosfatase Cdc25, o que por sua vez previne a remoção de grupos fosfatos inibitórios da CDK2 (modificado de Lapenna e Giordano, 2009).

1.4.2 Checkpoint em G2/M

A progressão da fase G2 para M depende da ativação do complexo CiclinaB1/CDK1. A atividade da CiclinaB1/CDK1 é regulada finamente por alças de retroalimentação opostas, envolvendo as quinases Myt1 e Wee1 que fosforilam e inibem o complexo e as fosfatases Cdc25 que ativam a CiclinaB1/CDK1 pela remoção das fosforilações inibitórias. Uma vez ativada pela ação de Cdc25, o complexo CiclinaB1/CDK1 fosforila Wee1 e Cdc25, levando a inativação do primeiro e ativação do segundo e consequentemente maior ativação de CiclinaB1/CDK1 (Lindqvist *et al.*, 2009).

Após DSB induzida por radiação, duas vias de *checkpoint* em G2 dependentes das quinases ATM e ATR podem ser ativadas. Essas vias inibem a atividade do complexo CiclinaB1/CDK1 e são bastante similares as que ocorrem no *checkpoint* em G1/S (Figura 3; Taylor e Stark, 2001; Warmerdam e Kanaar, 2010; Deckbar, Jeggo e Löbrich, 2011). Nesse *checkpoint*, o reparo pode ocorrer tanto via NHEJ quanto via HR. O *checkpoint* em G2/M é um processo transiente e não é mantido até o completo reparo das DSB e, dessa maneira, muitas células podem entrar em mitose com DSB não reparadas (Deckbar, Jeggo e Löbrich, 2011).

Figura 3. Indução do *checkpoint* em G2/M em resposta a DSB. As *checkpoint* quinases CHK2 e CHK1 são fosforiladas (ativadas) pelas quinases ATM e ATR (ativada quando há ressecção na fita simples da DSB), respectivamente. As CHKs 1 e 2 fosforilam a Cdc25 levando a sua translocação do núcleo para o citoplasma e assim, ocorre a manutenção da inibição do complexo CiclinaB1/CDK1 no núcleo (presença de fosfatos inibitórios). Adicionalmente, a inativação de CiclinaB1/CDK1 ocorre pela ativação da via dependente de p53. A ativação e estabilização de p53 leva a ativação transcricional de proteínas inibidoras de CDK1 e ciclina/CDK, como o p21 (modificado de Lapenna e Giordano, 2009).

1.5 Apoptose

A apoptose é um tipo de morte celular programada e ocorre em diversos processos, inclusive na DDR induzida por agentes genotóxicos (como, radiação ionizante e cisplatina). Durante o processo apoptótico ocorrem alterações morfológicas coordenadas nas células. Primeiramente, há uma retração da célula e a perda da aderência com a matriz extracelular e células adjacentes. A cromatina sofre condensação e em seguida, a membrana da célula forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos. O número e tamanho dos prolongamentos da membrana aumentam e ocorre a ruptura da membrana celular, originando estruturas contendo o conteúdo celular denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (Alberts, Bray e Lewis, 2010; Giansanti, Torriglia e Scovassi, 2011).

Diversas proteínas atuam na regulação e sinalização apoptótica, dentre elas estão: as caspases, proteínas da família Bcl-2 e as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs). As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem a família das cisteínas proteases e são reguladoras centrais da apoptose, atuando no reconhecimento e clivagem de substratos contendo resíduos de aspartato. Após um sinal de morte celular, as caspases são ativadas por clivagem proteolítica, sendo que as caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9, -10, -11 e -12) ativas clivam e ativam as caspases executoras (caspase-3, -6 e -7), que por sua vez clivam substratos proteicos levando a sinalização apoptótica. A ativação das caspases efetoras desencadeiam a clivagem da lâmina nuclear, degradação da cromatina e de proteína citosólica, etc. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (*death domain*) (Denault e Salvesen, 2002; Boatright *et al.*, 2003).

A família Bcl-2 apresenta tanto proteínas indutoras quanto proteínas repressoras da apoptose. Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) e Bcl-X_L (*B-cell lymphoma-extra large*) são reguladores anti-apoptóticos, enquanto BAX (*Bcl-2-associated X protein*), BID (*BH3-interacting domain death agonist*) e BAK (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) são proteínas pró-apoptóticas. As proteínas dessa família regulam a via apoptótica mitocondrial (intrínseca) e o balanço entre quantidade de proteínas anti- e pró-apoptóticas determina o destino da célula (Petros, Olejniczak e Fesik, 2004).

As IAPs, como a XIAP e survivina, estão localizadas no citosol e exercem seu papel antiapoptótico ao se ligar e inibir a atividade das caspases-3 e -7 (efetoras) e da caspase-9 (iniciadora) (Shi, 2002). Durante a apoptose, as IAPs são removidas por uma proteína liberada

da mitocôndria denominada Smac/DIABLO (*second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*) (Chai *et al.*, 2000).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas formas: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Figura 4; Roos e Kaina, 2013).

Figura 4. As vias intrínseca e extrínseca de sinalização apoptótica. A via extrínseca depende da sinalização e ativação de receptores de morte na superfície celular por ligantes específicos. Os receptores de morte pertencem a superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (rTNF) e entre eles estão o rTNFR-1, Fas/CD95 e TRAIL. Por exemplo, a ativação do receptor Fas-ligante leva a formação do complexo DISC que inclui a FADD (proteína associada à Fas com domínio de morte) e as pró-caspases-8 e -10 (iniciadoras). Esse complexo leva a ativação da cascata de clivagem de caspases executoras (caspase-3 e -7) que culminam na digestão do DNA e degradação de proteínas (Roos e Kaina, 2013). A via apoptótica mitocondrial depende da regulação da liberação de citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. A liberação de citocromo c depende da ação de proteínas pró-apoptóticas, como BAX e BAK e proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-X_L. Após a liberação do citocromo c, há a formação do complexo apoptossomo contendo pró-caspase iniciadora-9, Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) juntamente com o citocromo c. O apoptossomo inicia uma cascata de clivagem de caspases executoras (caspase-3 e -7) que levam a fragmentação do DNA e degradação de proteínas. Há interação entre as duas vias, por exemplo, a clivagem de BID pela caspase-8 ativa a via mitocondrial, amplificando o sinal apoptótico (modificado de Igney e Krammer, 2002).

1.5.1 Apoptose e dano no DNA

Se a cascata de sinalização de reparo e de regulação do ciclo celular falhar após lesões graves do DNA, as células são direcionadas a morte celular por apoptose pela via intrínseca e/ou extrínseca. Ou seja, as células que contêm danos no DNA suficientes para sobrecarregar sua capacidade de reparo serão eliminadas da população de um determinado tecido. Diversos estudos demonstraram que defeitos na sinalização apoptótica aumentam a incidência de câncer e assim, a ocorrência de apoptose após o dano de DNA é um mecanismo protetor que previne a carcinogênese (Wirtz *et al.*, 2010). Nesse sentido, os agentes quimioterápicos genotóxicos (ex: cisplatina) e a radioterapia (uso de radiação ionizante) no tratamento de câncer tem como princípio induzir elevado dano de DNA e, por consequência, levar a sinalização apoptótica no tecido tumoral (Roos e Kaina, 2013).

Foi descrito que as linhagens com defeitos no sistema de reparo são hipersensíveis a morte celular por agentes químicos genotóxicos e radiação ionizante, com exceção das linhagens com mutação para proteínas do reparo *mismatch* (Christmann *et al.*, 2003). Além disso, quando DSB são induzidas no DNA pelo método de eletroporação de enzimas de restrição (como a Pvu II) para dentro das células, ocorre o aumento dose-dependente das quebras e uma forte sinalização para apoptose e não necrose (Lips e Kaina, 2001).

Uma das principais vias apoptóticas na DDR é dependente de p53 e ATM (Figura 5; Shiloh e Ziv, 2013). O p53 tem papel duplo na DDR e atua tanto na regulação dos *checkpoints* associado ao reparo do DNA (papel protetivo) quanto na sinalização da apoptose durante o *checkpoint* caso o reparo não ocorra (papel na sensibilização). A decisão entre reparo ou apoptose é dependente do nível da dose do agente genotóxico e, consequentemente, do nível de danos causados e da eficácia do reparo do DNA (Roos e Kaina, 2013). Com elevados níveis de DSB e a ineficácia da reparação, há grande acúmulo de p53 fosforilado pela ATM-CHK2 e assim, inicia-se a ativação de genes pró-apoptóticos, como *BAX*, *PUMA* (modulador de apoptose pela regulação positiva de p53), gene do receptor Fas, *NOXA* (Roos e Kaina, 2006; 2013). Em resposta à radiação ionizante, p53 pode estimular apoptose pelo aumento da expressão de *NOXA* (Oda *et al.*, 2000) e em resposta à cisplatina, em células com defeito no reparo, p53 desencadeia a apoptose pela indução de *NOXA* e *PUMA* (Gutekunst *et al.*, 2011).

Figura 5. Via apoptótica dependente de p53 em resposta a DSB. A DSB induzida por radiação ionizante (IR) leva a ativação da quinase ATM, que por sua vez fosforila proteínas efetoras, como p53 e CHK2. A ATM juntamente com a CHK2 estabiliza p53, desencadeia o seu acúmulo no núcleo e estimula sua atividade transcricional sobre genes-alvo. Assim, o p53 pode atuar como fator de transcrição de genes anti-apoptóticos, como o p21 (relacionados aos *checkpoints* em G1 e G2 e ao reparo de DNA) ou pró-apoptóticos, como PUMA e BAX (modificado de Mandal, Blanpain e Rossi, 2011).

Apesar do papel central de p53 na indução da apoptose na DDR, há mecanismos apoptóticos independentes de p53 que ocorrem, por exemplo, em células tumorais com mutação do p53. Em um exemplo desses mecanismos, CHK1 e CHK2 (fosforiladas e ativadas por ATR/ATM) ativam o fator de transcrição E2F1. O E2F1 atua na transcrição da proteína p73 (homóloga do p53), que por sua vez induz a apoptose via transcrição de genes pró-apoptóticos ou via localização mitocondrial dessas proteínas (Roos e Kaina, 2006). Adicionalmente, estudos demonstraram que a regulação da quinase AKT (Ser/Thr) pela proteína fosfatase PTEN desencadeia a apoptose em resposta a agentes químicos genotóxicos e radiação ionizante. PTEN atua evitando a fosforilação de AKT, que uma vez inativa perde sua ação como supressora de apoptose (Kim *et al.*, 2011).

Dessa forma, vimos que os mecanismos que levam a apoptose em resposta a danos de DNA são complexos e têm papel importante nas terapias anticâncer que utilizam agentes químicos genotóxicos e radiação ionizante.

1.6 Instabilidade de microssatélites e câncer

O reparo *mismatch* (MMR) atua em erros de pareamento de base e pequenas inserções/deleções gerados durante a replicação do DNA (Kolodner, 1996). Essas alterações causam o mal-pareamento da sequência e consequente distorção da estrutura de dupla hélice

do DNA. O reconhecimento do dano desencadeia a excisão da fita de DNA recém-sintetizada que engloba o local de incompatibilidade e a sua re-síntese (Jiricny, 2006). A instabilidade de microssatélites (MSI) é uma forma de mensurar danos genômicos ligado ao sistema de reparo MMR. O microssatélite consiste de unidades de cerca de um a cinco nucleotídeos repetidos em *tandem* de 5 a 100 vezes dentro do genoma humano. O deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA é tida como a principal causa da variação no número de repetições nesses locos. Em células normais, os erros (incorporação incorreta de nucleotídeos) ocorridos durante a replicação são reparados pelo sistema de reparo MMR, que envolve proteínas como MLH1 e MSH2 (De Schutter *et al.*, 2007). Nas células neoplásicas podem ocorrer defeitos no sistema de reparo pós-replicacional do DNA como mutações ou hipermetilação dos genes do MMR. Esses defeitos levam a mudanças somáticas resultantes do ganho ou perda de unidades repetitivas dos microssatélites e a formação de novos alelos, denominadas MSI (De Schutter *et al.*, 2007).

A MSI é descrita como um marcador carcinogênico em câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), sendo associada à inativação genética ou epigenética direta dos genes do MMR (MLH1, MSH2, PMS1 e PMS2) nesse tipo de câncer (Popat, Hubner e Houlston, 2005). A presença de mutações de éxon e/ou hipermetilação de promotores de genes do MMR também foram relacionadas aos tumores MSI positivos em outros carcinomas, como câncer de ovário (Carlson *et al.*, 1998) e estômago (Leung *et al.*, 1999). Entretanto, em CECCP a inativação direta dos genes da via MMR é controversa, sendo que há estudos recentes que mostram a inativação de genes da MMR em CECCP MSI positivos (Nunn *et al.*, 2003; Zuo *et al.*, 2009b; Tawfik *et al.*, 2011), enquanto outros demonstram a permanência de genes da MMR normalmente ativos em tumores MSI positivos (Piccinin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Koy *et al.*, 2008).

Em CECCP, a incidência de alto nível de MSI (MSI-H – instabilidade em mais de 30% dos microssatélites analisados) varia de 3 a 88% nos diversos estudos. Essa grande variação está relacionada ao número de pacientes estudados, ao locus e marcadores usados e aos diferentes métodos de detecção de MSI (De Schutter *et al.*, 2007). Estudos têm sugerido a acumulação de MSI com a progressão tumoral em CECCP, evoluindo de 14% de MSI em lesões displásicas iniciais para 55% de MSI em lesões malignas (El-Naggar *et al.*, 1996; Ha *et al.*, 2002). Em CECCP, a alteração do reparo *mismatch* e a MSI estão relacionadas predominantemente com a hipermetilação e diminuição de expressão de genes do MMR, como o MLH1, do que com a mutação direta dos mesmos (Zuo *et al.*, 2009a).

1.7 miR-9 e câncer

Os microRNAs (miRNA ou miR) são uma classe de pequenos RNAs (ácido ribonucleico) não codificantes que regulam negativamente a expressão gênica por meio da repressão da tradução ou da clivagem direta de mRNAs (RNAs mensageiros) (Iorio e Croce, 2009). O processamento de miRNA inicia-se no núcleo e termina no citoplasma, dando origem ao miRNA maduro funcional (Figura 6; Winter *et al.*, 2009).

Figura 6. Processamento de miRNAs. No núcleo, o miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito a partir do DNA pela enzima RNA polimerase II (Pol II) ou Pol III. O longo transcrito do pri-miRNA (0,5-7 kb) dobra-se em estrutura única ou conjunto de múltiplos grampos (“hairpins”). O pri-miRNA é clivado pelo complexo formado pela enzima Drosha e proteína Pasha (cofator de ligação a RNA), resultando em uma estrutura de “hairpin” mais curta com cerca de 60-70 nucleotídeos denominada miRNA precursor (pré-miRNA). O pré-miRNA é transportado através da membrana nuclear e no citoplasma é processado pela enzima Dicer (RNase). A alça do “hairpin” é cortada e resulta em uma sequência curta de miRNA dupla fita que é desenrolada por uma helicase e por fim, clivada em um miRNA maduro (com 18-25 nucleotídeos). O miRNA maduro pode ser derivado da fita sense e/ou antisense do miRNA dupla fita. O miRNA maduro é incorporado a um complexo de silenciamento induzido por RNA denominado RISC. O complexo miRNA-RISC regula negativamente a expressão gênica pós-transcricional através da hibridação do miRNA com sequências complementares na região 3' UTR (não traduzida) de um mRNA alvo e assim, pode levar a degradação e/ou inibição da tradução do mRNA (modificado de Winter *et al.*, 2009)

Estudos têm demonstrado o papel dos miRNAs no desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer, inclusive no CECCP, funcionando como supressores tumorais ou oncogenes (Calin e Croce, 2006; Esquela-Kerscher e Slack, 2006). Nesse sentido, Lujambio *et al.* (2008) demonstraram a presença de hipermetilação e silenciamento de miRNAs, como o miR-34b/c, miR-148 e miR-9, em linhagens celulares de cânceres humanos e em múltiplos tumores humanos, como em câncer de cólon, pulmão, mama, melanoma e CECCP. A presença de hipermetilação das ilhas CpG desses miRNA está significativamente associada a tumores que apresentam células metastáticas nos respectivos linfonodos.

O papel do miR-9 nos diferentes tipos de câncer é controverso, podendo atuar como promotor ou supressor tumoral dependendo do contexto tumoral específico. No câncer de mama metastático, o miR-9 apresenta-se superexpresso pela ativação de proteínas da família MYC e atua na promoção de metástase e transição epitélio-mesenquimal (EMT) através da ligação no mRNA-alvo da E-caderina – *CDH1* (Ma *et al.*, 2010). Por outro lado, o silenciamento do miR-9 pela hipermetilação das ilhas CpG nas regiões promotoras é encontrada em diversos cânceres, incluindo melanoma (Liu *et al.*, 2012), câncer cervical (Hu *et al.*, 2010), leucemia linfoblástica aguda (Rodriguez-Otero *et al.*, 2011), câncer de pulmão (Heller *et al.*, 2012), CECCP - carcinoma oral, orofaríngeal e de nasofaringe (Minor *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2014), etc. Nesses tipos de câncer a hipermetilação do miR-9 está relacionada a progressão tumoral e ao desenvolvimento de metástase, indicando a atuação desse miR como supressor tumoral quando normalmente expresso.

O miR-9 possui três *loci* independentes no DNA, o *miR-9-1* (cromossomo 1q22), *miR-9-2* (5q14.3) e *miR-9-3* (15q26) e a hipermetilação ocorre nos promotores dessas regiões impedindo a transcrição dos pri-miRNAs que dão origem ao miR-9 maduro (Lu *et al.*, 2014). Tanto as sequências sense (miR-9) quanto antisense (miR-9*) foram descritas como funcionais. O miR-9* foi identificado como miRNA específico de células-tronco tumorais presentes nas linhagens de carcinoma hepatocelular (Xu *et al.*, 2013). E o miR-9/9* é abundante também em células-tronco tumorais (CD133+) de linhagens de glioblastoma e tem como alvo o fator de transcrição supressor tumoral CAMTA1 (*calmodulin-binding transcription activator 1*), que regula a expressão de peptídios hormonais com função anti-proliferativa (Schraivogel *et al.*, 2011). Além disso, o miR-9 tem como alvo direto REST e o miR-9* age diretamente em co-REST (corepressor de REST) e essa regulação promove a diferenciação neural (Packer *et al.*, 2008).

Em CECCP, Minor *et al.* (2012) mostraram a hipermetilação e consequente expressão reduzida do miR-9 em carcinomas oral e orofaríngeal em comparação ao carcinoma de

laringe. De acordo com esse estudo, o miR-9 tem papel de supressor de tumor, pois a transfecção desse miR em linhagem de CECCP reduziu a proliferação celular e aumentou o supressor tumoral PTEN. Portanto, o perfil de metilação do miR-9 é descrito como um importante biomarcador para CECCP (Minor *et al.*, 2012). Adicionalmente, recente estudo demonstrou o silenciamento do miR-9 (hipermetilação) em pacientes e diversas linhagens celulares de CEO. A superexpressão desse miR em CEO *in vitro* e *in vivo* levaram a inibição de proliferação e silenciamento do oncogene alvo CXCR4 (receptor 4 da quimiocina CXC), que atua na regulação da via Wnt/B-catenina (Yu *et al.*, 2013). Estes estudos fornecem novas evidências do miR-9 como um candidato promissor a alvo terapêutico em CECCP.

Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

- ✓ Analisar o efeito da redução da proteína SET no perfil de metilação do miR-9 e no reparo de DNA (reparo *mismatch* e de DSB) em CEO *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o impacto da redução da proteína SET:

- ✓ no controle epigenético de expressão do miR-9 por meio da determinação do perfil de metilação das regiões promotoras do miR-9 e do seu nível nas linhagens de CEC oral, Cal27 e HN12 (ambas com e sem silenciamento para SET), e nos tumores xenoenxerto obtidos com as células HN12 com e sem silenciamento para SET (HN12 shSET e HN12 shCTRL, respectivamente);
- ✓ na instabilidade de microssatélites (reparo *mismatch*) por meio da determinação do perfil alélico de cinco microssatélites (*BAT25*, *BAT26*, *D5S346*, *D2S123* e *D17S250*) nas linhagens HN12 e Cal27 (ambas com e sem silenciamento da SET) e nos tumores xenoenxerto obtidos com as células HN12 shCTRL e HN12 shSET;
- ✓ em danos do DNA e no *status* (redução ou aumento e fosforilação) de proteínas envolvidas em reparo de DNA, do tipo *mismatch* (MLH1) e de DSB (ATM, BRCA1 e MLH1) nas linhagens HN12 e Cal27 (ambas com e sem silenciamento da SET);
- ✓ na resposta aos danos do DNA (DDR) induzidos por radioterapia (raios-X) nas células HN12 shCTRL e HN12 shSET *in vitro*.

Material e Métodos

3 Material e Métodos

Figura 7. Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho.

3.1 Linhagens celulares

No trabalho foram utilizadas as linhagens celulares: de CEO humana (HN12 e Cal27) e de queratinócito humano imortalizado (HaCaT).

3.1.1 HN12

A linhagem tumorigênica e metastática HN12 foi doada pelo Dr. Silvio Gutkind, *National Dental and Craniofacial Research Institute (NIDCR)*, *National Institutes of Health (NIH)*, Bethesda, MD, Estados Unidos da América (EUA) e é derivada de células metastáticas

linfonodais de um paciente com CEO primário presente na região da base da língua (Cardinali *et al.*, 1995). Com relação ao estadiamento do tumor, a HN12 foi derivada de tumor no estágio T4N1M0 (T: característica do tumor primário; N: linfonodos regionais; M: metástase à distância), ou seja, apresenta grau 4 de tumor primário (tumor que invade estruturas adjacentes: a cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua), metástase linfonodal inicial (em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão) e ausência de metástase a distância (Sobin e Wittekind., 2002).

3.1.2 Cal27

A linhagem Cal27 (ATCC® CRL-2095™) foi doada pelo Dr. Silvio Gutkind, NIH, NIDCR, USA. Essa linhagem foi estabelecida *in vitro* em 1982 por Gioanni *et al.* (1988) a partir de CEO primário presente na região mediana da língua de um paciente do sexo masculino com 56 anos. Recentemente, foram atribuídas características de adenocarcinoma a essa linhagem, sendo que os tumores provenientes do xenoenxerto da Cal27 crescem lentamente com a formação de vesículas na superfície e interior dos mesmos (Jiang *et al.*, 2009). A linhagem Cal27 é tumorigênica, porém não metastática.

3.1.3 HaCaT

A linhagem de queratinócito espontaneamente imortalizada HaCaT, foi também doada pelo Dr. Silvio Gutkind, NIH, NIDCR, USA. Esta linhagem foi estabelecida *in vitro* por Boukamp *et al.* (1988) a partir de queratinócitos de pele humana histologicamente normal, mantendo sua capacidade de diferenciação epidermal e sua característica não tumorigênica.

3.2 Condição de cultura celular

As células HN12 e Cal27 (com e sem silenciamento da SET) e HaCaT foram descongeladas e mantidas em meio de cultura *Dubelcco's Modified Eagle Media* (DMEM, D5648; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal - SBF (12657-029; Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e agentes antibacteriano e antimicótico (penicilina 100 µg/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 250 µg/mL, A5955; Sigma Aldrich). As linhagens foram mantidas a 37°C em incubadora contendo 5% de CO₂.

A tripsinização das células para um novo plaqueamento consistiu em primeiro lavar as células com PBS 1x (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 9,1mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4; Sigma Aldrich) e posteriormente, incubar em estufa úmida com solução Tripsina-EDTA (Tripsina/ácido etilenodiamino tetra-acético) 1x (0,25% tripsina, 0,02% EDTA; T4174, Sigma Aldrich). Após alguns minutos, a tripsina foi inativada pela adição de meio DMEM com 10% de SBF, as células foram separadas ou recuperadas por centrifugação e meio de cultura fresco foi adicionado. Após contagem em câmara de Neubauer, a quantidade de células necessárias foram distribuídas em novas placas de cultura (de 100 mm de diâmetro e/ou 6, 12 e 24 poços) e mantidas na incubadora para a realização dos experimentos.

3.3 Redução da proteína SET por silenciamento de RNA

A estratégia de silenciamento estável da SET por *short hairpin RNA* (shRNA) clonado em plasmídeo foi utilizada no presente trabalho para estudar como a proteína SET, aumentada em CEC oral (Leopoldino, Squarize, *et al.*, 2012a), atua no reparo de DNA e na regulação transcricional de miRNA, que são importantes para a tumorigênese e a progressão da doença. A redução nos níveis da proteína se dá pela interação do *small interfering RNA* maduro (resultante da transcrição do shRNA) com o mRNA codificante para a proteína-alvo, levando à não-tradução ou degradação do mesmo (Moore *et al.*, 2010).

As células HN12 e Cal27 com *short hairpin* para SET (shSET; com silenciamento estável do mRNA para proteína SET) e shRNA controle (shCTRL) foram obtidas em trabalho anterior do nosso grupo (Sobral *et al.*, 2014) e armazenadas em nitrogênio líquido. O nível de redução da proteína SET foi confirmado pelo método de *Western blotting* (WB), utilizando anticorpo primário anti-SET (E-15; #sc5655; Santa Cruz Biotechnology).

3.4 Tumores xenoenxerto de células HN12 shSET e HN12 shCTRL obtidos em camundongos BALB/c nude

As amostras de tumores xenoenxertos de células HN12 shSET e HN12 shCTRL foram obtidas em trabalho prévio do grupo (Sobral *et al.*, 2014) e armazenadas em nitrogênio líquido. No presente trabalho, foram utilizadas 3 amostras de tumores xenoenxerto HN12 shSET e shCTRL obtidas de 3 animais (n=3) para as análises do perfil de metilação do miR-9 e do padrão alélico de cinco microssatélites. E também 4 amostras (n=4) de tumores xenoenxerto da HN12 para a avaliação da expressão do miR-9.

Resumidamente, as células HN12 shSET e HN12 shCTRL (2×10^6 células) foram injetadas no dorso de camundongos BALB/c nude. Cerca de quatro semanas após a injeção, os animais foram submetidos à eutanásia, os tumores xenoenxerto e outros tecidos (incluindo fragmento da cauda) foram coletados e conservados em nitrogênio líquido. Os animais foram mantidos no biotério convencional da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP) em mini-isoladores em estante ventilada (ALESCO). O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de ética de uso de animais em Pesquisa do Campus da USP em Ribeirão Preto (protocolo número: 11.1.168.53.2; anexo 1).

3.5 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico (gDNA) dos tumores xenoenxerto de células HN12 e das linhagens celulares (Cal27, HN12 e HaCat) foi feita usando o kit comercial *Purelink Genomic DNA* (K1820-01, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante para extração de DNA de células e tecidos de mamíferos e de cauda de camundongo.

Os tumores xenoenxerto da HN12 (shCTRL e shSET) e os fragmentos de cauda de camundongo estocados em nitrogênio líquido foram descongelados e fragmentados mecanicamente com auxílio de bisturi para melhor eficiência e ação do tampão de digestão do kit *Purelink Genomic DNA* (K1820-01, Invitrogen). O DNA extraído do fragmento da cauda do camundongo BALB/c nude foi utilizado nos experimentos como controle de gDNA de camundongo. Para a extração de DNA das linhagens HaCaT, HN12 e Cal27 (ambas shCTRL e shSET), as células (até 5×10^6 células) foram tripsinizadas submetidas à centrifugação ($250 \times g$ por 5 minutos) para separação e uso na extração de DNA.

As etapas de extração do gDNA pelo kit foram: 1) a digestão e lise das amostras a 55°C utilizando tampão de digestão (somente para extração dos tumores xenoenxertos e fragmento da cauda), proteinase K (digestão das proteínas), RNase A (digestão dos RNAs pra minimizar a contaminação do DNA) adicionados ao tampão de lise; 2) adição do etanol 96-100% para precipitação do DNA; 3) ligação do DNA na coluna (*PureLink™ Spin Column*, Invitrogen); 4) lavagens do DNA na coluna e sua eluição com tampão *PureLink® Genomic Elution* (Invitrogen). O gDNA recém extraído foi armazenado a -20°C .

A estimativa da quantidade de DNA em solução foi realizada por espectrofotometria a 260 nm (*Nanodrop-Spectrophotometer* ND-1000, Thermo Scientific). A razão entre as leituras 260 e 280 nm (E260/E280) foi usada para avaliar a pureza do DNA (Sambrook e Russel, 2001).

3.6 Análise de instabilidade de microsatélites (MSI) por PCR convencional

Para a análise de MSI nas linhagens e tumores xenoinxerto, foi utilizado o painel de cinco marcadores de microsatélites recomendado pelo Consenso de Bethesda (Umar *et al.*, 2004) e pelo Instituto Nacional do Câncer-EUA (Boland *et al.*, 1998). Esse painel abrange os microsatélites *BAT25* e *BAT26*, que apresentam repetições de mononucleotídeos e *D5S346*, *D2S123* e *D17S250* com repetições de dinucleotídeos (Tabela 1).

Foram usados os *primers* e protocolos descritos por Dietmaier *et al.* (1997) e Demokan *et al.* (2006) (Tabela 1). As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas no volume de 12,5 µL contendo o gDNA, 200 µM de dNTPs (Fermentas), tampão de PCR 1x (Promega), 2,5 mM de MgCl₂ (Promega) para *BAT25* e *BAT26* e 1,5 mM para os demais marcadores, e 1 U de GoTaq Hot Start Polymerase (5U/µL; Promega). Os *primers* (tabela 1), sintetizados pela empresa Sigma Aldrich, foram adicionados para uma concentração final de 0,3 µM. A amplificação por PCR foi realizada com 100 ng de gDNA para o marcador *D5S346* e 10 ng para os demais marcadores. Para a reação de PCR utilizou-se o termociclador Eppendorf MasterCycler® com as seguintes etapas do programa: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento com as temperaturas para cada primer (Tabela 1) por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

O produto da reação de amplificação por PCR (4 µL) foi analisado por eletroforese (100 V por 2,5 horas) em gel de poliacrilamida desnaturante 8% contendo 7 M uréia (U5378, Sigma Aldrich) e visualizados pela marcação com *SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain* (Invitrogen). O tampão de corrida utilizado na eletroforese foi o tampão Tris-Borato-EDTA (TBE 1x: Tris-base 8,9 mM, ácido bórico 8,9 mM, EDTA 0,2 mM pH 8.0, Sigma Aldrich).

Tabela 1. Locus, padrão de repetições, *primers* para PCR e temperatura de anelamento dos 5 microsatélites analisados.

MS	Repetições	Forward primer (5' -> 3')	Reverse primer (5' -> 3')	Ta °C
BAT-25 (4q12)	TTTT.T.TTTT.(T) ₇ .A(T) ₂₅	TCGCCTCCAAGAATGT AA GT	TCTGCATTTTAACTA TGGCTC	58
BAT-26 (2p)	(T) ₅(A) ₂₆	TGACTACTTTTGACTT CAGCC	AACCATTCAACATTT TTAACCC	58
D2S123 (2p16)	(CA) ₁₃ TA(CA) ₁₅ (T/GA) ₇	AAACAGGATGCCTGC CTTTA	GGACTTTCCACCTAT GGGAC	60
D5S346 (5q21/22)	(CA) ₂₆	ACTCACTCTAGTGATA AATCG	AGCAGATAAGACAG TATTACTAGTT	55
D17S250 (17q11.2-q12)	(TA) ₇(CA) ₂₄	GGAAGAATCAAATAG ACAAT	GCTGGCCATATATAT ATTTAAACC	52

MS: microsatélite; Ta °C: temperatura de anelamento em graus Celsius.

3.7 Análise de metilação e expressão do miR-9

3.7.1 PCR específica para metilação (*Methylation Specific PCR – MSP*)

Para distinguir o estado de metilação de uma sequência de DNA, a técnica MSP apoia-se em modificações químicas diferenciais que ocorrem nos resíduos de citosina do DNA. Inicialmente, o DNA é tratado com bissulfito de sódio, o qual converte os resíduos de citosina não metilados das ilhas CpG em uracila e as citosinas metiladas permanecem inalteradas. Essas modificações em citosinas resultam em sequências diferentes de DNA, originando fitas de DNA metilado e não metilado que serão usados na PCR. Os *primers* utilizados são desenhados de forma a distinguir o DNA metilado do não metilado. O número e a posição de citosinas dentro do dinucleotídeo CpG determina a especificidade dos *primers* para os moldes metilado e não metilado (Coffee, 2009).

3.7.1.1 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

A conversão do DNA por bissulfito de sódio foi realizada com o *EZ DNA Methylation™ Kit* (D5001, Zymo Research's) ou com o *Imprint DNA Modification Kit* (MOD50, Sigma Aldrich), segundo as instruções do fabricante. O protocolo é dividido em duas etapas: 1) tratamento das amostras de gDNA com bissulfito de sódio; 2) limpeza do DNA após a modificação. As amostras convertidas foram dosadas por espectrofotometria (*Nanodrop-Spectrophotometer* ND-1000, Thermo Scientific) como fita simples de DNA (*ss-DNA*) e mantidas a - 80°C (uso recomendado até 1 mês após conversão) ou utilizadas imediatamente.

A eficiência do tratamento com o bissulfito foi verificada pelo método de MSP para amplificação das cópias metilada e não metilada do gene *SNRPN* (ribonucleoproteínas pequenas do núcleo associada ao polipeptídeo N – éxon α) de acordo com Kubota *et al.* (1997). Esse gene apresenta *imprinting* genômico, sendo que indivíduos normais apresentam um produto de 174 pb, que tem como molde a cópia metilada, presente no cromossomo materno; e um produto de 100 pb, que tem como molde a cópia não metilada, presente no cromossomo paterno. Os *primers* descritos por Kubota *et al.* (1997) foram sintetizados pela empresa Sigma Aldrich e estão especificados na Tabela 2 quanto às sequências e aos tamanhos dos fragmentos amplificados.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 12,5 µL contendo 200 µM de dNTPs (Fermentas), tampão de PCR 1x (Promega), 2,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,4 µM de cada primer, 0,6 U de GoTaq Hot Start Polymerase (5U/µL; Promega) e cerca de 30 ng de gDNA modificado por bissulfito. O DNA foi amplificado em termociclador Eppendorf MasterCycler® com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e por fim uma extensão final de 72°C por 10 minutos (Kubota *et al.*, 1997). Para cada reação foi usado um controle de gDNA sem tratamento com bissulfito e o controle da PCR sem DNA molde (branco). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese (100 V por 1 hora) em gel de agarose 3% e visualizados pela marcação com Gel Red (Biotium). O tampão de corrida utilizado na eletroforese foi o Tris-Acetato-EDTA (TAE: 4 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,3; Sigma Aldrich).

Tabela 2. *Primers* do gene *SNRPN* utilizados no MSP para teste de eficiência de conversão do DNA por bissulfito de sódio.

<i>Primers</i>	Sequência 5' - 3'	Tamanho (pb)
<i>Primer SNRPN-Materno (forward)</i>	TAAATAAGTACGTTTGCGCGGTC	174
<i>Primer SNRPN-Materno (reverse)</i>	AACCTTACCCGCTCCATCGCG	
<i>Primer SNRPN-Paterno (forward)</i>	GTAGGTTGGTGTGTATGTTTAGGT	100
<i>Primer SNRPN-Paterno (reverse)</i>	ACATCAAACATCTCCAACAACCA	

Observação: As letras em negrito são os locais onde ocorreu a modificação de citosina para uracila, com o tratamento com bissulfito de sódio; e os sublinhados indicam os dinucleotídeos CpG.

3.7.1.2 Análise qualitativa de metilação no *miR-9* por MSP

O perfil de metilação do promotor do *miR-9-1* (cromossomo 1q22) e *miR-9-3* (cromossomo 15q26), que codificam o mesmo *miR-9* maduro foi obtido por MSP. Os *primers* para as regiões analisadas foram os descritos por Lujambio *et al.* (2008) e as sequências, temperaturas de melting e anelamento bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados estão mostrados nas Tabelas 3 e 4.

As reações de PCR foram realizadas em um volume de 12,5 µL contendo 200 µM de dNTPs (Fermentas), tampão de PCR 1x (Promega), 3,0 mM de MgCl₂ (promega) para o primer *miR-9-3* não metilado e 2,0 mM para os demais *primers*, 0,4 µM de cada primer, 1 U de GoTaq Hot Start Polymerase (5U/µL; Promega) e cerca de 20 ng de gDNA modificado por bissulfito. Nas reações com os *primers* não metilados de *miR-9-1* e de *miR-9-3* foram adicionados 5% de DMSO em cada reação a fim de melhorar a especificidade. O DNA foi

amplificado em termociclador Eppendorf MasterCycler® com as seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de acordo com temperatura padronizada para cada par de primer (tabela 4) por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, e por fim uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Para cada reação foi usado um controle de gDNA sem tratamento com bissulfito e o controle da PCR sem DNA molde (branco). Para confirmação da especificidade de cada par de primer sintetizado pela Sigma Aldrich, foram utilizados os controles comerciais de DNA metilado e não metilado convertidos com bissulfito (*EpiTect PCR Control DNA Set*; 59655, Qiagen). O total de cada produto de amplificação por PCR (12,5 µL) foi analisado por eletroforese (100 V por 45 minutos) em gel de agarose 2% corado com Gel Red (Biotium). O tampão de corrida utilizado na eletroforese foi o TAE (4 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,3; Sigma Aldrich).

Tabela 3. Relação dos *primers* utilizados para análise de metilação do miR-9 por MSP.

	<i>Primer – metilado</i>	<i>Primer - não metilado</i>
miR-9-1*		
<i>Forward</i>	TTTTATTTTCGTTGACGGGC	TTTTTTTATTTTGTGTGATGGGT
<i>Reverse</i>	CCCGCCTCCTAACTACTATCG	CCCACCTCCTAACTACTATCACC
miR-9-3*		
<i>Forward</i>	GGTGTTAGGACGTACGGAAC	GGTGTTAGGATGTATGGAAT
<i>Reverse</i>	TACCCGAATCCTAAAACGC	TACCCAAATCCTAAAACAC

*O miR-9 maduro apresenta três *locus* primários (miR-9-1, 2 e 3).

Observação: As letras em negrito são os locais onde ocorreu a modificação de citosina para uracila nos dinucleotídeos CpG; e os sublinhados indicam os dinucleotídeos CpG.

Tabela 4. Temperaturas de anelamento padronizadas e tamanho dos fragmentos amplificados para cada par de *primer* do miR-9.

<i>Primer</i> miRNA	T _m (°C)	Temperaturas de anelamento (°C)	Amplicon (pb)
miR-9-1 metilado			
<i>Forward</i>	63.5	60	103
<i>Reverse</i>	63.6		
miR-9-1 não metilado			
<i>Forward</i>	60	56 (+ 5% DMSO)	106
<i>Reverse</i>	61.5		
miR-9-3 metilado			
<i>Forward</i>	60.9	55	162
<i>Reverse</i>	61.4		
miR-9-3 não metilado			
<i>Forward</i>	55.2	52 (+ 5% DMSO)	162
<i>Reverse</i>	53.9		

3.7.2 *Análise de expressão do miR-9*

3.7.2.1 *Extração e Quantificação de miRNA*

A extração dos miRNAs das células em estudo foi realizada usando o kit de extração, enriquecimento e purificação de RNAs pequenos, *miRNeasy* (código 217004; Qiagen). Aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células foram rompidas com 700 μL do reagente QIAzol® (código 79306; Qiagen) e o RNA obtido conforme instruções do fabricante. Após a obtenção do RNA total, o mesmo foi fracionado em colunas de enriquecimento de RNAs pequenos (< 200 nucleotídeos) e RNAs maiores (> 200 nucleotídeos), usando-se os tampões de eluição de RNAs grandes e pequenos. A quantificação das frações de RNAs foi realizada aplicando-se 1 μL das amostras no espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA) em comprimento de onda de 230 nm, além de considerar a relação de comprimentos de ondas 260/280 nm e 260/230 nm para verificação da presença de contaminantes nas amostras (Sambrook e Russel, 2001). As amostras foram armazenadas em freezer a -80°C .

3.7.2.2 *Quantificação dos miR-9 e miR-9* por PCR quantitativa em tempo real*

Para realizar a reação de transcrição reversa (RT-PCR) a partir dos miRNAs para gerar os cDNAs, utilizou-se 1,5 μL do tampão de transcrição (10X), 1 μL do *primer* de transcrição reversa específico para o miR-9 (TaqMan, Life Technologies), 0,15 μL de dNTPs, 1,0 μL da enzima Multiscribe™ (Life Technologies), 1,9 U de inibidor de RNase (0,188 μL), 5 ng de RNA total e H_2O livre de RNases q.s.p. 15 μL por reação. As reações de transcrição reversa foram realizadas em termociclador (Eppendorf, Alemanha) a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. Após a reação, o cDNA foi diluído na proporção de 1:4 em água livre de RNases/DNases.

A reação de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) para amplificar o cDNA resultante da transcrição reversa descrita anteriormente foi realizada utilizando 0,5 μL das sondas específicas para cada miRNA *TaqMan® Small RNA Assay - 20 X* (Life Technologies), 4,5 μL de cDNA, 5 μL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix II* (2X) por reação. O equipamento utilizado foi o Eppendorf Mastercycler Realplex 4 S (Eppendorf, Alemanha) com os seguintes parâmetros: 10 minutos a 95°C , e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C . Os miRs estudados foram o hsa-miR-9 (sense; código 000583, TaqMan) e hsa-miR9* (anti-sense; código 002231, TaqMan) e o pequeno RNA nuclear RNU6 usado como referência. A quantificação relativa dos níveis dos miRNAs entre as células

HN12shCTRL e HN12shSET utilizou os valores de *Cycle threshold* (Ct) aplicados na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Os ensaios foram realizados em triplicata experimental a partir de 2 experimentos independentes. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média da replicata experimental.

3.8 Análise do dano e reparo de DNA

3.8.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única, é um método para avaliação de danos no DNA de células individuais e possibilita quantificar as quebras do DNA. O cometa foi realizado em condições alcalinas (condição desnaturante de DNA; pH > 13), que detecta todos tipos de quebra (simples, duplas). O protocolo utilizado foi baseado em Singh *et al.* (1988) e modificado de acordo com Kim *et al.* (2007).

Primeiramente, ocorreu a preparação das lâminas histológicas com uma camada de agarose normal 1,5% (16500-100, Invitrogen). Após o seu preparo, a agarose 1,5% (diluída em PBS) foi mantida em banho-maria a 60°C para estabilização da temperatura. Essa temperatura é necessária para que a agarose fixe na lâmina. As lâminas limpas foram mergulhadas no recipiente contendo a agarose até a parte fosca e em seguida, deixadas para secar na posição horizontal em temperatura ambiente por no mínimo 1 hora. Para a inclusão da camada de células nas lâminas, foram plaqueadas células HN12 shCTRL e shSET (2x10⁵ células/poço) e Cal27 shCTRL e shSET (3x10⁵ células/poço) em placas de 6 poços cerca de 24 horas antes da realização do ensaio cometa. Para a montagem das lâminas, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e 20 µL da suspensão celular foram diluídos em 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point* ou LMP; dissolvido em PBS; 15517-014, Invitrogen). A agarose LMP permanece líquida até 37°C, o que permite a manipulação de células sem danos por temperatura alta. Essa suspensão de células foi colocada sobre a primeira camada de agarose na lâmina (2 alíquotas de 50 µL) e coberta com lamínula. A lâmina foi colocada na geladeira por 10 minutos para o endurecimento da agarose LMP. Em seguida, as lâminas foram dispostas em cubeta vertical (protegida da luz) com solução de lise gelada (NaCl 2,5M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, contendo DMSO 10% e Triton X-100 1% adicionados imediatamente antes do uso; Sigma Aldrich) e mantidas imersas a 4°C por no mínimo duas horas e no máximo 1 semana.

No momento da corrida, as lâminas foram transferidas para outra cubeta com solução alcalina de eletroforese gelada (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH>13; Sigma Aldrich) por 20 minutos. A solução alcalina foi utilizada para a desnaturação do DNA. A cuba de eletroforese foi colocada em um banho de gelo e preenchida com a solução alcalina de eletroforese. Após os 20 minutos, as lâminas foram dispostas na cuba e a corrida realizada com 25V (voltagem constante) por 20 minutos. Após o término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e o excesso de solução alcalina retirada com papel absorvente dispondo-se as lâminas de forma inclinada. A neutralização foi realizada pela imersão das lâminas em tampão neutro (Tris 0,4 M, pH 7,5; Sigma Aldrich) a 4°C por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram retiradas do tampão para secar e depois submetidas à desidratação com etanol absoluto por 5 minutos.

Por fim, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para secar completamente. Para visualização das lâminas em microscópio, elas foram coradas com Gel Red 1x (Biotium). Imagens digitais foram obtidas em *Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope* e *Zeiss Axiovision 4.8.2 software* com o aumento de 200x. Cada ensaio foi realizado em duplicata e para cada lâmina, 100 células foram analisadas usando o TriTek CometScore (TriTek Corp., Sumerduck, VA, USA). A quantidade de danos no DNA foi associado à porcentagem de DNA na cauda (razão da intensidade da cauda do cometa pela intensidade total do cometa).

3.8.2 Imunofluorescência de proteínas de reparo: MLH1, ATM e BRCA1

Para a avaliação das proteínas de reparo MLH1, ATM e BRCA1, foi realizada imunofluorescência com o anticorpo primário e seu respectivo anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor® (Invitrogen).

As células HN12 (2×10^4 células/poço) e Cal27 (3×10^4 células/poço) com e sem silenciamento da SET foram plaqueadas em placa de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após 24 horas, as células foram lavadas uma vez com PBS (por 2 minutos) e fixadas com metanol a -20°C por 10 minutos. Após três lavagens com PBS, as células foram incubadas com solução de bloqueio (PBS com 3% de BSA) por 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução de bloqueio foi retirada e então as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-MLH1, anti-BRCA1 ou anti-ATM (diluídos em PBS-Tween-20 0,25% + 3% BSA, Sigma Aldrich) por 16 horas a 4°C. Após novas lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário conjugado com Alexa

Fluor® (diluído 1:1000 em PBS-Tween-20 0,25% + 3% BSA) por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, o núcleo das células foi marcado com DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol; estoque: 10 µg/mL; Sigma Aldrich) diluído em PBS (1:50) por 10 minutos. As células foram lavadas três vezes com PBS e as lâminulas foram montadas com *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, S3023, CA, USA) nas lâminas histológicas.

As imagens foram visualizadas em *Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope* e *Zeiss Axiovision 4.8.2 software*. Na tabela 5 estão descritos os títulos e a origem dos anticorpos primários e secundários utilizados neste trabalho.

A marcação de ATM na célula HN12 apresentou algumas modificações em relação às demais marcações, visto que a visualização e captura de imagens foram feitas no *ImageXpress® Micro XL* e *MetaXpress® Software (High Content Screening System, Molecular Devices)*. As células HN12 shCTRL e shSET foram plaqueadas (3000 células/poço) em placa de 96 poços específica para a leitura no ImageXpress®. O núcleo foi marcado com iodeto de propídio (Concentração final: 10 µg/mL). Os procedimentos de marcação com os anticorpos primário e secundário foram iguais aos descritos anteriormente.

Tabela 5. Descrição dos anticorpos primários e secundários utilizados no ensaio de imunofluorescência para proteínas associadas com reparo de DNA.

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante/código
Anti-ATM total	Monoclonal Coelho	1:100	Cell Signaling (#2873)
Anti-MLH1	Monoclonal Camundongo	1:200	Cell Signaling (#3515)
Anti-BRCA1	Monoclonal Coelho	1:100	Cell Signaling (#9025)
Alexa Fluor® 488	Anti-Coelho	1:1000	Invitrogen - Molecular Probes (A21206)
Alexa Fluor® 594	Anti-Camundongo	1:1000	Invitrogen - Molecular Probes (A21203)

As imagens foram analisadas pelo *software Imaje J* versão 1.47t. Para o MLH1 foi calculado o nível de fluorescência nuclear por célula usando a fórmula para o cálculo da fluorescência celular total corrigida (CTCF - *corrected total cell fluorescence*; fórmula 1) (Gavet e Pines, 2010).

(1) $CTCF = \text{Densidade Integrada} - (\text{Área da célula} \times \text{Fluorescência média do background})$.

A densidade integrada equivale à soma de intensidade dos pixels da região nuclear da célula; a área da célula se refere à área nuclear selecionada manualmente; e a fluorescência

média do background equivale à intensidade em pixels da região de fundo da imagem (3 seleções de regiões adjacentes à célula).

Para o BRCA1 e ATM foi calculada a porcentagem de células positivas para a imunomarcação. Primeiro foi determinado um *threshold* para a imunomarcação no *Imaje J 1.47t.*, e assim, o mesmo *threshold* foi utilizado para todas as imagens. Em seguida, as células positivas e o número de células total para cada campo foram contados pela ferramenta *cell counter* do *software Imaje J.*

3.9 Irradiação das células HN12 com e sem silenciamento da SET

3.9.1 Procedimento de irradiação das células

As células HN12 shCTRL e shSET foram plaqueadas em placas de acrílico para cultura de células (Corning, NY, USA), possibilitando que todos recebam a mesma irradiação (IR) direta por unidade de área. Durante a IR, as células permaneceram em meio DMEM completo (suplementado com 10% SBF e 1% antibiótico e antimicótico).

Os espécimes foram irradiados com as doses de 2, 4 e 6 Gy no Serviço de Radioterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo e contou com a colaboração do Dr. Harley Francisco de Oliveira do departamento de Clínica Médica. Utilizou-se raios-X por meio de um irradiador dedicado a Pesquisas Biológicas (RS 2000, Rad Source Technologies, Inc., Suwanee, GA) com energia de 160 kVp e 25 mA e filtro padrão de Cu de 0.3 mm. Os raios-X gerados sob esta condição possuem um espectro com a energia mínima de 95 kV até 160 kV máximo de energia, e a metade do valor do feixe com 0,62 milímetros de Cu. O gradiente de dose deste raio-X em tecido é de cerca de 10% à 0,5 cm de profundidade.

As placas foram alinhadas equidistantes do centro do feixe e dentro do cone para garantir uma taxa de dose uniforme (aproximadamente 1,115 Gy/minuto) e a entrega total da dose por fração. O controle de qualidade foi realizado utilizando Nanodot dosímetros (Landauer, Inc., Glenwood, IL), sendo as leituras de dose na superfície das placas utilizadas para calcular os tempos de tratamento “beam-on”. Os dosímetros foram colocados abaixo das placas irradiadas e calibrados de acordo com as condições de feixe descritos acima.

3.9.2 Ensaio de sobrevivência clonogênico

O efeito da combinação da redução da proteína SET por silenciamento de RNA e da radiação ionizante na capacidade de sobrevivência e de proliferação foi obtido pelo ensaio clonogênico de acordo com Franken *et al.* (2006).

As células tumorais HN12 shCTRL e shSET foram irradiadas com diferentes doses de radiação (0, 2, 4 e 6 Gy) em placas de 12 poços à temperatura ambiente. Após 24 horas da IR, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Um número conhecido de células (baixa densidade celular) foi cultivado em placas de 100 mm a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas durante 12 dias e posteriormente, fixadas e coradas com mistura de glutaraldeído 6% (G6257, Sigma Aldrich) e cristal violeta 0,5% (61135, Sigma Aldrich) em H₂O milliQ por cerca de 1 hora. Colônias com mais de 50 células foram contadas utilizando o *software Image J 1.47t*. de acordo com Rafehi *et al.* (2011). Após a contagem, a porcentagem de eficiência de plaqueamento (EP) e a fração celular sobrevivente (FS) foram calculadas (equação 1 e 2, respectivamente). Foram realizados dois ensaios independentes em duplicata. A curvas de sobrevivência e a análise estatística foram feitas no *software* GraphPad Prism® versão 5.01.

$$(1) EP = \frac{\text{Número de colônias formadas (sem IR)}}{\text{Número de células plaqueadas}}$$

$$(2) FS = \frac{\text{Número de colônias após IR}}{EP \times \text{Número de células plaqueadas}}$$

3.9.3 Ciclo celular

A análise do conteúdo de DNA permite definir em qual fase do ciclo celular a célula se encontra. Assim, a análise da distribuição das células nas fases do ciclo celular é possível pela marcação do DNA das células com iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria de fluxo. A deconvolução do conteúdo de DNA em histogramas de frequência distribui as células nas três principais fases do ciclo celular (G1, S e G2/M), além de ser possível detectar células mortas com DNA fragmentado – sub G0/G1 (Pozarowski e Darzynkiewicz, 2004).

As células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^5$ células) em placas de 6 poços cerca de 24 horas antes da IR. Após 48 horas da IR, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS e incubadas em etanol 70% gelado por pelo menos 1 hora a 20°C. Juntamente com as células, foi coletado o meio de cada poço para a análise de células em sub G0/G1. Foi realizada uma

centrifugação (250 x g por 5 minutos) para retirada do etanol; e as células foram ressuspensas em solução de PI (solução final 50 µg/mL em PBS; P4170, Sigma Aldrich) e a cada suspensão foi adicionado RNase A (166 µg/mL; R4642, Sigma Aldrich). Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C, centrifugadas e lavadas 1 vez com PBS. A análise das células marcadas foi feita no citômetro *Guava easyCyte HT* (Millipore) utilizando o *software InCyte*. Os dados foram importados e analisados no *software FlowJo vX 0.7* (Tree star, Inc.).

3.9.4 Extração e análise de proteínas

Para a extração de proteínas, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão de extração de proteínas (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 1 µg/ml leupeptin) adicionado de coquetel de inibidores de proteases (P8340, Sigma Aldrich) e de fosfatases (2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM b-glycerophosphate; 1 mM Na₃VO₄). Os lisados foram submetidos à ultrasonicação por três pulsos de dez segundos na potência 50% do aparelho *Sonic Dismembrator* (Modelo 100, Fisher Scientific), o extrato foi centrifugado a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C para retirada de debris celulares. Para extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares por subfracionamento celular de proteínas foi utilizado o kit comercial *NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (78833, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), seguindo protocolo recomendado pelo fabricante.

A concentração de proteínas dos extratos totais e subcelulares foi determinada por reação de Bradford utilizando o reagente *Bio-Rad protein assay* (500-0006, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), segundo instruções do fabricante, e os extratos proteicos foram armazenados em freezer -80°C.

3.9.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Amostras de proteínas (10 - 30 µg) foram separadas por SDS-PAGE segundo protocolo descrito por Laemmli (1970). A porcentagem dos géis utilizados foram 6, 10 ou 15% de acordo com o tamanho da proteína analisada. Foi utilizado o sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN® (Bio-Rad Laboratories). O padrão de massa molecular para proteínas usado foi o *Spectra Multicolor Broad Range ladder* (26634, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). As seguintes condições de eletroforese foram configuradas: amperagem constante de 15 mA/gel e voltagem limite de 110 V durante 90 a 120 minutos. As

corridas de eletroforese foram feitas em tampão Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS 0,1%, pH 8,3).

3.9.6 *Western blotting (WB)*

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE as proteínas foram eletrotransferidas para membrana de PVDF (GE Healthcare, EUA), com tampão de transferência (bicarbonato de sódio 10 mM e carbonato de sódio 3,0 mM, pH 9,9) por 1,5 hora a 350 mA/gel. Para a transferência de proteínas de alto peso molecular, como o ATM (350 kDa) e p-ATM (350 kDa), foi usado o tampão de tris-glicina (concentração final: Tris 12 mM, Glicina 96 mM) contendo metanol (proporção 1:5) e voltagem de 90 V durante 2 horas. Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (solução salina tamponada de Tris (TBS/T) - Tris.Cl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, com leite desnatado 5%) por 1 hora a temperatura ambiente. Após bloqueio, a membrana foi lavada 3 x com TBS/T por 5 min e incubada *overnight* a 4°C com o anticorpo primário diluído (Tabela 6) em TBS/T ou solução de bloqueio. No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS/T durante 5 minutos, três vezes, e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em solução de bloqueio, seguido de lavagem com TBS/T.

A visualização dos imunocomplexos por quimioluminescência foi realizada a partir da adição de solução de ECL - *enhanced chemiluminescence* (Tris 0,1 M pH 8,5, ácido p-coumárico 400 µM, luminol 2,5 mM) acrescido de 0,009% de peróxido de hidrogênio (Mruk e Cheng, 2011). A membrana de PVDF foi exposta a filme de autoradiografia ou analisada em equipamento *ChemiDoc™ MP imager* (Bio-Rad Laboratories) para a detecção da imunomarcação. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria usando o *software Image J 1.47t*.

Tabela 6. Lista de anticorpos usados no trabalho e suas respectivas diluições.

Anticorpo	Código	Origem	Diluição	Fabricante
Anti-ATM total	#2873	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-p-ATM(Ser1981)	#5883	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-PARP	#9532	Coelho	1:1.000	Cell Signaling
Anti-caspase-3	#9665	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-caspase-8	#9746	Camundongo	1:1000	Cell Signaling
Anti-p21 Waf1/Cip1	#2947	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-p21 Waf1/Cip1	P1484	Mouse	1:1000	Sigma Aldrich

Anti-I2PP2A (SET)	Sc-5655	Cabra	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-XIAP	#2042	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-Survivina	#2802	Camundongo	1:1000	Cell Signaling
Anti-MLH1	#3515	Camundongo	1:1000	Cell Signaling
Anti-LC3B	#3868	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-p62/SQSTM1	#5114	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti- β actina	sc-47778	Camundongo	1:2.500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-GAPDH	#2118	Coelho	1:2000	Cell Signaling
Anti-Calnexina	#2433	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti- β -tubulina	#2128	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-Fibrilarina	#2639	Coelho	1:1000	Cell Signaling
Anti-camundongo	04-18-06	Cabra	1:5.000	KPL
Anti-coelho	65-6120	Cabra	1:5.000	Invitrogen
Anti-cabra	14-13-06	Coelho	1:5.000	KPL

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas e os gráficos foram feitos com o programa GraphPad Prism 5 versão 5.01. Nos gráficos foram representados a média e o erro padrão da média e valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Para a análise de danos no DNA pelo ensaio cometa, quantificação por imunofluorescência da intensidade de MLH1 nuclear por célula e da porcentagem de células ATM e BRCA1 positivas foi utilizado o *Test t' student* não paramétrico (*Mann Whitney*). No ensaio clonogênico foi utilizado o *Teste t'student* não pareado para comparação da eficiência de plaqueamento (EP) de HN12 shCTRL e HN12 shSET e a análise de regressão linear nas curvas de sobrevivência da HN12 shCTRL e HN12 shSET submetidas a crescentes doses de IR. Na análise do ciclo celular foi utilizado o teste *Two-way ANOVA* e *Bonferroni post test* para comparação da população de células HN12 shCTRL e shSET em G2/M e subG0/G1 em todas as doses de IR.

Resultados

4 Resultados

4.1 Confirmação do silenciamento da proteína SET

As células HN12 e Cal27 shSET (com silenciamento estável do mRNA para proteína SET) e HN12 e Cal27 shRNA controle foram analisadas por WB e foi confirmada a redução da proteína alvo de forma estável nas linhagens (Figura 8).

Figura 8. Redução da proteína SET nas linhagens HN12 e Cal27 com shRNA para SET (shSET) comparado ao controle (shCTRL). Imagens representativas de três experimentos independentes. Os anticorpos usados foram para SET, GAPDH e β -actina.

4.2 Perfil de metilação do miR-9 nas linhagens de CEC oral

4.2.1 Eficiência da conversão do DNA por bissulfito de sódio

A MSP realizada para o gene *SNRPN*, que apresenta *imprinting*, com as amostras de DNA após tratamento com bissulfito amplificou tanto o fragmento materno metilado (174 pb) quanto o fragmento paterno não metilado (100pb) (Figura 9). Dessa forma, a conversão de DNA por bissulfito de sódio mostrou-se eficiente por ambos os kits de conversão, *Imprint DNA Modification Kit* (Kit 1, Sigma Aldrich) e *EZ DNA MethylationTM Kit* (Kit 2; Zymo Research's). Os dois kits foram utilizados para conversão de gDNA com bissulfito de sódio no presente trabalho.

Figura 9. MSP para os alelos materno (metilado) e paterno (não metilado) do gene *SNRPN* usado como teste de eficiência da conversão por bissulfito de sódio. O DNA extraído da linhagem HaCat foi convertido com bissulfito de sódio usando dois kits diferentes: o *Imprint DNA Modification Kit* (kit 1; Sigma Aldrich) e *EZ DNA Methylation™ Kit* (kit 2; Zymo Research's). Eletroforese em gel de agarose 3% corado pelo Gel Red (Biotium). Nas canaletas foram aplicadas as amostras: HaCaT convertida com kit 1 e kit 2; C- (controle negativo da MSP) é o gDNA da HaCaT não tratado com bissulfito; H₂O: controle negativo da PCR, sem qualquer amplificação inespecífica. M': padrão de peso molecular de 100 pb (Promega)). P: utilizou-se *primers* para o alelo não metilado (paterno – 100pb) do gene *SNRPN*; M: *primers* para a o alelo metilado (materno – 174 pb) do *SNRPN*.

4.2.2 Perfil de metilação no *miR-9*

A transcrição do *miR-9* é regulada por metilação dos *loci miR-9-1*, *miR-9-2* e *miR-9-3*. A redução da SET na HN12 reverteu parcialmente a hipermetilação de dois promotores dos pri-miRNAs, *miR-9-1* e *miR-9-3*, que codificam o *miR-9* maduro, demonstrando a amplificação por MSP dos fragmentos não metilados de *miR-9-1* e *miR-9-3* (Figura 10A e B). Na Cal27 não ocorreu alteração qualitativa do padrão de metilação do promotor de *miR-9-1* e *miR-9-3* com a redução da SET (Figura 10A e B). Entretanto, pode-se notar que a HN12 possui hipermetilação total (somente fragmentos metilados) dos dois *loci* de *miR-9* analisados, enquanto a Cal27 possui somente o *miR-9-1* totalmente hipermetilado. Isto sugere que: I) a linhagem Cal27 pode ter expressão do *miR-9* enquanto a HN12 não; II) na HN12 o nível de SET contribui para a hipermetilação do *miR-9* levando a possível perda de sua expressão.

A MSP com os controles comerciais de DNA metilado e não metilado convertidos por bissulfito mostrou que os *primers* usados para o *miR-9-1* e *miR-9-3* são específicos (Figura 10C).

Figura 10. A redução da SET na linhagem HN12 diminui a hipermetilação do *miR-9-1* e *miR-9-3*. Gel de agarose 2% corado pelo Gel Red (Biotium). (A) Nas canaletas: M': padrão de peso molecular de 100 pb (Promega); M: *primer miR-9-1* para metilado (103 pb); N: *primer miR-9-1* para não metilado (106 pb); C+: HaCaT convertida com bissulfato de sódio foi definida como controle positivo para os primers metilado e não metilado; C-: gDNA da HaCaT sem tratamento com bissulfato (controle negativo do tratamento). (B) M: *primer miR-9-3* para metilado (162 pb); N: *primer miR-9-3* para não metilado (162 pb); C+: HaCaT convertida com bissulfato; C-: gDNA da HaCaT sem tratamento com bissulfato. (C) Confirmação de especificidade de cada primer utilizando controles metilado e não metilado (*EpiTect PCR Control DNA Set*; Qiagen). Nas canaletas: C.M.: controle comercial de DNA humano totalmente metilado convertido com bissulfato de sódio (10 ng/reacção; Qiagen); C.N.: controle de DNA humano não metilado convertido com bissulfato (10 ng/reacção; Qiagen). M: *primers* de *miR-9-1* e -3 para metilado; N: *primers* de *miR-9-1* e -3 para não metilado; Imagens representativas de três experimentos independentes.

Analisando o perfil de metilação dos *loci* codificantes do miR-9 nos tumores xenoinxerto das células HN12 shSET e HN12 shCTRL (n=3), observamos amplificação de DNA não metilado do *locus miR-9-1* somente em tumores HN12 shSET, enquanto o *miR-9-3* não apresentou diferença quando comparado ao CTRL (Figura 11). A reacção de MSP para os *loci* do miR-9 usando o DNA extraído da cauda de camundongo convertido com bissulfato mostrou que há especificidade para o DNA humano. Estes dados mostram que a redução da SET nas células HN12 é capaz de modificar o status de metilação dos *loci* codificantes do miR-9, e esta reversão de hipermetilação foi observada tanto *in vitro* quanto *in vivo* para o *locus miR-9-1*, e *in vitro* para o *miR-9-3*.

Figura 11. Análise de metilação do DNA nos loci *miR-9-1* e *miR-9-3* por MSP nos tumores xenoenxerto formados pelas células HN12 shCTRL e HN12 shSET em camundongos nude. Gel de agarose 2% corado pelo Gel Red (Biotium). Nas canaletas: M': padrão de peso molecular de 100 pb (Promega); M: *primer* para o *locus* metilado; N: *primer* para o *locus* não metilado; Cauda (camundongo): gDNA extraído da cauda do Balb/c nude convertido com bissulfito de sódio; C+: gDNA da HaCaT convertido com bissulfito de sódio; C-: gDNA da HaCaT sem tratamento com bissulfito; H₂O: controle da PCR. Imagem representativa de três tumores xenoenxerto analisados (n=3).

4.2.3 Expressão do *miR-9*

Os níveis das sequências sense (*miR-9*) e anti-sense (*miR-9**) do *miR-9* maduro foram avaliados *in vitro* e *in vivo*, já que foi descrito que ambas as sequências são funcionais (Packer *et al.*, 2008; Schraivogel *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013). As células HN12 shSET apresentaram aumento da quantidade de ambas sequências do *miR-9* em relação a HN12 shCTRL, sendo observado maior nível da fita sense (HN12 shCTRL = 1 *vs* HN12 shSET = $1,41 \pm 0,33$; Figura 12A). Nos tumores xenoenxerto de HN12 shCTRL e HN12 shSET (n=4), obtivemos o aumento de *miR-9** para os quatro tumores analisados e o aumento de *miR-9* somente em dois dos tumores (Figura 12B). Houve variação quanto ao nível de *miR-9/9** nos quatro tumores analisados, sendo necessária a ampliação do número amostral (n). Portanto, nossos dados mostram pela primeira vez que a SET pode influenciar na regulação epigenética e expressão do *miR-9* com potencial impacto na progressão e agressividade tumoral.

Figura 12. Quantificação dos níveis do miR-9 (sense) e miR-9* (anti-sense) por RT-qPCR nas células HN12shCTRL e HN12shSET (A) e nos tumores xenoenxerto de camundongos (B). Os miRNAs foram quantificados por RT-qPCR usando ensaios TaqMan®. O pequeno RNA nuclear *RNU6b* foi utilizado como normalizador (*housekeeping*) da quantidade de RNAs pequenos nas amostras. A análise *in vitro* foi feita em triplicata a partir de dois ensaios independentes e a análise *in vivo* realizada a partir de 4 amostras de tumores xenoenxerto da HN12 shCTRL e shSET. Os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos miRNAs das células HN12shSET em relação às células HN12shCTRL (valor fixado em 1) são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média.

4.3 Análise de cinco marcadores de instabilidade de microssatélites (MSI)

A análise do painel de 5 microssatélites (*BAT25* e *BAT26*, repetição de mononucleotídeos; *D5S346*, *D2S123*, *D17S250*, repetição de dinucleotídeos), usados como marcadores de MSI, nas linhagens Cal27 e HN12, mostrou alteração no perfil alélico de 2 marcadores, *D5S346* e *D2S123*, na linhagem HN12 shSET quando comparada ao controle (Figura 13A). Na Cal27 não foi possível observar alterações significativas no perfil alélico com a redução da SET (Figura 13A).

Nos tumores xenoenxerto HN12 shSET (*in vivo*) o perfil de alteração alélica nos marcadores *D5S346* e *D2S123* foi semelhante àquele das células *in vitro* (Figura 13B). A modificação do perfil alélico (aumento e variação na intensidade dos alelos) desses marcadores quando houve redução da proteína SET nas células HN12 sugere aumento da MSI. Este fenômeno pode estar correlacionado com uma diminuição de eficiência do sistema de reparo *mismatch* e ganho de mutações. Nossos dados sugerem pela primeira vez o envolvimento da proteína SET com reparo de DNA do tipo *mismatch*.

Figura 13. Análise da MSI nas linhagens HN12 e Cal27 (A) e nos tumores xenoinxerto da HN12 (B) com e sem a redução da SET. Cinco marcadores de MSI foram avaliados nas linhagens e tumores xenoinxerto (n=3) com (+) e sem (-) redução da proteína SET. Os produtos de PCR foram analisados em gel 8% poliácridamida desnaturante/uréia corado por SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen). O gDNA da cauda de camundongo nude foi utilizado como controle e demonstrou que os *primers* são específicos para gDNA humano. Imagens representativas de três experimentos independentes.

4.4 Análise de dano e reparo de DNA

4.4.1 Análise de danos no DNA

A quantidade de danos espontâneos no DNA foi estimada com base na proporção relativa de DNA presente na cauda no ensaio cometa. Observou-se que a quantidade de danos de DNA na HN12 com a redução da SET ($18,36 \% \pm 0,93$) foi menor do que no controle ($29,09 \% \pm 1,23$), com diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,0001$). Na Cal27 com o silenciamento da SET não ocorreu diferença na quantidade de danos de DNA em relação ao controle ($p = 0,42$; Cal27 shSET - $16,28 \% \pm 1,38$ vs Cal27 shCTRL $15,80 \% \pm 1,44$) (Figura 14). Estes resultados mostraram que ao contrário do observado para MSI, a

redução da SET foi acompanhada por uma redução na quantidade de danos no DNA (quebras espontâneas), segundo o ensaio cometa. Sendo assim, a próxima etapa foi avaliar o status de proteínas envolvidas com reparo de DNA.

Figura 14. Análise de danos espontâneos no DNA pelo ensaio cometa nas células HN12 e Cal27 com e sem redução da SET. Os nucleóides foram marcados com Gel Red (Biotium). Visualização no aumento de 200x usando *Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope* e *Zeiss Axiovision 4.8.2 software*. Foram analisadas 100 células por lâmina e o ensaio foi realizado em quadruplicata. A quantidade de danos ao DNA foi associada a % de DNA na cauda. Média $\pm$ erro padrão da média; Test t' student não paramétrico (Mann Whitney) *** $P < 0.001$.

4.4.2 Análise de proteínas de reparo do DNA: MLH1, ATM e BRCA1

Na análise da proteína de reparo MLH1 (reparo *mismatch* e DSB), ambas as linhagens HN12 e Cal27 apresentaram aumento nos níveis dessa proteína no núcleo com a redução da SET (Figura 15). A imunofluorescência demonstrou o aumento da intensidade de fluorescência nuclear por célula em ambas as linhagens com shSET (HN12 shCTRL: $26,07 \pm 1,30$ vs HN12 shSET: $35,99 \pm 1,84$; Cal27 shCTRL: $19,89 \pm 1,26$ vs Cal27 shSET: $38,62 \pm 1,99$) e houve diferença estatística em relação aos controles ($p < 0,0001$) (Figura 15A e B).

Além disso, o fracionamento de núcleo e citoplasma nas células HN12 shCTRL e shSET confirmou a diferença de MLH1 nuclear com o aumento de cerca de 30% com a redução da SET (Figura 15C).

Figura 15. A redução da proteína SET promoveu aumento da proteína MLH1 no núcleo das células Cal27 e HN12. (A) Imunofluorescência com anti-MLH1 realizada na HN12 e Cal27 com e sem redução da SET. Visualização no aumento de 1000x usando *Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope* e *Zeiss Axiovision 4.8.2 software*. Seis a nove campos foram analisados por lâmina e o ensaio foi realizado em duplicata. Exposição MLH1: 1500 ms. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência nuclear por célula (CTCF, unidade arbitrária) pelo *software Image J 1.47t*. As barras mostram a média $\pm$ erro padrão da média. Test t'student não paramétrico (Mann Whitney) ***p<0,001. (C) Níveis de MLH1 nas frações subcelulares citoplasmática e nuclear da HN12 shCTRL e shSET. Os valores em preto abaixo das bandas correspondem à razão de MLH1 pela β -tubulina (constitutiva do citoplasma) e à razão de MLH1 pela Fibrilarina (constitutiva do núcleo).

Com relação à proteína ATM (reparo de DSB), a linhagem HN12 shSET apresentou aumento tanto da proteína total quanto da proteína fosforilada (ativa) em relação ao controle (Figura 16). A quantificação da imunofluorescência de ATM total demonstrou o aumento na porcentagem de células ATM positivas com a redução da SET (HN12 shCTRL: $1,31 \pm 0,36$ vs HN12 shSET: $14,26 \pm 1,65$; $p < 0,0001$) (Figura 16C). Esse aumento no nível de ATM total e da ATM fosforilada na HN12 shSET também foi observado por WB (Figura 16D).

A Cal27 shSET não apresentou diferença significativa na porcentagem de células ATM positivas ($p = 0,47$; Cal27 shCTRL: $26,54 \pm 4,61$ vs Cal27 shSET: $28,73 \pm 2,42$; Figura 16C) e no nível proteico de ATM e p-ATM em relação ao controle (Figura 16D).

Figura 16. A redução da proteína SET permitiu o aumento de ATM no núcleo e de p-ATM (ativa) em HN12. (A) Imunofluorescência com anti-ATM realizada na HN12 com e sem redução da SET. Núcleo foi marcado com PI. Visualização no aumento de 200x no *ImageXpress® Micro XL* e *MetaXpress® Software*. Nove campos foram analisados por lâmina e o ensaio foi realizado em triplicata. Exposição ATM: 1000 ms. (B) Imunofluorescência anti-ATM realizada na Cal27shCTRL e Cal27shSET. Núcleo foi marcado com DAPI. Visualização no aumento de 200x usando *Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope* e *Zeiss Axiovision 4.8.2 software*. Seis campos foram analisados por lâmina e o ensaio foi realizado em duplicata. Exposição ATM: 1500 ms. (C) Quantificação da porcentagem de células positivas para ATM pelo *software Imaje J 1.47t*. As barras mostram a média $\pm$ erro padrão da média. Test t'student não paramétrico (Mann Whitney) ***p<0,001. (D) Níveis de p-ATM e ATM total nas linhagens HN12 e Cal27 (shCTRL e shSET) determinado por WB. Os valores (densitometria) em preto abaixo das bandas correspondem à razão de p-ATM pela Calnexina (constitutivo) e à razão de ATM total pela calnexina. Imagem representativa de três experimentos independentes.

A proteína de reparo de DSB BRCA1 foi avaliada por imunofluorescência na linhagem HN12 com e sem a redução da SET (Figura 17A). Observou-se que a porcentagem de células positivas para BRCA1 nuclear na HN12 shSET aumentou em relação ao shCTRL (p=0,0003; HN12 shCTRL: $13,54 \pm 2,89$ vs HN12 shSET: $42,70 \pm 5,45$) (Figura 17B). Nossos dados mostram que a linhagem metastática, HN12, apresentou aumento das proteínas

de reparo MLH1, ATM, p-ATM e BRCA1 com a redução da proteína SET, ou seja, há uma relação inversa entre o nível de SET e das proteínas de reparo analisadas. Para confirmar se a redução da SET na HN12 aumenta a eficiência do sistema de reparo de DSB foram realizados ensaios com IR por raios-X.

Figura 17. A redução da proteína SET aumenta os níveis da proteína de reparo BRCA1 no núcleo das células HN12. (A) Imunofluorescência com anti-BRCA1 realizada na linhagem HN12 com e sem redução da SET. Visualização no aumento de 200x usando *Zeiss Axiovert 40 Fluorescence Microscope* e *Zeiss Axiovision 4.8.2 software*. Seis campos foram analisados por lâmina e o ensaio foi realizado em duplicata. Exposição BRCA1: 1500 ms. (B) Quantificação da porcentagem de células positivas para BRCA1 pelo *software Image J 1.47t*. As barras mostram a média $\pm$ erro padrão da média. Test t'student não paramétrico (Mann Whitney), *** $p < 0,001$.

4.5 Resposta a irradiação (IR) por raios-X na linhagem HN12 shSET

4.5.1 Capacidade de Sobrevivência e Proliferação Celular

Os ensaios de resposta a IR foram realizados somente nas células HN12 porque elas foram sensíveis à redução da SET na análise de MSI e apresentaram alteração nas proteínas de reparo ATM, BRCA1 e MLH1. A capacidade de sobrevivência e proliferação das células HN12 shSET após IR por raios-X foi avaliada pelo ensaio de formação de colônia *in vitro* (ensaio clonogênico). Este ensaio permite avaliar a capacidade de uma única célula isolada gerar uma colônia, permitindo a comparação do potencial clonogênico das células com shSET e IR em relação ao controle (Franken *et al.*, 2006).

Nas células HN12 shCTRL observou-se uma eficiência média de plaqueamento (razão entre o número de colônias e o número de células plaqueadas) de 8,25% ($\pm 0,79$). Já nas células HN12 shSET a eficiência média de plaqueamento obtida foi de 75,87% ($\pm 5,37$) (Figura 18A). As células HN12 com a redução da proteína SET apresentaram uma maior capacidade de formação de colônias quando comparadas com o controle ($p < 0.001$), o que indica uma maior capacidade de proliferação em baixa densidade e sugere maior agressividade.

Quando submetidas a diferentes doses de radiação, tanto as células HN12 shCTRL quanto as HN12 shSET tiveram diminuição da capacidade de sobrevivência com o aumento da dose de radiação de 2 até 6 Gy (Figura 18B). Embora o perfil da curva de sobrevivência da HN12 shCTRL apresente uma pequena diferença em relação a HN12 shSET em 4 Gy, as curvas submetidas à análise de regressão linear não apresentaram diferença significativa ($p = 0,8885$; Figura 18B).

Figura 18. Efeito da redução da SET na capacidade de sobrevivência e proliferação celular com e sem IR. (A) HN12 shCTRL e HN12 shSET foram plaqueadas na densidade de 500 e 1000 células, respectivamente, por placa de 100 mm de diâmetro e a EP (nº colônias/nº células plaqueadas) foi analisada após 12 dias. Foram realizados três experimentos independentes. Teste t'student não pareado, *** $p < 0,001$. Barras indicam a média $\pm$ erro padrão da média. (B) Curvas de sobrevivência da HN12 shCTRL e HN12 shSET submetidas a crescentes doses de IR por raios-X. Após 24 h da IR, as células foram contadas, plaqueadas e cultivadas por 12 dias para o ensaio de sobrevivência clonogênico. A densidade de HN12 shCTRL e HN12 shSET plaqueadas foi de 2000 e 500 células por placa de 100 mm, respectivamente. As curvas de sobrevivência foram submetidas à análise de regressão linear ($P = 0,8885$). Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes plaqueados em duplicata.

4.5.2 Análise do ciclo celular

Com a análise do ciclo celular foi obtida a porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) e a população em sub-G1 (DNA fragmentado). Comparando-se a distribuição das células, as fases G1 e S apresentaram um perfil similar entre a HN12 shCTRL e a HN12 shSET submetidas a diferentes doses de IR (Figura 19A; Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição das células HN12 shCTRL e shSET submetidas a radiação nas fases G1 e S do ciclo celular. EPM: erro padrão médio.

Linhagem	Dose (Gy)	G1		S	
		Média	EPM	Média	EPM
HN12 shCTRL	0	37,00	3,11	14,33	1,17
	2	46,02	2,67	13,65	0,86
	4	38,48	2,16	13,46	0,49
	6	28,02	1,09	12,41	0,70
HN12 shSET	0	41,03	2,61	13,58	1,04
	2	45,10	1,31	13,24	1,42
	4	33,08	2,35	14,65	1,46
	6	28,45	1,85	13,07	0,88

Segundo o gráfico A, foi observada diferença no perfil de distribuição entre a HN12 shCTRL e HN12 shSET irradiadas apenas nas fases sub G0/G1 e G2/M. As células HN12 shCTRL tenderam a aumentar a porcentagem em sub G0/G1 com o aumento da dose de radiação. Já as células HN12 shSET não tiveram essa tendência e mantiveram a porcentagem abaixo das células controle em todas as doses (Figura 19B). Ainda, comparando-se a HN12 com e sem redução da SET, houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre a porcentagem de células em sub G0/G1 apenas na dose de radiação de 6 Gy (Figura 19B).

O gráfico C mostrou que as células HN12 shSET apresentaram maior porcentagem em G2/M do que a HN12 shCTRL em todas as doses de radiação. Essa diferença de porcentagem foi maior na dose de 4 Gy (HN12 shCTRL: $16,62\% \pm 1,58$ vs HN12 shSET: $26,06\% \pm 3,31$), porém não houve diferença estatística significativa. Os dados obtidos sugerem que nas células HN12 shSET as células apresentam uma menor perda de viabilidade quando irradiadas (menor % em sub G0/G1) em associação com uma maior parada em G2/M, reforçando a hipótese de maior eficiência no sistema de reparo de DSB.

Figura 19. A redução da SET alterou o perfil do ciclo celular nas células HN12 irradiadas com doses crescentes de radiação. (A) Distribuição geral nas fases do ciclo celular (sub G0/G1, G1, S, G2/M e >4n) das células HN12 shCTRL e shSET após 48 horas da IR. (B) População de células HN12 shCTRL e shSET em sub G0/G1 (células mortas). (C) População de células HN12 shCTRL e shSET em G2/M. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. As colunas representam a média $\pm$ erro padrão da média. ** $p < 0,01$ comparado ao controle (0 Gy), * $p < 0,05$ comparado ao HN12 shCTRL 6 Gy (Two-way ANOVA, Bonferroni post test).

4.5.3 Análise de proteínas envolvidas em reparo de DNA, ciclo celular, apoptose e autofagia após IR das células HN12 shCTRL e shSET

4.5.3.1 Resposta a danos de DSB após 1 e 6 horas da IR em HN12 shSET

Os níveis das proteínas MLH1 (proteína de reparo *mismatch* e de DSB), p21 (proteína relacionada à parada do ciclo celular), ATM (proteína de reparo de DSB), p-ATM (ATM fosforilada ativa) e PARP (clivagem indica sinalização apoptótica) foram analisadas por WB nas células com e sem redução da SET após 1 e 6 horas da IR.

Comparando-se a HN12 shCTRL com a HN12 shSET, a proteína de reparo MLH1 total permaneceu com níveis similares após 1 e 6 horas da IR com diferentes doses (2, 4 e 6 Gy) (Figura 20A e B). Considerando a densitometria do MLH1 normalizado pelo GAPDH, a

maior diferença entre o nível proteico de MLH1 ocorreu após 6 horas da IR com 2 Gy, sendo que a HN12 shSET apresentou menor quantidade em relação ao shCTRL (densitometria: HN12 shCTRL: $1,03 \pm 0,34$ u.a. vs HN12 shSET: $0,779 \pm 0,136$ u.a. - unidade arbitrária) (Figura 20B).

A análise do nível proteico de p21 mostrou que a HN12 shSET na ausência de IR apresenta maior nível dessa proteína em relação a HN12 shCTRL (densitometria: HN12 shCTRL: $0,68 \pm 0,32$ u.a. vs HN12 shSET: $1,13 \pm 0,41$ u.a.) (Figura 20A e C). Após 1h da IR com as doses 2, 4 e 6 Gy, observamos que a diferença que ocorre em 0 Gy tende a diminuir e assim, os níveis de p21 mantem-se similares entre shSET e shCTRL (Figura 20C). Após 6 horas da IR, os níveis de p21 na dose de 2 Gy apresentaram o mesmo padrão encontrado com 1 hora após a IR; enquanto os níveis de p21 na dose de 4 e 6 Gy voltaram a apresentar diferença entre shSET e shCTRL (Figura 20A e C). Dessa forma, foi observada maior quantidade proteica de p21 nas células HN12 shSET nas doses de 4 e 6 Gy após 6 horas da IR e essa diferença mostrou-se mais evidente nas células submetidas a 4 Gy (densitometria: HN12 shCTRL: $0,424 \pm 0,02$ u.a. vs HN12 shSET: $0,92 \pm 0,13$ u.a.) (Figura 20A e C). A expressão da proteína p21 está relacionada à parada do ciclo celular (*checkpoint* em G1/S e em G2/M).

Figura 20. Níveis das proteínas MLH1, p21 e SET em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação. (A) WB dos lisados proteicos (30 µg) da HN12 após 1 e 6 horas da IR, utilizando anticorpos anti-MLH1, anti-p21, anti-SET e anti-GAPDH. A proteína GAPDH foi utilizada para a normalização. (B) Análise semiquantitativa por densitometria do MLH1 em relação ao constitutivo GAPDH. (C) Densitometria da proteína p21 em relação ao GAPDH. A análise da densidade das bandas foi realizada no *software ImageJ 1.47t*. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média. Imagens representativas de dois experimentos independentes. u.a.: unidade arbitrária.

Quanto ao nível proteico de p-ATM, foi observado que após 1 hora da IR com 2, 4 e 6 Gy houve o aumento global de p-ATM tanto na HN12 shCTRL quanto na shSET (Figura 21B). Nas doses de 4 e 6 Gy após 1 hora as células com o silenciamento da SET apresentaram nível maior de p-ATM em relação ao respectivo controle (densitometria 4 Gy: HN12 shCTRL: $4,54 \pm 0,38$ u.a. vs HN12 shSET: $5,23 \pm 0,92$ u.a.; densitometria 6 Gy: HN12 shCTRL: $3,00 \pm 0,22$ u.a. vs HN12 shSET: $4,45 \pm 1,42$ u.a; Figura 21A e B). Após 6 horas, ocorreu diferença evidente nos níveis de p-ATM entre shCTRL e shSET na condição de 4 Gy, havendo maior quantidade de ATM ativa nas células com a redução da SET (densitometria 4 Gy: HN12 shCTRL: $1,99 \pm 0,40$ u.a. vs HN12 shSET: $2,90 \pm 0,57$ u.a; Figura 21A e C).

Os níveis ATM total variaram em todas as condições de IR analisadas e não apresentaram um padrão de aumento ou diminuição relacionado diretamente com o nível de p-ATM em cada célula e dose (Figura 21D e E). Como apresentado em resultados anteriores,

na ausência de radiação (0 Gy) as células HN12 com a redução da SET apresentaram maior nível proteico de p-ATM e ATM total comparado ao controle (Figura 21).

Com relação à marcação de PARP, observou-se que após 6 horas da IR há pouca clivagem inicial dessa proteína, sendo que na HN12 shSET ocorre mais clivagem comparada a HN12shCTRL em todas as doses de IR. A clivagem de PARP-1 é um marcador da sinalização apoptótica dependente de caspase (Soldani e Scovassi, 2002).

Figura 21. Níveis das proteínas p-ATM, ATM e PARP em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação. (A) WB dos lisados proteicos (30 µg) das células HN12 shCTRL e HN12 shSET após 1 e 6 horas da IR, utilizando anti-p-ATM, anti-ATM total, anti-PARP e anti-Calnexina. A proteína Calnexina foi utilizada para a normalização. (B, C) Análise semiquantitativa por densitometria do p-ATM em relação ao constitutivo Calnexina após 1 e 6 horas da IR. (D, E) Densitometria da proteína ATM total em relação à Calnexina após 1 e 6 horas da IR. A análise da densidade das bandas foi realizada no *software ImageJ 1.47t*. As barras representam a média ± erro padrão da média. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

As principais alterações evidenciadas na HN12 shSET foram o maior nível de ATM ativa após 1h (em 4 e 6 Gy) e 6h (em 4 Gy) da IR e também a maior quantidade de p21 após 6 horas (em 4 e 6 Gy) da IR. O que reforça a hipótese de uma melhor resposta a danos de DSB nas células com redução de SET, em associação com a ação de p21 no controle do ciclo celular (parada em G2/M).

4.5.3.2 Resposta a danos de DSB após 24 horas da IR em HN12 shSET

As células HN12 shCTRL e HN12 shSET irradiadas foram analisadas quanto a clivagem e níveis de proteínas envolvidas em apoptose (caspase-3 e -8, PARP, survivina e XIAP), ciclo celular (p21) e autofagia (LC3B e p62) após 24 horas da IR.

Com relação às proteínas apoptóticas na HN12 shCTRL e shSET, não ocorreu clivagem da caspase-3, caspase-8 e PARP em nenhuma das condições de IR e as proteínas inibidoras apoptóticas (XIAP e Survivina) não apresentaram alteração (Figura 22A, B e C). A clivagem da caspase-3 em 17 e 19 kDa, da caspase-8 em 43 e 18 kDa e de PARP em 89 kDa indicam a sinalização para apoptose, ou seja, após 24h da IR as células não apresentaram essa sinalização. Apesar de não apresentar clivagem, o nível proteico de PARP total nas células com a redução da SET apresentou-se baixo em relação ao controle na ausência de IR e em todas as doses de radiação.

Figura 22. Análise das proteínas apoptóticas XIAP (inibidor de apoptose), Survivina (inibidor de apoptose), Caspase-3, Caspase-8 e PARP em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de IR. WB dos lisados proteicos (10 µg) da HN12 após 24 horas da IR, utilizando anticorpos anti-XIAP, anti-Survivina e anti-Caspase-3 (A), anti-caspase-8 (B) e anti-PARP (C). A proteína β-actina e GAPDH são os controles endógenos. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

De acordo com a quantificação por densitometria, a proteína p21 apresentou-se aumentada na HN12 shSET nas doses de 2 e 4 Gy em relação aos respectivos controles (shCTRL 2 e 4 Gy) e à HN12 shSET 0 Gy (Figura 23A e B). Assim, pode-se sugerir que as células HN12 com a redução da SET e maiores níveis de p21 apresentam a parada do ciclo celular de forma mais acentuada após a IR (2 e 4 Gy).

Figura 23. Análise da proteína do ciclo celular p21 em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação. (A) WB dos lisados proteicos (10 µg) da HN12 após 24 horas da IR, utilizando anticorpo anti-p21. A proteína GAPDH foi utilizada para a normalização. (B) Análise semiquantitativa por densitometria do p21 em relação ao constitutivo GAPDH. A análise da densidade das bandas foi realizada no *software ImageJ 1.47t*. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média. Imagens representativas de dois experimentos independentes. u.a.: unidade arbitrária.

Quanto à proteína autofágica LC3B, a razão da LC3B-II (lipidada) pelo LC3B-I demonstrou que a HN12 shSET apresentou maior quantidade de LC3B lipidada em relação ao shCTRL na condição sem IR e nas doses de radiação 4 e 6 Gy (Figura 24A e B). Nas doses de 4 e 6 Gy houve diminuição (cerca de 40%) da razão de LC3B-II/I na HN12 shCTRL em relação ao controle 0 Gy. Essa diminuição reflete a maior diferença de LC3B-II/I entre shCTRL e shSET nas doses de 4 e 6 Gy (Densitometria 4 Gy - HN12 shCTRL: $0,61 \pm 0,02$ u.a. vs HN12 shSET: $1,02 \pm 0,34$ u.a.; 6 Gy - HN12 shCTRL: $0,57 \pm 0,24$ u.a. vs HN12 shSET: $1,00 \pm 0,12$ u.a.). Na condição de 2 Gy, a razão de LC3B-II/I na HN12 shCTRL foi similar a HN12 shSET (Figura 24C).

A proteína p62 apresentou menor nível na HN12 shSET comparada a shCTRL nas condições sem IR (diferença de aproximadamente 10%) e na dose de 6 Gy (diferença de aproximadamente 30%) (Figura 24B eD). A maior quantidade de LC3B lipidado em relação ao LC3B-I e a diminuição (degradação) de p62 são indícios da ocorrência do fluxo autofágico (Komatsu e Ichimura, 2010). Assim, pode-se sugerir que o fluxo autofágico na HN12 shSET foi maior que na shCTRL nas condições sem IR e na dose de 4 e 6 Gy, sendo que nessa última condição a diferença entre as células com e sem o silenciamento da SET foi mais evidente.

Figura 24. Análise das proteínas autofágicas LC3B e p62 em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a diferentes doses de radiação. (A, B) WB dos lisados proteicos (10 µg) da HN12 após 24 horas da IR, utilizando anticorpos anti-LC3B e anti-p62, respectivamente. A proteína GAPDH foi utilizada para a normalização. (C) Densitometria da proteína LC3B-II (lipidada) em relação à LC3B-I. (D) Densitometria do p62 em relação ao constitutivo GAPDH. A análise da densidade das bandas foi realizada no *software ImageJ 1.47t*. As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média. Imagens representativas de dois experimentos independentes. u.a.: unidade arbitrária.

4.5.3.3 Resposta a danos de DSB após 48 horas da IR em HN12 shSET

As células HN12 shCTRL e HN12 shSET irradiadas foram analisadas por WB quanto à clivagem e níveis de proteínas apoptóticas caspase-8 e PARP após 48 horas da IR. Foi observada elevada intensidade de clivagem da caspase-8 (em 43 kDa) e PARP (em 89 kDa) na HN12 shCTRL nas doses de 4 e 6 Gy; enquanto as células HN12 shSET não apresentaram clivagem evidente nas mesmas condições de IR (Figura 25A e B). O aumento das clivagens da caspase-8 e PARP na HN12 shCTRL indica a sinalização para a apoptose após 48 horas da IR. Pode-se sugerir que com a redução da SET houve a proteção das células da morte celular programada após IR.

Assim como observado em 24 horas após IR, o nível proteico de PARP total nas células com o silenciamento da SET apresentou-se menor em relação ao controle em todas as condições (0, 2, 4 e 6 Gy) após 48 horas da IR (exposição 40 segundos; Figura 25B).

Figura 25. Análise das proteínas apoptóticas Caspase-8 e PARP em células HN12 shCTRL e shSET submetidas a crescentes doses de radiação. (A, B) WB dos lisados proteicos (30 µg) da HN12 após 48 horas da IR, utilizando anticorpos anti-Caspase 8 e anti-PARP, respectivamente. A proteína GAPDH é o controle endógeno. Imagens representativas de dois experimentos independentes.

Discussão

5 Discussão

A proteína SET está associada com muitos processos celulares, como o controle do ciclo celular (Esteve *et al.*, 2003), apoptose (Madeira *et al.*, 2005), migração (Ten Klooster *et al.*, 2007), reparo do dano de DNA (Almeida *et al.*, 2012), resposta ao estress oxidativo (Leopoldino, Squarize, *et al.*, 2012a), regulação epigenética (Seo *et al.*, 2001; Cervoni *et al.*, 2002; Kim, Kim, *et al.*, 2012) e remodelamento da cromatina (Leung *et al.*, 2011). Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou o acúmulo da proteína SET em tumores de CECCP (Leopoldino, Squarize, *et al.*, 2012a) e seu papel na progressão desse tipo de carcinoma (Sobral *et al.*, 2014). No presente trabalho, buscamos estudar os efeitos da redução da SET na integridade e estabilidade genômica por ação no controle epigenético e no reparo do DNA.

5.1 SET regula a metilação e expressão do miR-9

Nosso estudo revelou a reversão parcial da hipermetilação dos *loci* *miR-9-1* e *miR-9-3*, que dão origem ao miR-9 maduro, na célula metastática HN12 com a redução da proteína SET *in vitro* e do *locus* *miR-9-1* *in vivo*. Embora o papel da SET/TAF-I β na regulação de acetilação, modificação de histonas e metilação já tenha sido sugerido, esta é a primeira evidência da ação da SET como regulador de metilação dos *loci* do miR-9. A SET foi descrita como subunidade do complexo inibidor de histona acetiltransferase (INHAT) que ao se ligar às histonas impede a acetilação das mesmas pelas acetiltransferases (EP300/CREBBP e PCAF), causando repressão transcricional e o remodelamento da cromatina para um arranjo mais fechado (Seo *et al.*, 2001; Kutney *et al.*, 2004). Nesse sentido, a SET é recrutada para promotores de genes-alvo, como *ATF3* (fator de ativação de transcrição 3), pelo reconhecimento das histonas H3 metiladas (H3K27me1/2/3), que foram modificadas pelo complexo repressor Polycomb II (PRC2). A grande afinidade da SET (domínio INHAT) pelas H3K27me1/2/3 impede a acetilação dessas regiões e dessa forma, a SET juntamente com PRC2 induzem a repressão transcricional dessas regiões (Kim, Kim, *et al.*, 2012). De acordo com a função de SET como inibidora de acetilação, foi demonstrado que a presença de SET/TAF-I β (INHAT) também inibe a desmetilação ativa de regiões de DNA metiladas, impedindo a ligação das enzimas desmetilases àquelas regiões da cromatina e resultando em um fenótipo de DNA hipermetilado e repressão transcricional (Cervoni *et al.*, 2002). Os dados obtidos no presente trabalho mostram que o nível da SET na célula tem efeito na regulação da metilação de DNA nos promotores dos *loci* do miR-9. Em associação com a redução de SET

houve aumento do miR-9 nas células metastáticas HN12. Porém, mais estudos serão necessários para corroborar se há ligação direta da SET com os promotores do miR-9 bem como sua ação na regulação de expressão de outros miRNAs.

Em contraposição à HN12, na linhagem Cal27 não ocorreu alteração qualitativa do padrão de metilação com a redução da SET. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que a Cal27 possui somente o *miR-9-1* totalmente hipermetilado enquanto a HN12 possui hipermetilação total dos dois *loci miR-9-1* e *miR-9-3*. Isto sugere que a linhagem Cal27 pode ter expressão do miR-9 enquanto a HN12 (metastática) não, e que na HN12 o nível da SET contribui para a hipermetilação do miR-9. Assim, propomos que há relação da SET com o controle epigenético do miR-9 e o nível de expressão encontrado em cada tipo de tumor.

Estudos anteriores envolvendo o miR-9 em CECCP mostraram a ocorrência predominante de hipermetilação das regiões promotoras *miR-9-1*, *miR-9-2* e *miR-9-3* e reduzido nível desse miR em linhagens celulares e tumores de CECCP (Lujambio *et al.*, 2008; Minor *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014). Lujambio *et al.* (2008) mostraram que a presença de hipermetilação das ilhas CpG dos miR-34b/c, miR-148 e miR-9 em diversos tipos de tumores primários, inclusive CECCP, está significativamente associado com a presença de metástase linfonodal. Isso pode explicar o perfil de metilação do miR-9 diferente entre a Cal27 (derivada de adenocarcinoma não metastático) e a HN12 (carcinoma oral metastático), sendo que na linhagem HN12 ocorreu hipermetilação total em ambos *loci* do miR-9 e na Cal27 ocorreu hipermetilação total do miR-9-1 e hipermetilação parcial do miR-9-3 (com alelos metilado e não metilado). Portanto, esses estudos em CECCP demonstraram que a hipermetilação do miR-9 e a perda de sua ação como supressor tumoral através da atuação direta na degradação e/ou inibição de tradução de mRNAs-alvo, como o oncogene CXCR4 (relacionado ao sistema imune) em carcinoma oral (Yu *et al.*, 2013) e nasofaríngeal (Lu *et al.*, 2014), é um dos fatores que contribuem para a progressão tumoral e formação de metástase.

O miR-9 têm sido descrito tanto como oncogene quanto supressor tumoral, dependendo do tipo de câncer. Com a reversão da hipermetilação na HN12 shSET e aumento da expressão do miR-9, os mRNAs-alvo (oncogenes ou supressores tumorais) desse miR podem se tornar pouco expressos. Alguns mRNAs-alvo do miR-9 descritos em diversos tipos de câncer incluem os oncogenes, *NFkB* (Wan *et al.*, 2010), *CXCR4* (Yu *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2014), *CDX2* (Rotkrue *et al.*, 2011) e os supressores tumorais *FOXO1* (Myatt *et al.*, 2010) e *CDH1* - E-caderina (Ma *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Em câncer de mama foi revelada a presença de superexpressão do miR-9 resultante da ativação transcricional pelas oncoproteínas da família MYC em contraposição a hipermetilação e diminuição do miR-9 em

CECCP e outros tipos câncer (Sun *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010). Estudos revelaram que a superexpressão desse miR resulta na supressão da expressão de E-caderina e consequente indução da transição epitélio-mesenquimal (EMT) caracterizada pela redução de marcadores epiteliais (como E-caderina), aumento de marcadores mesenquimais (como vimentina), aumento de mobilidade celular, invasão, migração e consequente progressão tumoral (Ma *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013). Em concordância, estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou *in vitro* e *in vivo* (tumores xenoenxerto) que as células HN12 com a redução estável da SET apresentam fenótipo mesenquimal-like (com a redução de E-caderina e pancitoqueratina acompanhado do aumento de vimentina) e aumento de invasão e migração (Sobral *et al.*, 2014). Assim, o aumento do nível de miR-9 com a diminuição da SET pode ter contribuído para o fenótipo mesenquimal-like (mais agressivo) adquirido pela HN12 shSET.

O miR-9* anti-sense também foi analisado no presente trabalho e observamos aumento do seu nível principalmente nos tumores xenoenxerto da HN12 shSET. O miR-9* foi descrito como abundante em populações de células-tronco tumorais de linhagens de glioblastoma (Schraivogel *et al.*, 2011) e carcinoma hepatocelular (Schraivogel *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2013), estando envolvida na inibição de diferenciação e manutenção da capacidade de autorenovação (proliferação). Neste sentido, pode-se especular que a linhagem HN12 shSET tem uma maior subpopulação de células com fenótipo de célula-tronco tumoral do que a HN12 shCTRL. A futura análise da ALDH1, um marcador de célula-tronco tumoral, nesta linhagem poderá elucidar esta questão (Clay *et al.*, 2010). O ensaio clonogênico realizado no presente trabalho mostrou o aumento na capacidade de formação de colônias e proliferação em baixa densidade das células HN12 com a redução da SET, o que está de acordo com o potencial mais agressivo descrito por Sobral *et al.* (2014) e com a maior capacidade de autorenovação.

O presente trabalho mostra pela primeira vez o envolvimento da proteína SET na regulação transcricional do miR-9 com potencial impacto na progressão tumoral. Em concordância com este resultado, trabalho prévio do grupo identificou também uma relação inversa entre os níveis da proteína SET e de diversos miRNAs descritos como alterados em diferentes tipos de câncer (Sousa, 2013, artigo em preparação)

5.2 A SET tem papel no reparo de DNA do tipo *mismatch* e de DSB

Primeiramente, a ação da SET sobre o sistema de reparo *mismatch* foi avaliado por meio da análise de MSI. Nossos resultados demonstraram que há alteração do perfil alélico

dos microssatélites analisados com a redução da SET na HN12 *in vitro* e *in vivo*, enquanto na Cal27 não foi observada variação. A diferença entre as linhagens, HN12 (carcinoma oral metastático) e Cal27 (adenocarcinoma oral não metastático) pode ser devido ao tipo de tumor e a característica metastática. A MSI ocorre devido à diminuição (hipermetilação) e perda (mutação) dos genes de reparo *mismatch*, como o MLH1, PMS2, MSH6, MSH2, etc (Imai e Yamamoto, 2008). Analisamos o nível de MLH1 *in vitro* e encontramos o aumento dessa proteína no núcleo na CAL27 e HN12 com a redução da SET, o que levaria a pensar em maior ação no reparo do tipo *mismatch*. Entretanto, os resultados da análise de 5 microssatélites mostram perfis diferentes entre as linhagens HN12 shSET e HN12 shCTRL, o que indica MSI. O aumento de MSI na HN12 com a redução da SET sugere a ação dessa proteína no reparo do tipo *mismatch* e o aumento da instabilidade genômica (mutações). Outras proteínas de reparo do tipo *mismatch* devem ser analisadas a fim de identificar o mecanismo relacionado à MSI com a redução da SET. Assim, nesse trabalho revelamos de forma inédita o envolvimento da proteína SET no reparo tipo *mismatch* em CECCP.

Adicionalmente, foi avaliado o papel da SET no reparo de DSBs nas linhagens de CECCP. A radiação ionizante utilizada na radioterapia em CECCP promove danos no DNA (DSB) que levam a apoptose das células tumorais. Uma maneira de evitar a morte celular é a ativação da parada do ciclo celular associada ao reparo dos danos de DNA. Durante o *checkpoint* e DDR, há o recrutamento e ativação de uma cascata de proteínas ao sítio do dano, como a ATM, γ H2AX, BRCA1, BRCA2, MLH1 que são requeridas para o reparo eficiente do DNA e sobrevivência da célula (Ting e Lee, 2004; Kavanagh *et al.*, 2013). Em células de câncer, a eficiência da atividade de reparo é considerada uma das principais razões para a radioresistência (Madhusudan e Middleton, 2005). Nesse sentido, nossos resultados mostram que após a IR a linhagem metastática HN12 com a redução da SET revelou maior ativação de ATM (p-ATM) e nível elevado de p21, o que concorda com o aumento do checkpoint em G2/M. Os resultados após a IR seguem o perfil encontrado nas células HN12 shSET não irradiadas, sendo que estas apresentaram maior nível e recrutamento nuclear de proteínas de reparo, ATM total, p-ATM, BRCA1, MLH1 e consequentemente, menor nível de danos no DNA pelo ensaio cometa em relação ao shCTRL. Esses resultados sugerem a diminuição da instabilidade genômica (quebras de DNA) com a redução da SET, ao contrário do observado na MSI. Corroborando nossos resultados, Almeida *et al.* demonstraram o papel da SET na DDR induzida por cisplatina, revelando uma relação negativa entre superexpressão da SET e o recrutamento de BRCA2 e assim, o aumento da SET induz a inibição de resposta ao dano mediado por BRCA2. Além disso, o estudo mostrou que o silenciamento da SET (siRNA) em linhagem de carcinoma oral não metastático (HN13) estimula o aumento dos níveis de

mRNA de ATM e BRCA1 (Almeida *et al.*, 2012). Assim, pode-se sugerir que o acúmulo de SET em CECCP inibe ativação e recrutamento de proteínas ligadas a DDR (reparo de DSB) levando ao potencial acúmulo de alterações genômicas essenciais para o desenvolvimento e progressão tumoral.

Considerando o papel da SET na regulação epigenética (inibição de acetilação e de desmetilação, descritas anteriormente), o acúmulo de SET pode induzir a repressão transcricional (silenciamento gênico) e o remodelamento da cromatina (Cervoni *et al.*, 2002). Nesse contexto, o aumento de proteínas de reparo, como a ATM e BRCA1, na HN12 com a redução da SET pode estar relacionada a regulação epigenética transcricional e ao remodelamento da cromatina. Além disso, o aumento de acetilação de histonas com a redução da SET (Seo *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2012) pode induzir a uma cromatina mais aberta e acessível, permitindo que os sítios de danos no DNA fiquem mais expostos facilitando a ação das proteínas de reparo (Luijsterburg e Van Attikum, 2011).

Com relação à regulação do ciclo celular, a SET pode interagir com p21^{Cip1} (proteína inidora de ciclina dependente de quinase - CDK) e reverter o seu efeito inibitório na atividade da ciclina E-CDK2 envolvida na transição G1/S (Estanyol *et al.*, 1999). Além de atuar na inibição da atividade da ciclinaB/CDK1 envolvida na transição G2/S *in vitro* e *in vivo* (Canela *et al.*, 2003). Nesse estudo foi descrito que a SET interage com p21^{Cip1} e cooperam na inibição da ciclinaB/CDK1 e assim, a superexpressão da SET *in vitro* bloqueia o ciclo celular em G2/M. No presente trabalho foi encontrado o aumento significativo do nível de p21 na HN12 com a redução da SET na presença de IR. Podemos propor que a partir da redução no nível de SET, a interação e formação do complexo SET-p21 estaria diminuído e, portanto, o efeito inibitório de p21 sobre a ciclinaE/CDK2 (sinalização de *checkpoints* em G1/G2) seria maior do que na HN12 com acúmulo de SET (shCTRL). Já a inibição da ciclinaB/CDK1 estaria diminuída com a redução da SET e assim, a diminuição do checkpoint em G2/M seria esperada. Porém, não foi observada alteração no checkpoint em G1/S e ao contrário do esperado, o acúmulo de células em G2/M foi maior na HN12 com redução de SET.

Assim, sugere-se que a regulação de p21 e do ciclo celular pode estar associado a uma via indireta de sinalização independente da ligação direta com a SET. A via de ativação transcricional do p21 é dependente de ATM e p53 na DDR. Em resposta a DSB, ocorre a ativação de ATM e por consequência a estabilização e ativação de p53. O p53 nuclear induz a ativação transcricional de proteínas efetoras na DDR, como o p21 que sinaliza a parada do ciclo celular em G1 (inibição da ciclinaE/CDK2) ou G2 (inibição de CDK1) (Taylor e Stark, 2001; Iliakis *et al.*, 2003; Lukas, Lukas e Bartek, 2004). Além disso, a indução do checkpoint em

G2/M pela ativação de ATM também pode ocorrer por via independente de p53 e de p21 (Deckbar, Jeggo e Löbrich, 2011). Nesse sentido, a maior ativação de ATM encontrada nas células com a redução da SET pode estar envolvida no aumento da transcrição de p21 e sinalizar maior parada em G2/M quando comparado ao controle (shCTRL - com acúmulo de SET).

Corroborando nossos achados, Kim *et al.* (2012) demonstraram *in vitro* nas linhagens HEK293, de osteosarcoma humano (U2OS) e de carcinoma de pulmão humano (H1299) que a SET (domínio INHAT) interage e inibe a atividade de p53 ao impedir que sua acetilação ocorra em resposta ao dano no DNA (tratamento doxorubicina). A acetilação da proteína p53 ocorre em diversos resíduos de lisina pelas acetiltransferases e a inibição dessa modificação pós-traducional pelo nível elevado de SET afeta sua atividade como fator de transcrição, ocorrendo a repressão transcricional de genes-alvo, como o *p21* (regula *checkpoints* do ciclo celular) e *PUMA* (pró-apotótico) (Kim, Lee, *et al.*, 2012). De acordo com esse estudo, seria esperado que a redução da SET na HN12 levaria a menor inibição da acetilação de p53 e consequente aumento de sua ação na transcrição de genes-alvo, tal como o p21.

Sabe-se que a SET é um potente inibidor da fosfatase PP2A (Li e Damuni, 1998) e que a fosforilação e ativação de ATM é regulada pela PP2A (Goodarzi *et al.*, 2004). Goodarzi *et al.* demonstraram que a inibição da atividade fosfatase da PP2A pelo ácido okadáico induz a rápida fosforilação (ativação) de ATM na serina 1981. Com isso, revelaram a interação de ATM com as subunidades estrutural e catalítica de PP2A *in vivo* e mostraram que a indução de dano no DNA pela exposição à radiação ionizante causa a perda da interação entre ATM e PP2A dependente da ativação de ATM. A perda da interação ocorre concomitante com a perda da atividade fosfatase de PP2A. Nossos resultados demonstraram relação negativa entre quantidade de SET (inibidor de PP2A) e p-ATM por WB e imunofluorescência, portanto pode-se sugerir que essa regulação na HN12 shSET seja independente de PP2A.

Nas células com acúmulo de SET (HN12 shCTRL) há menor eficiência de reparo de danos de DNA, o que leva a ativação da sinalização apoptótica nos *checkpoints* após a IR. Apesar de não haver diferença entre as curvas de sobrevivência (ensaio clonogênico por 12 dias) da HN12 shCTRL e da HN12 shSET após as crescentes doses de radiação, as clivagens de PARP e caspase-8 após 48 horas ocorreram de forma mais pronunciada na HN12 shCTRL do que na HN12 shSET. Esse resultado condiz com a maior porcentagem de células HN12 shCTRL em subG0/G1 (DNA fragmentado – células mortas). Almeida *et al.* (2012) também demonstraram a maior perda de viabilidade celular na linhagem de CEO (HN13) com acúmulo de SET do que na HN13 com redução da SET (siRNA) em resposta ao tratamento

com cisplatina. Portanto, propomos que o acúmulo da SET nas células de CEO inibe ou reduz a eficiência do sistema de reparo de DNA DSB em resposta a terapias que utilizam radiação ionizante e cisplatina, o que pode sensibilizar as células para a morte celular programada via apoptose.

De acordo com nossos resultados, Kim *et al.* (2014) demonstraram a interação da SET/INHAT com a proteína não-histona, Ku70/80, que atua no reparo de DSB tipo NHEJ. Nas células HEK293T com superexpressão de SET expostas a estímulos genotóxicos (radiação UV e etoposídeo), a SET/INHAT inibe a acetilação dos resíduos de lisina da Ku70/80, impedindo seu recrutamento ao sítio do dano de DNA. E assim, a SET desencadeia a inibição do reparo tipo NHEJ e a diminuição da viabilidade celular em resposta a DSB (Kim *et al.*, 2014). Esse estudo demonstrou que a desregulação da SET (acúmulo) diminui o reparo DSB e sensibiliza as células aos estímulos genotóxicos, assim como mostram os resultados da HN12 shCTRL, que apresenta acúmulo da SET, comparados a HN12 shSET nas primeiras 48 horas da IR.

Segundo trabalho do nosso grupo, a redução da SET na HN12 induziu a transição epitélio-mesenquimal (EMT), havendo a redução de E-caderina e pan-citoqueratina acompanhado do aumento de vimentina, redução da proliferação pelo ensaio de BrdU e aumento de invasão e migração *in vivo* e *in vitro* (Sobral *et al.*, 2014). A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é um processo no qual as células epiteliais adquirem um fenótipo mesenquimal e assim, perdem a polaridade apical-basal e ganham mobilidade e invasividade (Shook e Keller, 2003; Thiery, 2003; Hay, 2005; Peinado, Olmeda e Cano, 2007; Gregory *et al.*, 2008), além de se tornarem mais resistentes a apoptose (Janda *et al.*, 2002; Kalluri e Neilson, 2003). Assim, o fenótipo mesenquimal adquirido pelas células HN12 shSET pode estar ligado a sua maior resistência à apoptose, sendo que essas células apresentaram maior radioresistência em relação à HN12 shCTRL nas primeiras 48 hs.

Embora as células HN12 shSET após 48 horas da IR tenham apresentado maior ativação do *checkpoint* em G2/M (maior % em G2/M e aumento de p21) juntamente com maior sobrevivência celular (menor % em G0/G1 e menos apoptose) do que a HN12 shCTRL, não houve a manutenção dessa diferença inicial a longo prazo. Segundo o resultado do ensaio clonogênico que avaliou a capacidade de sobrevivência após 12 dias, ambas as linhagens HN12 shCTRL e shSET apresentaram perda de fração sobrevivente com o aumento da dose de IR e as curvas de sobrevivência não foram diferentes estatisticamente. Cabe ressaltar que apenas com a dose de 4 Gy houve uma tendência de maior sensibilidade na HN12 shSET. Estudo prévio demonstrou que o TSA, um agente que causa acetilação global de histonas, age

como radiosensibilizante em linhagem de câncer de pulmão *in vitro* por estimular o checkpoint em G2/M (elevada população em G2/M e aumento de p21) e levar à indução da apoptose após 24 horas (clivagem de PARP, marcação positiva de Anexina/PI, maior atividade de caspase-3) (Zhang *et al.*, 2009). Segundo descrito, a parada do ciclo celular em G2/M estimulou a rápida ativação da apoptose devido a ineficiência do sistema de reparo e diminuição de proteínas de reparo de DSB nas células tratadas com TSA mais IR. O fato de que as células paradas em G2/M na HN12 shSET podem ativar a via apoptótica caso o reparo no *checkpoint* não seja eficiente pode explicar a similaridade das curvas de sobrevivência e a não manutenção da diferença entre shCTRL (sensibilização) e shSET (proteção) observada inicialmente. Assim, pode-se sugerir que nas células HN12 shSET a parada em G2/M foi maior e mantida por tempo superior do que na HN12 shCTRL, porém como as lesões foram irreparáveis, a morte celular foi induzida pela via de sinalização de ATM e p53 tardiamente (Lapenna e Giordano, 2009).

Além da morte celular via apoptose, observamos a ocorrência de sinalização autofágica. Porém, ao contrário da apoptose, o fluxo autofágico foi maior nas células HN12 shSET na condição sem IR e após as doses de radiação. A radiação ionizante ativa a autofagia pela via de resposta ao estresse do retículo endoplasmático que resulta no acúmulo de proteínas com defeitos na estrutura e enovelamento. A autofagia pode estar relacionada com funções contraditórias na célula uma vez que pode levar a morte ou estimular a sobrevivência celular. Esse balanço entre morte e sobrevivência depende de uma complexa interação entre as duas vias e é dependente do contexto celular específico e do perfil de oncogenes e de proteínas que regulam a apoptose (Zois e Koukourakis, 2009; Rikiishi, 2012). Muitos estudos têm indicado que a ativação da autofagia leva a resistência a radioterapia e quimioterapia, sinalizando a sobrevivência celular em resposta a citotoxicidade. E assim, a utilização de inibidores autofágicos tem sido estudada como estratégia para tratamentos anti-câncer em diversos tipos tumorais, inclusive em CECCP (Lomonaco *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2010; Chaachouay *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011). Por outro lado, a morte celular induzida por autofagia ocorre como uma via alternativa em células com deficiência da via apoptótica e assim, a utilização de indutores autofágicos nos tipos tumorais com apoptose deficiente permite a sensibilização a agentes genotóxicos, como a radiação ionizante (Shimizu *et al.*, 2004). Interligando os diversos estudos relacionados ao papel controverso da autofagia com os nossos resultados, sugerimos que a ocorrência de fluxo autofágico de forma mais acentuada nas células HN12 com a redução da SET estimulou um mecanismo protetor de sobrevivência celular, visto que essas células foram mais resistentes à morte celular por

apoptose (menos células em sub G0/G1 e menor clivagem de PARP e caspase-8) quando tratadas com a radiação ionizante.

Adicionalmente, foi descrito o papel de ATM na regulação da autofagia induzida por radiação ionizante (Liang *et al.*, 2013). Liang *et al.* demonstraram que ativação de ATM promove o fluxo autofágico através das vias de sinalização MAPK, mTOR e dos complexos Beclin/PI3K, contribuindo para o efeito radioprotetor da ativação de ATM. Dessa forma, o maior fluxo autofágico na HN12 shSET pode estar ligado ao aumento da ativação de ATM encontrado nessas células.

Por fim, diversos estudos tem demonstrado a regulação de ATM e do ciclo celular como potencial sensibilizante para a terapia com radiação ionizante (*low-LET* ou *high-LET*) (Krueger *et al.*, 2007; Tao *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2009; Krueger *et al.*, 2010). A utilização *in vitro* e *in vivo* de inibidores do checkpoint em G2/M e de inibidores de ATM em combinação com radiação ionizante mostram aumento da radiosensibilidade (apoptose induzida por radiação), inclusive em células tumorais de CECCP (Zou *et al.*, 2008). Considerando que a ativação de ATM estimula o reparo de DSBs levando a indução do checkpoint em G2/M (Zou *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2009), nossos resultados mostraram que a redução da SET nas células HN12 promoveu aumento de ATM ativa e da parada em G2/M. E assim, as células HN12 com acúmulo de SET, menos ATM ativa e com menor porcentagem de células no checkpoint em G2/M apresentaram maior radiosensibilização.

Como perspectivas para compreender melhor os mecanismos de atuação da SET no reparo de DSB em CEO e complementar o presente estudo feito *in vitro*, seria importante o estudo da DDR induzida por IR *in vivo* e também a associação da radioterapia com quimioterápicos, como a cisplatina, ou inibidor de autofagia. A Figura 26 mostra a representação esquemática dos efeitos da redução da SET na linhagem HN12 de CEO, *in vitro* e *in vivo*, observados no presente estudo.

Figura 26. Esquema representativo dos efeitos da redução da SET na linhagem HN12 (CEO) *in vitro* e *in vivo*. A redução da SET permitiu a regulação transcricional do miR-9 através da reversão parcial da hipermetilação dos *loci* miR-9-1 e miR-9-3 *in vitro* e do *locus* miR-9-1 *in vivo* (tumores xenoinxerto). Além disso, a análise do perfil alélico de microssatélites mostrou o aumento de instabilidade (MSI) *in vitro* e *in vivo*, o que indica ação da SET no reparo do tipo *mismatch* e o aumento da instabilidade genômica (mutações) com a redução da SET. Entretanto, os resultados relacionados ao sistema de reparo de DSB sugerem que há diminuição da instabilidade genômica, visto que a redução da SET *in vitro* levou à diminuição de danos no DNA (quebras de DNA) e ao aumento dos níveis de proteínas de reparo (ATM total, ATM ativa, BRCA1, MLH1 nuclear). A redução da SET *in vitro* associada a DDR induzida por raios-X resultou em uma radioresistência inicial (nas primeiras 48 horas), havendo o aumento de ATM ativa, p21 (inibidor de CDK) e LC3B-II (fluxo autofágico), elevada população parada em G2/M, maior viabilidade celular (menor % em sub G0/G1) e menos apoptose (baixa clivagem de caspase-8 e PARP). Porém, após 12 dias da radiação, a curva de sobrevivência (ensaio clonogênico) da HN12 com a redução da SET foi semelhante a da HN12 com acúmulo de SET, o que sugere o aumento da morte celular nas células HN12 shSET. A linha tracejada indica que não é conhecido o mecanismo de regulação pela proteína SET.

Conclusão

6 Conclusão

- ✓ Com relação à regulação epigenética e expressão de miRNA, a redução da SET em CEO metastática (HN12), *in vitro* e *in vivo*, permitiu a ativação transcricional dos *loci* do miR-9 através da reversão parcial da hipermetilação de seus promotores. E o aumento de expressão do miR-9, por sua vez, pode causar consequências para o desenvolvimento e progressão tumoral.
- ✓ A alteração do perfil alélico de microsatélites encontrada em CEO metastática com a redução da SET, *in vitro* e *in vivo*, sugere a participação dessa proteína no reparo de DNA do tipo *mismatch*.
- ✓ Há uma relação direta entre a SET e as proteínas envolvidas em reparo de DNA, do tipo *mismatch* (MLH1) e de DSB (ATM, BRCA1 e MLH1), visto que a redução da SET em CEO metastática resultou no aumento da eficiência do sistema de reparo (maior ativação e recrutamento de proteínas de reparo - MLH1, BRCA1, ATM - e de ativadores do *checkpoint* - p21) com consequente redução de danos (quebras) no DNA.
- ✓ Na resposta aos danos do DNA induzidos por raios-X, a redução do nível da proteína SET em CEO metastática protegeu as células da morte celular nas primeiras horas após irradiação, porém a longo prazo esta diferença não se manteve. Este achado confirma o envolvimento da proteína SET com o reparo de DNA.

Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

AHN, J. Y. et al. Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. **Cancer Res**, v. 60, n. 21, p. 5934-6, Nov 2000. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085506> >.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 5. Artmed, 2010. 1396.

ALMEIDA, L. O. et al. SET overexpression decreases cell detoxification efficiency: ALDH2 and GSTP1 are downregulated, DDR is impaired and DNA damage accumulates. **FEBS J**, v. 279, n. 24, p. 4615-28, Dec 2012. ISSN 1742-4658. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23106910> >.

AWADA, A.; LALAMI, Y. Molecular markers, molecular-targeted therapies and taxanes: how to integrate the progress into clinical research and practice for the management of head and neck cancers. **Curr Opin Oncol**, v. 17, n. 3, p. 209-11, May 2005. ISSN 1040-8746 (Print). Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15818162 >.

BARTEK, J.; LUKAS, J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 2, p. 238-45, Apr 2007. ISSN 0955-0674. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303408> >.

BOATRIGT, K. M. et al. A unified model for apical caspase activation. **Mol Cell**, v. 11, n. 2, p. 529-41, Feb 2003. ISSN 1097-2765. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620239> >.

BOLAND, C. R. et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res**, v. 58, n. 22, p. 5248-57, Nov 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823339> >.

BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J Cell Biol**, v. 106, n. 3, p. 761-71, Mar 1988. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450098> >.

BOYLE, P.; LEVIN, B. **World cancer report**. International Agency for Research on Cancer - World Health Organization. Lyon, France, p.260. 2008

CALIN, G. A.; CROCE, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 11, p. 857-66, Nov 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17060945> >.

CANELA, N. et al. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. **J Biol Chem**, v. 278, n. 2, p. 1158-64, Jan 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407107> >.

CANMAN, C. E. et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. **Science**, v. 281, n. 5383, p. 1677-9, Sep 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9733515> >.

CARDINALI, M. et al. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **Int J Cancer**, v. 61, n. 1, p. 98-103, Mar 1995. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7705939> >.

CARLSON, S. G. et al. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. **J Am Soc Nephrol**, v. 9, n. 10, p. 1873-80, Oct 1998. ISSN 1046-6673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9773788> >.

CARNERO, A. The PKB/AKT pathway in cancer. **Curr Pharm Des**, v. 16, n. 1, p. 34-44, Jan 2010. ISSN 1873-4286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20214616> >.

CARSON, C. T. et al. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. **EMBO J**, v. 22, n. 24, p. 6610-20, Dec 2003. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657032> >.

CERVONI, N. et al. The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. **J Biol Chem**, v. 277, n. 28, p. 25026-31, Jul 2002. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11978794> >.

CHAAACHOUAY, H. et al. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. **Radiother Oncol**, v. 99, n. 3, p. 287-92, Jun 2011. ISSN 1879-0887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21722986> >.

CHAI, J. et al. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. **Nature**, v. 406, n. 6798, p. 855-62, Aug 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10972280> >.

CHAPMAN, J. R.; TAYLOR, M. R.; BOULTON, S. J. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. **Mol Cell**, v. 47, n. 4, p. 497-510, Aug 2012. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920291> >.

CHRISTMANN, M. et al. Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3-34, Nov 2003. ISSN 0300-483X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14599765> >.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. **Mol Cell**, v. 40, n. 2, p. 179-204, Oct 2010. ISSN 1097-4164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965415> >.

CLAY, M. R. et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. **Head Neck**, v. 32, n. 9, p. 1195-201, Sep 2010. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20073073> >.

COFFEE, B. Methylation-specific PCR. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 10, p. Unit 10.6, Apr 2009. ISSN 1934-8258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19360697> >.

CORTEZ, D. et al. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. **Science**, v. 286, n. 5442, p. 1162-6, Nov 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10550055> >.

CRISTÓBAL, I. et al. Overexpression of SET is a recurrent event associated with poor outcome and contributes to protein phosphatase 2A inhibition in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 97, n. 4, p. 543-50, Apr 2012. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133779> >.

DE SCHUTTER, H. et al. The clinical relevance of microsatellite alterations in head and neck squamous cell carcinoma: a critical review. **Eur J Hum Genet**, v. 15, n. 7, p. 734-41, Jul 2007. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17473833> >.

DECKBAR, D.; JEGGO, P. A.; LÖBRICH, M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 46, n. 4, p. 271-83, Aug 2011. ISSN 1549-7798. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21524151> >.

DEMOKAN, S. et al. Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. **Ann Oncol**, v. 17, n. 6, p. 995-9, Jun 2006. ISSN 0923-7534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569647> >.

DENAULT, J. B.; SALVESEN, G. S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chem Rev**, v. 102, n. 12, p. 4489-500, Dec 2002. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475198> >.

DIETMAIER, W. et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. **Cancer Res**, v. 57, n. 21, p. 4749-56, Nov 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354436> >.

DIFILIPPANTONIO, S.; NUSSENZWEIG, A. The NBS1-ATM connection revisited. **Cell Cycle**, v. 6, n. 19, p. 2366-70, Oct 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881893> >.

EL-NAGGAR, A. K. et al. Microsatellite instability in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. **Am J Pathol**, v. 148, n. 6, p. 2067-72, Jun 1996. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8669490> >.

ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 4, p. 259-69, Apr 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557279> >.

ESTANYOL, J. M. et al. The protein SET regulates the inhibitory effect of p21(Cip1) on cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 activity. **J Biol Chem**, v. 274, n. 46, p. 33161-5, Nov 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551888> >.

ESTEVE, V. et al. The structural plasticity of the C terminus of p21Cip1 is a determinant for target protein recognition. **Chembiochem**, v. 4, n. 9, p. 863-9, Sep 2003. ISSN 1439-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12964161> >.

FALCK, J. et al. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. **Nature**, v. 410, n. 6830, p. 842-7, Apr 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298456> >.

FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 12, p. 993-7, Dec 2002. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447390> >.

FORASTIERE, A. et al. Head and neck cancer. **N Engl J Med**, v. 345, n. 26, p. 1890-900, Dec 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756581> >.

FRANKEN, N. A. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nat Protoc**, v. 1, n. 5, p. 2315-9, 2006. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473> >.

GAVET, O.; PINES, J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. **Dev Cell**, v. 18, n. 4, p. 533-43, Apr 2010. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20412769> >.

GIANSANTI, V.; TORRIGLIA, A.; SCOVASSI, A. I. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". **Apoptosis**, v. 16, n. 4, p. 321-33, Apr 2011. ISSN 1573-675X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21404107> >.

GIOANNI, J. et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. **Eur J Cancer Clin Oncol**, v. 24, n. 9, p. 1445-55, Sep 1988. ISSN 0277-5379. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3181269> >.

GOODARZI, A. A. et al. Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A. **EMBO J**, v. 23, n. 22, p. 4451-61, Nov 2004. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15510216> >.

GREGORY, P. A. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 5, p. 593-601, May 2008. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18376396> >.

GUTEKUNST, M. et al. p53 hypersensitivity is the predominant mechanism of the unique responsiveness of testicular germ cell tumor (TGCT) cells to cisplatin. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19198, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532991> >.

HA, P. K. et al. Progression of microsatellite instability from premalignant lesions to tumors of the head and neck. **Int J Cancer**, v. 102, n. 6, p. 615-7, Dec 2002. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448003> >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 2011. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230> >.

HAY, E. D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. **Dev Dyn**, v. 233, n. 3, p. 706-20, Jul 2005. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937929> >.

HELLER, G. et al. Genome-wide miRNA expression profiling identifies miR-9-3 and miR-193a as targets for DNA methylation in non-small cell lung cancers. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 6, p. 1619-29, Mar 2012. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282464> >.

HOEIJMAKERS, J. H. DNA damage, aging, and cancer. **N Engl J Med**, v. 361, n. 15, p. 1475-85, Oct 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812404> >.

HU, X. et al. A microRNA expression signature for cervical cancer prognosis. **Cancer Res**, v. 70, n. 4, p. 1441-8, Feb 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124485> >.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277-88, Apr 2002. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001989> >.

ILIAKIS, G. et al. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. **Oncogene**, v. 22, n. 37, p. 5834-47, Sep 2003. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12947390> >.

IMAI, K.; YAMAMOTO, H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 4, p. 673-80, Apr 2008. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942460> >.

INCA. Revista Brasileira de Cancerologia. 47: 361-376 p. 2001.

_____. **Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: Instituto Nacional de Câncer 2011.

_____. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: Instituto Nacional de Câncer: 124 p. 2014.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 34, p. 5848-56, Dec 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19884536> >.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 461, n. 7267, p. 1071-8, Oct 2009. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19847258> >.

JANDA, E. et al. Ras and TGF[beta] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. **J Cell Biol**, v. 156, n. 2, p. 299-313, Jan 2002. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11790801> >.

JANSSENS, V.; GORIS, J.; VAN HOOFF, C. PP2A: the expected tumor suppressor. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 1, p. 34-41, Feb 2005. ISSN 0959-437X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15661531> >.

JIANG, L. et al. CAL 27 is an oral adenosquamous carcinoma cell line. **Oral Oncol**, v. 45, n. 11, p. e204-7, Nov 2009. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19631575> >.

JIRICNY, J. The multifaceted mismatch-repair system. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 7, n. 5, p. 335-46, May 2006. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16612326> >.

KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1776-84, Dec 2003. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679171> >.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 14, p. 2137-50, May 2006. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16682732> >.

KAVANAGH, J. N. et al. DNA double strand break repair: a radiation perspective. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 18, p. 2458-72, Jun 2013. ISSN 1557-7716. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311752> >.

KIM, J. S. et al. Mechanistic analysis of a DNA damage-induced, PTEN-dependent size checkpoint in human cells. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 13, p. 2756-71, Jul 2011. ISSN 1098-5549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21536651> >.

KIM, J. Y. et al. H3K27 methylation and H3S28 phosphorylation-dependent transcriptional regulation by INHAT subunit SET/TAF-I β . **FEBS Lett**, v. 586, n. 19, p. 3159-65, Sep 2012. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796192> >.

_____. Inhibition of p53 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β represses p53 activity. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. 1, p. 75-87, Jan 2012. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21911363> >.

KIM, K. B. et al. Inhibition of Ku70 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I β regulates Ku70-mediated DNA damage response. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 14, p. 2731-45, Jul 2014. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24305947> >.

KIM, W. J.; RAJASEKARAN, B.; BROWN, K. D. MLH1- and ATM-dependent MAPK signaling is activated through c-Abl in response to the alkylator N-methyl-N'-nitro-N'-

nitrosoguanidine. **J Biol Chem**, v. 282, n. 44, p. 32021-31, Nov 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804421> >.

KIM, Y. D. et al. Ethanol-induced oxidative DNA damage and CYP2E1 expression in liver tissue of Aldh2 knockout mice. **J Occup Health**, v. 49, n. 5, p. 363-9, Sep 2007. ISSN 1341-9145. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951967> >.

KODERA, Y. et al. Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. A negative correlation with nodal metastasis. **Cancer**, v. 73, n. 2, p. 259-65, Jan 1994. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8293386> >.

KOLODNER, R. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. **Genes Dev**, v. 10, n. 12, p. 1433-42, Jun 1996. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8666228> >.

KOMATSU, M.; ICHIMURA, Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. **FEBS Lett**, v. 584, n. 7, p. 1374-8, Apr 2010. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153326> >.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **J Cancer**, v. 4, n. 1, p. 66-83, 2013. ISSN 1837-9664. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23386906> >.

KOY, S. et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck**, v. 30, n. 8, p. 1105-13, Aug 2008. ISSN 1097-0347. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18615731> >.

KRUEGER, S. A. et al. Transition in survival from low-dose hyper-radiosensitivity to increased radioresistance is independent of activation of ATM Ser1981 activity. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 69, n. 4, p. 1262-71, Nov 2007. ISSN 0360-3016. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17967316> >.

_____. The effects of G2-phase enrichment and checkpoint abrogation on low-dose hyper-radiosensitivity. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 77, n. 5, p. 1509-17, Aug 2010. ISSN 1879-355X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637979> >.

KUBOTA, T. et al. Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p. 16-7, May 1997. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9140389> >.

KUTNEY, S. N. et al. A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression. **J Biol Chem**, v. 279, n. 29, p. 30850-5, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136563> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> >.

LAM, B. D.; ANTHONY, E. C.; HORDIJK, P. L. Analysis of nucleo-cytoplasmic shuttling of the proto-oncogene SET/I2PP2A. **Cytometry A**, v. 81, n. 1, p. 81-9, Jan 2012. ISSN 1552-4930. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21990161> >.

_____. Cytoplasmic targeting of the proto-oncogene SET promotes cell spreading and migration. **FEBS Lett**, v. 587, n. 2, p. 111-9, Jan 2013. ISSN 1873-3468. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23195690> >.

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 7, p. 547-66, Jul 2009. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568282> >.

LEE, J. H.; PAULL, T. T. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 551-4, Apr 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15790808> >.

LEOPOLDINO, A. M. et al. Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: cell survival or death signaling. **Mol Cell Biochem**, v. 363, n. 1-2, p. 65-74, Apr 2012. ISSN 1573-4919. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143534> >.

_____. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncol**, Jun 2012a. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068> >.

_____. SET protein accumulates in HNSCC and contributes to cell survival: Antioxidant defense, Akt phosphorylation and AVOs acidification. **Oral Oncol**, Jun 2012b. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22739068> >.

LEUNG, J. W. et al. SET nuclear oncogene associates with microcephalin/MCPH1 and regulates chromosome condensation. **J Biol Chem**, v. 286, n. 24, p. 21393-400, Jun 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515671> >.

LEUNG, S. Y. et al. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. **Cancer Res**, v. 59, n. 1, p. 159-64, Jan 1999. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892201> >.

LI, M.; DAMUNI, Z. I1PP2A and I2PP2A. Two potent protein phosphatase 2A-specific inhibitor proteins. **Methods Mol Biol**, v. 93, p. 59-66, 1998. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664527> >.

LIANG, N. et al. ATM pathway is essential for ionizing radiation-induced autophagy. **Cell Signal**, v. 25, n. 12, p. 2530-9, Dec 2013. ISSN 1873-3913. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23993957> >.

LIEBER, M. R.; WILSON, T. E. SnapShot: Nonhomologous DNA end joining (NHEJ). **Cell**, v. 142, n. 3, p. 496-496.e1, Aug 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691907> >.

LINDAHL, T.; BARNES, D. E. Repair of endogenous DNA damage. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 65, p. 127-33, 2000. ISSN 0091-7451. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12760027> >.

LINDQVIST, A. et al. Wip1 confers G2 checkpoint recovery competence by counteracting p53-dependent transcriptional repression. **EMBO J**, v. 28, n. 20, p. 3196-206, Oct 2009. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19713933> >.

LIPS, J.; KAINA, B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 4, p. 579-85, Apr 2001. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11285192> >.

LIU, M. et al. c-Myc suppressed E-cadherin through miR-9 at the post-transcriptional level. **Cell Biol Int**, v. 37, n. 3, p. 197-202, Mar 2013. ISSN 1095-8355. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23364919> >.

LIU, S. et al. MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF- κ B1-Snail1 pathway in melanoma. **J Pathol**, v. 226, n. 1, p. 61-72, Jan 2012. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131135> >.

LOMONACO, S. L. et al. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. **Int J Cancer**, v. 125, n. 3, p. 717-22, Aug 2009. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19431142> >.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 287-94, Jan 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22258607> >.

LU, J. et al. miR-9 targets CXCR4 and functions as a potential tumor suppressor in nasopharyngeal carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 35, n. 3, p. 554-63, Mar 2014. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170200> >.

LUIJSTERBURG, M. S.; VAN ATTIKUM, H. Chromatin and the DNA damage response: the cancer connection. **Mol Oncol**, v. 5, n. 4, p. 349-67, Aug 2011. ISSN 1878-0261. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21782533> >.

LUJAMBIO, A. et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 36, p. 13556-61, Sep 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18768788> >.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 997-1007, 2004 Aug-Sep 2004. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279786> >.

_____. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 10, p. 1161-9, Oct 2011. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21968989> >.

LUO, Y.; LIN, F. T.; LIN, W. C. ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 14, p. 6430-44, Jul 2004. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15226443> >.

MA, L. et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. **Nat Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 247-56, Mar 2010. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173740> >.

MADEIRA, A. et al. SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. **FASEB J**, v. 19, n. 13, p. 1905-7, Nov 2005. ISSN 1530-6860. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16162853> >.

MADHUSUDAN, S.; MIDDLETON, M. R. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 31, n. 8, p. 603-17, Dec 2005. ISSN 0305-7372. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16298073> >.

MANDAL, P. K.; BLANPAIN, C.; ROSSI, D. J. DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 3, p. 198-202, Mar 2011. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304553> >.

MATSUOKA, S.; HUANG, M.; ELLEDGE, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. **Science**, v. 282, n. 5395, p. 1893-7, Dec 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836640> >.

MCKINNON, P. J. ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia. **Annu Rev Pathol**, v. 7, p. 303-21, 2012. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035194> >.

MINOR, J. et al. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v. 48, n. 1, p. 73-8, Jan 2012. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133638> >.

MOLIN, Y.; FAYETTE, J. Current chemotherapies for recurrent/metastatic head and neck cancer. **Anticancer Drugs**, v. 22, n. 7, p. 621-5, Aug 2011. ISSN 1473-5741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21131821> >.

MOLINOLO, A. A. et al. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 324-34, Apr-May 2009. ISSN 1368-8375 (Print). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18805044 >.

MOORE, C. B. et al. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. **Methods Mol Biol**, v. 629, p. 141-58, 2010. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20387148> >.

MOYNAHAN, M. E.; JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 196-207, Mar 2010. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177395> >.

MRUK, D. D.; CHENG, C. Y. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: An inexpensive alternative to commercially available kits. **Spermatogenesis**, v. 1, n. 2, p. 121-122, 4 2011. ISSN 2156-5554. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319660> >.

MULLER, S. et al. Distinctive E-cadherin and epidermal growth factor receptor expression in metastatic and nonmetastatic head and neck squamous cell carcinoma: predictive and prognostic correlation. **Cancer**, v. 113, n. 1, p. 97-107, Jul 2008. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473353> >.

MYATT, S. S. et al. Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer. **Cancer Res**, v. 70, n. 1, p. 367-77, Jan 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028871> >.

NUNN, J. et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, v. 39, n. 2, p. 115-29, Feb 2003. ISSN 1368-8375. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12509964> >.

ODA, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1053-8, May 2000. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10807576> >.

PACKER, A. N. et al. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. **J Neurosci**, v. 28, n. 53, p. 14341-6, Dec 2008. ISSN 1529-2401. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19118166> >.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol**, v. 4, p. 49-70, 2009. ISSN 1553-4014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18729723> >.

PARK, E. J. et al. DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 23, p. 6819-27, Dec 2003. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14627815> >.

PATEL, V. et al. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: a molecular portrait of head and neck cancer progression. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 4, p. 1002-14, Feb 2008. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281532> >.

PEINADO, H.; OLMEDA, D.; CANO, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 6, p. 415-28, Jun 2007. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508028> >.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1644, n. 2-3, p. 83-94, Mar 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14996493> >.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, Jul 2000. ISSN 0267-8357. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887207> >.

PICCININ, S. et al. Microsatellite instability in squamous cell carcinomas of the head and neck related to field cancerization phenomena. **Br J Cancer**, v. 78, n. 9, p. 1147-51, Nov 1998. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9820170> >.

POPAT, S.; HUBNER, R.; HOULSTON, R. S. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 3, p. 609-18, Jan 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659508> >.

POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 301-11, 2004. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220539> >.

PULTE, D.; BRENNER, H. Changes in survival in head and neck cancers in the late 20th and early 21st century: a period analysis. **Oncologist**, v. 15, n. 9, p. 994-1001, 2010. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798198> >.

QUARESIMA, B. et al. In vitro analysis of genomic instability triggered by BRCA1 missense mutations. **Hum Mutat**, v. 27, n. 7, p. 715, Jul 2006. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16786532> >.

RAFEHI, H. et al. Clonogenic assay: adherent cells. **J Vis Exp**, n. 49, 2011. ISSN 1940-087X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445039> >.

REN, J. H. et al. Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 25, n. 1, p. 75-80, Feb 2010. ISSN 1557-8852. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20187799> >.

RIKIISHI, H. Novel Insights into the Interplay between Apoptosis and Autophagy. **Int J Cell Biol**, v. 2012, p. 317645, 2012. ISSN 1687-8884. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22496691> >.

RODRIGUEZ-OTERO, P. et al. Deregulation of FGFR1 and CDK6 oncogenic pathways in acute lymphoblastic leukaemia harbouring epigenetic modifications of the MIR9 family. **Br J Haematol**, v. 155, n. 1, p. 73-83, Oct 2011. ISSN 1365-2141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21810092> >.

ROGAKOU, E. P. et al. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. **J Cell Biol**, v. 146, n. 5, p. 905-16, Sep 1999. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477747> >.

_____. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. **J Biol Chem**, v. 273, n. 10, p. 5858-68, Mar 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488723> >.

ROMEO, F. et al. BRCA1 is required for hMLH1 stabilization following doxorubicin-induced DNA damage. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 12, p. 1754-63, Dec 2011. ISSN 1878-5875. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864706> >.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends Mol Med**, v. 12, n. 9, p. 440-50, Sep 2006. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899408> >.

_____. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. **Cancer Lett**, v. 332, n. 2, p. 237-48, May 2013. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22261329> >.

ROTKRUA, P. et al. MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells. **Int J Cancer**, v. 129, n. 11, p. 2611-20, Dec 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225631> >.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Third. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2001.

SCHRAIVOGEL, D. et al. CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9* in glioblastoma stem cells. **EMBO J**, v. 30, n. 20, p. 4309-22, Oct 2011. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21857646> >.

SEO, S. B. et al. Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein. **Cell**, v. 104, n. 1, p. 119-30, Jan 2001. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163245> >.

SHANBHAG, N. M. et al. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. **Cell**, v. 141, n. 6, p. 970-81, Jun 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20550933> >.

SHI, Y. A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 2, p. 93-5, Feb 2002. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11840157> >.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 197-210, Apr 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847781> >.

SHIMIZU, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 12, p. 1221-8, Dec 2004. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558033> >.

SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. **Mech Dev**, v. 120, n. 11, p. 1351-83, Nov 2003. ISSN 0925-4773. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623443> >.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, Mar 1988. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3345800> >.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND., C., Eds. **TNM Classification of Malignant Tumours**: John Wiley & Sons, INC, 6 ed. 2002.

SOBRAL, L. M. et al. Stable SET knockdown in head and neck squamous cell carcinoma promotes cell invasion and the mesenchymal-like phenotype in vitro, as well as necrosis, cisplatin sensitivity and lymph node metastasis in xenograft tumor models. **Mol Cancer**, v. 13, p. 32, 2014. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24555657> >.

SOLDANI, C.; SCOVASSI, A. I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. **Apoptosis**, v. 7, n. 4, p. 321-8, Aug 2002. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101391> >.

SOUSA, L. O. **A proteína SET modula os níveis de miRNAs e proteínas envolvidas na manutenção e progressão do câncer oral**. 2013. 111 p. (Tese de Doutorado). Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

STEGEMAN, H. et al. Dasatinib Inhibits DNA Repair after Radiotherapy Specifically in pSFK-Expressing Tumor Areas in Head and Neck Xenograft Tumors. **Transl Oncol**, v. 6, n. 4, p. 413-9, Aug 2013. ISSN 1936-5233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908684> >.

STEWART, G. S. et al. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. **Nature**, v. 421, n. 6926, p. 961-6, Feb 2003. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12607005> >.

SUMMERS, K. C. et al. Phosphorylation: the molecular switch of double-strand break repair. **Int J Proteomics**, v. 2011, p. 373816, 2011. ISSN 2090-2174. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084686> >.

SUN, Y. et al. Expression profile of microRNAs in c-Myc induced mouse mammary tumors. **Breast Cancer Res Treat**, v. 118, n. 1, p. 185-96, Nov 2009. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18777135> >.

TAO, Y. et al. Radiosensitization by Chir-124, a selective CHK1 inhibitor: effects of p53 and cell cycle checkpoints. **Cell Cycle**, v. 8, n. 8, p. 1196-205, Apr 2009. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19305158> >.

TAWFIK, H. M. et al. Head and neck squamous cell carcinoma: mismatch repair immunohistochemistry and promoter hypermethylation of hMLH1 gene. **Am J Otolaryngol**, v. 32, n. 6, p. 528-36, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 1532-818X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353335> >.

TAYLOR, W. R.; STARK, G. R. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene**, v. 20, n. 15, p. 1803-15, Apr 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313928> >.

TEN KLOOSTER, J. P. et al. Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. **EMBO J**, v. 26, n. 2, p. 336-45, Jan 2007. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245428> >.

THIERY, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 740-6, Dec 2003. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644200> >.

TING, N. S.; LEE, W. H. The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 935-44, 2004 Aug-Sep 2004. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279779> >.

UMAR, A. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst**, v. 96, n. 4, p. 261-8, Feb 2004. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970275> >.

UZIEL, T. et al. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. **EMBO J**, v. 22, n. 20, p. 5612-21, Oct 2003. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532133> >.

VERA, J. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 is a SET-binding protein and a PP2A inhibitor. **Oncogene**, v. 25, n. 2, p. 260-70, Jan 2006. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170352> >.

VON LINDERN, M. et al. Characterization of the translocation breakpoint sequences of two DEK-CAN fusion genes present in t(6;9) acute myeloid leukemia and a SET-CAN fusion gene found in a case of acute undifferentiated leukemia. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 5,

n. 3, p. 227-34, Oct 1992. ISSN 1045-2257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1384675> >.

WAN, H. Y. et al. Regulation of the transcription factor NF-kappaB1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma. **Mol Cancer**, v. 9, p. 16, 2010. ISSN 1476-4598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20102618> >.

WANG, Y. et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. **Genes Dev**, v. 14, n. 8, p. 927-39, Apr 2000. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10783165> >.

_____. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 AND hMSH2. **Int J Cancer**, v. 93, n. 3, p. 353-60, Aug 2001. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433399> >.

WARD, I. M.; CHEN, J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. **J Biol Chem**, v. 276, n. 51, p. 47759-62, Dec 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11673449> >.

WARD, I. M. et al. p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 7, p. 2556-63, Apr 2003. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12640136> >.

WARMERDAM, D. O.; KANAAR, R. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. **Mutat Res**, v. 704, n. 1-3, p. 2-11, 2010 Apr-Jun 2010. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20006736> >.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 228-34, Mar 2009. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255566> >.

WIRTZ, S. et al. Both base excision repair and O6-methylguanine-DNA methyltransferase protect against methylation-induced colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 12, p. 2111-7, Dec 2010. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20732909> >.

XIE, B. S. et al. Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells. **Int J Mol Med**, v. 27, n. 4, p. 599-606, Apr 2011. ISSN 1791-244X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21274505> >.

XU, B. et al. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. **Cancer Res**, v. 62, n. 16, p. 4588-91, Aug 2002. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183412> >.

XU, Y. et al. Identification of cancer stem cells from hepatocellular carcinoma cell lines and their related microRNAs. **Oncol Rep**, v. 30, n. 5, p. 2056-62, Nov 2013. ISSN 1791-2431. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002436> >.

XUE, L. et al. Regulation of ATM in DNA double strand break repair accounts for the radiosensitivity in human cells exposed to high linear energy transfer ionizing radiation. **Mutat Res**, v. 670, n. 1-2, p. 15-23, Nov 2009. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19583974> >.

YOU, Z. et al. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 13, p. 5363-79, Jul 2005. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15964794> >.

YU, T. et al. MicroRNA-9 inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of CXCR4 via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Oncogene**, Oct 2013. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141785> >.

ZHANG, F. et al. Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 9, p. 823-31, May 2009. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270532> >.

ZHAO, H.; PIWNICA-WORMS, H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 13, p. 4129-39, Jul 2001. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390642> >.

ZOIS, C. E.; KOUKOURAKIS, M. I. Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? **Autophagy**, v. 5, n. 4, p. 442-50, May 2009. ISSN 1554-8635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164950> >.

ZOU, J. et al. Antisense inhibition of ATM gene enhances the radiosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma in mice. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 27, p. 56, 2008. ISSN 1756-9966. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18950535> >.

ZUO, C. et al. Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 141, n. 4, p. 484-90, Oct 2009a. ISSN 1097-6817. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786217> >.

_____. Increased microsatellite instability and epigenetic inactivation of the hMLH1 gene in head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 141, n. 4, p. 484-90, Oct 2009b. ISSN 1097-6817. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786217> >.

Anexo

8 Anexo 1

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.168.53.2), intitulado "Identificação dos Genes, miRNAS e Proteínas Regulados pela Oncoproteína SET e envolvidos na Malignização e Progressão do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço Usando Modelo *in vitro* e *in vivo*", de autoria de **Andréia Machado Leopoldino**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.168.53.2), entitled: "Identificação dos Genes, miRNAS e Proteínas Regulados pela Oncoproteína SET e envolvidos na Malignização e Progressão do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço Usando Modelo *in vitro* e *in vivo*", by **Andréia Machado Leopoldino**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro