

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE HIPERMETILAÇÃO DE
PROMOTORES GÊNICOS EM AMOSTRAS TUMORAIS
DE CÂNCER DAS VIAS AERODIGESTIVAS
SUPERIORES**

LUCIANE TSUKAMOTO KAGOHARA

**Dissertação apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do
título de Mestre**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

**Co-orientadores: Dr. André Luiz Vettore e
Dra. Otávia Luisa S. Damas de Caballero**

São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Kagohara, Luciane Tsukamoto

**Avaliação do perfil de hipermetilação de promotores gênicos em
amostras tumorais de câncer das vias aerodigestivas superiores** / Luciane
Tsukamoto Kagohara -- São Paulo, 2006.

96p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski

Descritores: 1.CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 2. CÂNCER DE CABEÇA E
PESCOÇO. 3. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 4. METILAÇÃO
DE DNA.

*A força não provém da capacidade física e
sim de uma vontade indomável.*

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Tizue e Valdir por uma vida inteira de carinho, amor, compreensão e incentivo em todos os momentos, principalmente quando eu mesma não acreditava na minha capacidade. Muito obrigada por terem abandonado suas prioridades para que as minhas necessidades e vontades pudessem se concretizar. Agradeço à minha irmã por sempre torcer pelo meu sucesso e por sempre se lembrar de mim com pequenos gestos de carinho.

Agradeço em especial ao meu orientador Dr. Luiz Paulo Kowalski pela confiança na minha capacidade para o desenvolvimento desse estudo. Muito obrigada pela paciência, compreensão e pela disposição e boa vontade para que tudo caminhasse da melhor maneira possível. Obrigada pelo exemplo de ser humano e profissional.

Agradeço ao Dr. André Luiz Vettore pelo que pude aprender durante esses anos. Obrigada pela atenção, pelos ensinamentos e pelo apoio para que essa dissertação pudesse ser concluída.

À Dra. Otavia Caballero que participou da elaboração inicial desse estudo. Obrigada pela calma, incentivo e respeito.

Ao Dr. André Carvalho pela contribuição durante as etapas de padronização das reações e pelas análises estatísticas. Obrigada pela paciência em ler e responder meu emails em série durante a montagem dos gráficos da dissertação.

À Mariana Brait por ser essa pessoa tão sensata e prestativa. Obrigada pelas discussões em todas as etapas desse projeto e pela ajuda na tentativa de solucionar

uma série de problemas. Agradeço em especial, os momentos de desabafo, o chocolate no momento de desânimo e por essa amiga tão carinhosa e dedicada.

À Fernanda C. G. de Sampaio Goes, companheira de metilção e de cabeça e pescoço, muito obrigada pelas discussões, pela ajuda com as dúvidas de patologia e por ter compartilhado todas as dificuldades desse trabalho. Agradeço a amizade e a torcida pelo meu sucesso em todos os momentos.

À Andrea Quintela pelo bom humor e por todas as conversas que compartilhamos durante tantos anos. Obrigada pela amizade e pelo suporte psicológico e na bancada nos momentos de desespero.

Ao Fabio Piccoli pelos cafezinhos da tarde para espantar o sono e dar uma fugidinha do laboratório. Agradeço também seus momentos de dúvida, com os quais eu e a Andrea nos divertíamos muito, e pelas nossas “briguinhas” sempre saudáveis. Obrigada pelo amigo que pude encontrar nesses nos de GNC.

Ao Fabrício de Carvalho pela discussão a respeito de tantos protocolos; pelo suporte dentro laboratório, sempre mantendo tudo em ordem para que os demais pudessem realizar seus projetos da melhor maneira possível; e pela torcida pelo meu sucesso. Também agradeço aos momentos musicais que acabavam sempre por descontrair o ambiente.

À Márcia Dellamano agradeço a bancada deixada com tanto carinho, a paciência com meus longos emails de desabafo e a torcida sempre carinhosa apesar da distância. Muito obrigada por ter compartilhado durante um bom tempo os momentos difíceis e alegres dentro e fora do laboratório.

À todos os membros do Laboratório de Genética do Câncer, Roberta Lessa, Valéria Andrade, Cláudia Pereira, Luis Sakamoto, Ana Carolina de Carvalho,

Viviane Sonaglio e Roberta Félix, obrigada pela companhia maravilhosa e por tornarem o laboratório um ambiente amistoso e acolhedor. Agradeço também a todos aqueles que passaram pelo laboratório mas que escolheram trilhar novos caminhos em outros lugares: Danielle Renzoni, Adriana Bulgarelli, Letícia Olops, Alex Sato, Benjamin Heck, Manuela Almeida, Dinamar Gaspar e Luciana Pinto.

À Aline Bolpetti pela doçura, pela amizade e por ter me acolhido durante os dois anos do desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pelos momentos de desabafo, de risadas e por tantos momentos alegres!

À Mariana Maschietto agradeço a calma e a serenidade, pelo convívio fora do ambiente “ludwiguiano” mas principalmente pela amizade e confiança na minha capacidade.

À Cláudia Menatti, Thaís Machado e Cristina Orikaza, amigas de faculdade e que, apesar da minha ausência durante os períodos de correria no laboratório, ainda continuam torcendo por mim e se preocupando comigo. Muito obrigada pelo carinho e momentos tão felizes (que eu espero, ainda serem muitos).

À todos os amigos do Instituto Ludwig que acompanharam o caminhar do meu mestrado e que sempre me apoiaram com palavras de conforto e de otimismo. Um obrigado especial para Lílian Pires, Fabiana Bettoni, Daniel Vidal, Nair Muto, Ana Coló, Ana Pagotto, Nádia Castro, Maria Cristina Rangel, Ellen, Lara Termini, Ana Lepique, Thiago Felcar, Elisa, Tiago Goss e Flavio Beraldo.

À Isabel e Léia pelo suporte durante esses anos. Sem vocês o desenvolvimento dessa dissertação teria sido muito mais laboriosa e com certeza bem menos alegre.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares e ao Dr. Clóvis Pinto do Departamento de Anatomia Patológica pela importante colaboração, disposição e apoio neste trabalho.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis , diretor da pós-graduação da Fundação Antonio Prudente, pela qualidade deste curso. Obrigada à Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeiras e Márcia Hiratani pela enorme simpatia, paciência e suporte durante o decorrer desses dois anos.

À equipe da biblioteca, Suely Francisco, Rosinéia Carneiro, Francyne Pólen e Janaína, pelas centenas de artigos pesquisados, pela atenção e dedicação nos momentos requeridos. Um agradecimento especial à Sueli e à Francyne pela formatação e correção de pequenos detalhes estruturais dessa dissertação.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (SAME), sobretudo à Sra. Irde Contesini pela ajuda com os prontuários dos pacientes.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani e à Dra. Luisa L. Villa pelas excelentes condições de trabalho.

Aos membros da banca de qualificação, Dra. Anamaria Camargo, Dra. Silvia Regina Rogatto e Dr. Emanuel Dias Neto, pelas correções e sugestões durante o andamento desse estudo.

Aos membros da banca examinadora desta dissertação por aceitarem o convite e pela disposição em ler e argüir este trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro para que esse estudo pudesse ser realizado e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão dessa dissertação.

RESUMO

Kagohara LT. **Avaliação do perfil de hipermetilação de promotores gênicos em amostras tumorais de câncer das vias aerodigestivas superiores.** São Paulo; 2006. [Dissertação de mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Os cânceres de cabeça e pescoço encontram-se entre os dez tipos mais freqüentes, sendo que a variante mais comum é o carcinoma epidermóide (CE) localizado em vias aerodigestivas superiores (VADS). As estratégias terapêuticas para o CE da cabeça e pescoço baseiam-se fundamentalmente na localização do tumor e no sistema de estadiamento TNM. Entretanto, em muitos casos, tumores com mesmo estadiamento clínico e localização, tratados pelo mesmo método, apresentam padrões de evolução diferentes. O conhecimento mais amplo do comportamento biológico dos CE de VADS pode permitir um delineamento mais claro da progressão tumoral. Assim sendo, atualmente, buscam-se metodologias e técnicas laboratoriais variadas, capazes de auxiliar na determinação do prognóstico dos pacientes com câncer e do seu seguimento, com a finalidade de se adequar a terapêutica ao grau de agressividade biológica da lesão tratada. A presença de hipermetilação na região promotora dos genes tem sido considerada um marcador para vários tumores, incluindo os localizados nas VADS. Por essa razão, o presente trabalho teve por objetivo analisar o perfil de hipermetilação dos genes em amostras tumorais incluídas em parafina provenientes de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de CE das VADS no Hospital do Câncer A.C. Camargo (HCACC), visando verificar a utilidade da metilação como marcador molecular para os CE das VADS. Os dados obtidos

foram comparados aos resultados descritos para os mesmos genes em amostras de pacientes tratados na Johns Hopkins University (JHU), com o objetivo de identificar possíveis diferenças populacionais e verificar se a hipermetilação desses genes pode ser empregada como marcador tumoral em ambas as populações (americana e brasileira). Foram analisadas nesse estudo 64 amostras através da técnica de PCR quantitativa específica para metilação. Foi possível detectar a hipermetilação de pelo menos um gene em 33 (46,9%) das amostras, com as seguintes frequências para cada um dos genes: 29,0% para *CCNAI*; 16,1% para *DAPK*; 14,5% para *TIMP3*; 11,3% para *AIM-1* e *ESR*; 10,6% para *DCC*; 8,1% para *MGMT*; 4,7% para *P16^{INKa}*; e 3,6% para *MINT31*. Quando essas frequências foram comparadas àquelas obtidas no estudo da JHU, para o mesmo número de amostras, as frequências foram significativamente diferentes para 7 dos genes, com exceção do *AIM-1* e *P16^{INKa}*. Foi possível correlacionar a hipermetilação nos promotores dos genes *P16^{INKa}* e *MGMT* com o consumo de álcool ($p=0,021$ e $p=0,023$, respectivamente) e, dos genes *TIMP3* e *DCC*, com tumores de orofaringe ($p=0,030$ e $p=0,044$, respectivamente), quando os dois grupos de amostras foram avaliados na sua totalidade. Não foi possível verificar associação significativa entre a hipermetilação dos promotores gênicos e parâmetros clínicos para os casos provenientes do HCACC. Para as amostras do estudo da JHU, a hipermetilação do gene *P16^{INKa}* está associada ao consumo de álcool ($p=0,031$). As diferenças presentes nas comparações entre os dois grupos de amostras sugere a possível existência de diferenças populacionais. No entanto, não podem ser descartadas diferenças inerentes da utilização de aparelhos distintos de PCR em tempo-real nas análises dos dois grupos de amostras.

SUMMARY

Kagohara LT. [**Promoter hypermethylation profile analysis in head and neck squamous cell carcinoma**] São Paulo; 2006. [Dissertação de mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Head and neck carcinomas are among the most frequent tumor types worldwide and the most common variant is the squamous cell carcinoma from the upper aerodigestive tract (HNSCC). Therapeutic strategies for HNSCC are based on tumor site and TNM stage. However, tumors from the same site, showing the same clinical staging and treated by the same approaches usually present different progression patterns. A profound knowledge about HNSCC behavior would allow an adequate tumor progression prediction. For this reason, many studies aim to establish experimental approaches to help in prognostic and follow-up prediction, trying to adequate therapeutics to tumor aggressiveness. Promoter hypermethylation is considered a tumor marker in a variety of malignant neoplasias, including HNSCC. The objective of this work was to analyze the hypermethylation profile of the genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* in paraffin embedded tumor samples of HNSCC from patients surgically treated at Hospital do Câncer A.C. Camargo (HCACC), to try to prove hypermethylation detection as a molecular marker in HNSCC. The results were compared to those described for Johns Hopkins University's patients to verify the existence of population differences and if methylation in these genes can be used as tumor marker in both populations (American and Brazilian). Sixty four samples were analyzed by quantitative

methylation specific PCR. It was possible to detect hypermethylation for at least one gene in 33 (46.9%) samples, with the following frequencies: 29.0% for *CCNA1*; 16.1% for *DAPK*; 14.5% for *TIMP3*; 11.3% for *AIM-1* and *ESR*; 10.6% for *DCC*; 8.1% for *MGMT*; 4.7% for *P16^{INKa}*; and 3.6% for *MINT31*. When these frequencies were compared to those from the JHU work, considering the same sample size, they were statistically different for 7 genes, with exceptions to *AIM-1* and *P16^{INKa}*. When the two groups of samples were analyzed together it was possible to associate *P16^{INKa}* and *MGMT* promoter hypermethylation to alcohol consumption ($p=0.021$ and $p=0.023$, respectively) and *TIMP3* and *DCC* to oropharynx tumors ($p=0.030$ and $p=0.044$, respectively). The analysis for the samples from HCACC showed no significantly correlations for promoter hypermethylation and clinical parameters. Promoter hypermethylation of *P16^{INKa}* in the samples from JHU was associated to alcohol consumption ($p=0.031$). The differences observed in the comparisons between the two groups of samples suggest that population differences should exist. However, differences inherent to the use of different real-time PCR equipments in the analysis of the two groups of samples cannot be discarded.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação de adição de radical metil (CH_3) à base nitrogenada citosina.	9
Figura 2	Silenciamento gênico induzido pela metilação.	12
Figura 3	Modificação do DNA durante o tratamento com bissulfito de sódio.	31
Figura 4	Gráficos das curvas de amplificação para a padronização do tampão de reação para as reações de QMSP.	42
Figura 5	Gel de eletroforese representativo da PCR para teste da integridade do DNA.	43
Figura 6	Curva padrão e curvas de amplificação para o gene referência β - <i>ACTINA</i> para 26 amostras.	45
Figura 7	Gel de eletroforese representativo da PCR com iniciadores para o gene β - <i>ACTINA</i> (133-pb) empregados na QMSP.	46
Figura 8	Gel de eletroforese representativo da PCR para verificação da integridade do DNA extraído com kit <i>Nucleon HT</i> .	47
Figura 9	Curvas de amplificação para o gene β - <i>ACTINA</i> de 10 amostras após nova extração de DNA, utilizando o kit <i>Nucleon HT</i> (Amersham Biosciences).	47
Figura 10	Curvas de amplificação para o gene β - <i>ACTINA</i> de 10 amostras após tratamento com bissulfito de sódio com etapa adicional de denaturação.	49
Figura 11	Curvas de amplificação após tratamento com bissulfito de sódio com concentrações aumentadas de reagentes.	50

Figura 12	Figura representativa das curvas de amplificação para o gene <i>β-ACTINA</i> para as amostras tumorais.	51
Figura 13	Curva padrão construída para o cálculo da eficiência de amplificação dos conjuntos de iniciadores e sondas.	52
Figura 14	Exemplos de curvas de amplificação consideradas na análise das reações de QMSP.	58
Figura 15	Gráficos de dispersão referentes aos genes avaliados no estudo.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de hipermetilação em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.	23
Tabela 2	Seqüência dos iniciadores para amplificação do gene β - <i>ACTINA</i> empregados para verificar a integridade das amostras de DNA.	30
Tabela 3	Combinações das quantidades de iniciadores e enzima <i>Platinum Taq Polimerase</i> testadas durante as padroizações das reações de QMSP.	36
Tabela 4	Seqüências de iniciadores e sondas utilizados nas reações de QMSP para o gene referência (β - <i>ACTINA</i>) e para os genes alvo.	39
Tabela 5	Eficiências de amplificação para os conjuntos de iniciadores e sondas dos genes alvo e do gene referência.	54
Tabela 6	Frequências de hipermetilação dos promotores gênicos.	56
Tabela 7	Perfil de hipermetilação nas amostras de CE das VADS.	56
Tabela 8	Descrição dos dados clínico-patológicos avaliados no estudo.	60
Tabela 9	Frequências de metilação para os genes estudados para os dois grupos de pacientes (brasileiros e norte-americanos).	61
Tabela 10	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>MINT31</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	64
Tabela 11	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>P16</i> ^{INKa} com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital	65

do Câncer A.C. Camargo.

Tabela 12	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>TIMP-3</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	66
Tabela 13	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>DAPK</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	67
Tabela 14	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>ESR</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	68
Tabela 15	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>MGMT</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	69
Tabela 16	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>CCNA1</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	70
Tabela 17	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>AIM-1</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	71
Tabela 18	Correlações entre a hipermetilação do gene <i>DCC</i> com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.	72

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
<i>AIM-1</i>	gene <i>absent in melanoma 1</i>
C	base nitrogenada citosina
<i>CCNA1</i>	gene <i>ciclina a1</i>
CDK4	quinase ciclina dependente 4
CDK6	quinase ciclina dependente 6
<i>CDKN2a</i>	gene <i>cyclin kinase inhibitor 2a</i>
cDNA	DNA complementar
CE	carcinoma epidermóide
CpG	dinucleotídeo cg
C_T	<i>cycle threshold</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
<i>DAPK</i>	gene <i>death associated protein kinase</i>
<i>DCC</i>	gene <i>deleted in colon cancer</i>
DMSO	
DNMT	DNA metil-transferase
DNMT1	DNA metil-transferase 1
DNMT3a	DNA metil-transferase 3a
DNMT3b	DNA metil-transferase 3b
dNTP	Deoxinucleotídeos tri-fosfato
EBV	vírus epstein barr
EDTA	ácido etileno-diamino-tetraacético
<i>ESR</i>	gene <i>estrogen receptor</i>

FAM	6-carboxi-fluoresceína
G	base nitrogenada guanina
HCACC	Hospital do Câncer A.C. Camargo
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina-eosina
HPV	Papiloma vírus humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JHU	Johns Hopkins University
MBD	<i>methyl binding proteins</i>
mg	miligrama
MgCl₂	cloreto de magnésio
MGMT	gene <i>o</i> ⁶ - <i>methylguanine dna methyltransferase</i>
MINT31	<i>methylated in tumors 31</i>
mL	mililitro
mM	milimolar
MMP	<i>matrix metaloproteinases</i>
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nM	nanomolar
pb	pares de bases
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PK	proteínase k
QMSP	<i>quantitative methylation specific pcr</i>
q.s.p.	quantidade suficiente para
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SAM	s-adenosilmetionina
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SDS	dodecil sulfato de sódio

TAMRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
TE	Tris-EDTA
TIMP	<i>tissue inhibitor of metaloproteinases</i>
<i>TIMP-3</i>	gene <i>tissue inhibitor of metalloproteinases 3</i>
U	unidade
VADS	vias aerodigestivas superiores

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Carcinoma Epidermóide das Vias Aerodigestivas Superiores	1
1.2	A Metilação Aberrante do DNA	8
1.3	O Câncer de Cabeça e Pescoço e a Hipermetilação	14
1.4	Estudo Preliminar	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Levantamento dos Casos e Coleta das Amostras	20
3.2	Revisão dos Casos e Demarcação da Área Tumoral	21
3.3	Microdissecção Manual das Amostras e Extração do DNA	21
3.4	Tratamento com Bissulfito de Sódio	24
3.5	Extração, Metilação <i>In Vitro</i> e Tratamento com Bissulfito de Sódio de DNA de Linfócitos	25
3.6	PCR Quantitativa Específica para Metilação (QMSP)	28
3.7	Levantamento dos Dados Clínico-patológicos e Epidemiológicos	32
3.8	Análises Estatísticas	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Padronização das Reações de PCR Quantitativa Específica para Metilação (QMSP)	33
4.2	Extração do DNA e Tratamento com Bissulfito de Sódio	36
4.3	Reações de QMSP para os Genes <i>P16^{ink4a}</i> , <i>MGMT</i> , <i>DAPK</i> , <i>MINT31</i> , <i>CCNA1</i> , <i>TIMP-3</i> , <i>ESR</i> , <i>AIM-1</i> E <i>DCC</i>	45

4.4	Análises Estatísticas E Correlações Com Aspectos Clínicos	50
5	DISCUSSÃO	86
6	CONCLUSÕES	100
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

ANEXOS

Anexo 1 Registro de Coleta de Dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARCINOMA EPIDERMÓIDE DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES

O câncer é uma importante causa de morbidade e a segunda causa de mortalidade em todo o mundo. O carcinoma epidermóide (CE) das vias aerodigestivas superiores (VADS) é a quinta neoplasia mais freqüente mundialmente e representa 90% das neoplasias malignas da região da cabeça e pescoço (QUON et al. 2001; BELBIN et al. 2002; HARDISSON 2003). Nos Estados Unidos o CE das VADS corresponde a 2,8% de todos os casos de câncer (SPITZ et al. 2004). As estimativas para o ano de 2006 indicam que serão diagnosticados aproximadamente 37.730 novos casos de CE de cabeça e pescoço e que ocorrerão cerca de 9.500 óbitos em consequência dessa doença (American Cancer Society-ACS 2006). Estudos epidemiológicos demonstram que existe uma maior incidência do carcinoma epidermóide das VADS entre indivíduos do sexo masculino. Apenas um terço dos pacientes são mulheres (SIDRANSKY 2005; ACS 2006; Ministério da Saúde 2005).

A principal localização primária do CE das VADS é a cavidade oral, sendo este o terceiro tumor mais freqüente nos homens e o quarto em mulheres (Ministério da Saúde 2001). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a incidência de câncer de boca no Brasil vem aumentando consideravelmente, sendo que as estimativas para o ano de 2006 são de aproximadamente 13.470 novos casos (Ministério da Saúde 2005).

As vias aerodigestivas superiores incluem a cavidade oral, cavidade nasal, faringe e laringe. A cavidade oral inclui os lábios, a mucosa jugal, o soalho bucal, a língua oral (dois terços anteriores do órgão), as gengivas inferior e superior, o palato duro e o triângulo retromolar. A faringe é dividida em 3 regiões: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe. A nasofaringe é contínua a cavidade nasal e a orofaringe. Está conectada ao ouvido médio, através das trompas de Eustáquio. A orofaringe é constituída pela base da língua (terço posterior da língua), valécula, amígdalas palatinas, pilares e sulcos glosso-amidalianos, palato mole, úvula e pela parede faríngea posterior entre a hipofaringe e a nasofaringe. A hipofaringe é delimitada pelo osso hióide e pela cartilagem cricóide. É dividida em 3 regiões: área pós-cricóide, seios piriformes e parede posterior. A laringe é anatomicamente dividida em supraglótica, glótica e subglótica. A região supraglótica inclui a epiglote, as falsas cordas vocais, os ventrículos, as pregas ariepiglóticas e as aritenóides. A região glótica é constituída pelas pregas vocais e pelas comissuras anterior e posterior. A região subglótica tem 2cm de extensão e se estende desde as cordas vocais até a traquéia (Ministério da Saúde 2001; SIDRANSKY 2005).

O tabagismo e o etilismo são os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do CE de cabeça e pescoço. A dieta e a exposição a agentes carcinogênicos ocupacionais e ambientais são outros fatores de risco para esse tipo tumoral (KOWALSKI et al. 2005). O tabaco é o fator de risco mais estudado no desenvolvimento de tumores das VADS. O risco para CE de cabeça e pescoço associado ao tabaco é dose dependente, podendo ser de 5 a 25 vezes maior nos indivíduos tabagistas quando comparados a indivíduos não fumantes. Além disso, o risco para o desenvolvimento de um segundo tumor primário é 4 vezes maior em

pacientes fumantes ao diagnóstico e que continuam consumindo tabaco após o tratamento da lesão primária (FRANCO et al. 1989). Fumantes passivos também estão sob risco para o desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço, e esse risco pode chegar a 3,6 vezes (SPITZ et al. 2004). O consumo de álcool também está associado a maior risco para o desenvolvimento de tumores epidermóides de cabeça e pescoço, e quando associado ao tabaco, o efeito parece ser sinérgico (FRANCO et al. 1989).

A dieta adequada pode reduzir em até 80% o risco para o desenvolvimento de CE das VADS. Dietas ricas em vitamina C, carotenóides e vitamina A podem ter efeito protetor contra a doença (FRANCO et al. 1989; KOWALSKI et al. 2005).

Agentes etiológicos virais também podem estar envolvidos no desenvolvimento dos CE das VADS, estando associados ao aumento do risco. Dentre esses agentes podem ser citados o Vírus Epstein-Barr (EBV) e o Herpes Vírus Humano (HPV), o primeiro está associado a tumores de nasofaringe e o último a tumores de orofaringe. O HPV está envolvido na quase totalidade dos casos de CE do colo uterino, porém algumas variantes, como o HPV-16, já foram detectadas em amostras tumorais de CE de cabeça e pescoço (SPITZ et al. 2004). A infecção por HPV-16 e o risco para tumores de orofaringe pôde ser estabelecido uma vez que a detecção de DNA viral em amostras de soro foi detectada em duas vezes mais pacientes do que em indivíduos normais (MIGUEL et al. 1998; MORK et al. 2001).

A exposição a carcinógenos ambientais e ocupacionais é outro fator de risco para os tumores de cabeça e pescoço. No entanto, o estudo desses fatores é bastante dificultado pela existência de variáveis que podem gerar distorções nas análises dos dados (PINTOS et al. 1998).

Os CE das VADS se desenvolvem a partir do epitélio. Geralmente, começam como lesões superficiais, mas também podem ter início nos dutos das glândulas salivares abaixo da superfície visível da mucosa, em casos raros (SIDRANSKY 2005). O comprometimento de linfonodos cervicais é freqüente nos casos de tumores epidermóides de cabeça e pescoço e depende do grau de diferenciação do tumor, do tamanho da lesão primária, da presença de invasão vascular e da densidade de capilares linfáticos na área do tumor. O desenvolvimento de metástases à distância está associado principalmente ao comprometimento linfonodal cervical. Pacientes com tumores em estágio N0 e N1 apresentam risco menor que 10% para o desenvolvimento de doença à distância, já para os estádios N2 e N3 o risco aumenta para mais de 30%. O sítio mais freqüente para metástases à distância de CE das VADS é o pulmão. Aproximadamente metade das metástases são diagnosticadas após 9 meses do diagnóstico do tumor primário e 90% são detectadas até 3 anos após o tumor primário (SIDRANSKY 2005).

A cirurgia e a radioterapia (isoladas ou combinadas) são as únicas abordagens terapêuticas com capacidade curativa para os CE de cabeça e pescoço. A quimioterapia é um tratamento adjuvante para esse tipo tumoral e isoladamente não tem efeito curativo (SIDRANSKY 2005). As estratégias terapêuticas para os carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço baseiam-se principalmente na localização e no estadiamento TNM (HALL et al. 1999; GROOME et al. 2001). Entretanto, em muitos casos, tumores com mesmo estadiamento clínico apresentam padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade de avaliar e identificar novos fatores que auxiliem na determinação, com maior precisão, do prognóstico do paciente (HALL et al. 1999; PARTRIDGE et al. 1999; SANCHEZ-

CESPEDES et al. 2000; GROOME et al. 2001; NUNES et al. 2001; ROSAS et al. 2001; OGI et al. 2002). Apesar dos diversos estudos visando analisar o comportamento biológico e as características moleculares dos cânceres de cabeça e pescoço, eles ainda determinam uma alta taxa de mortalidade sendo a detecção tardia a principal causa das baixas taxas de sobrevida (WÜNCH-FILHO 2002; TEPPPO et al. 2003). Entre os problemas enfrentados por pacientes com lesões em estádios avançados estão a extensão das intervenções cirúrgicas, as seqüelas funcionais e estéticas resultantes, bem como o alto índice de recidivas loco-regionais (KOWALSKI et al. 2000; CARVALHO et al. 2003).

A taxa de sobrevida em 5 anos para o CE das VADS é de aproximadamente 50%, sendo variável de 25% a até 90% dependendo do sítio anatômico e de acordo com o estágio do tumor primário (Ministério da Saúde 2001). Uma característica muito importante dos CE de cabeça e pescoço é a alta taxa de ocorrência de segundos tumores primários. O risco para o desenvolvimento desses tumores é de 4 a 7% anualmente para cada paciente, sendo que esse risco não diminui com o decorrer dos anos. A incidência de novos tumores primários depende do sítio do primeiro tumor, variando de 10% (tumores glóticos) a 40% (tumores de orofaringe). A maior parte dos tumores secundários acomete a própria via aerodigestiva, sendo que pulmão (30%), cabeça e pescoço (20%) e esôfago (8%) são os sítios mais acometidos (SMITH e HAFFY 2004). A explicação sobre a alta taxa de ocorrência de segundos tumores primários é a presença dos chamados campos de cancerização. De acordo com esse conceito, múltiplas lesões malignas poderiam ocorrer ao longo de toda a mucosa das VADS devido a sua exposição a agentes carcinogênicos, como os produtos da combustão do tabaco, que em associação com agentes endógenos

poderiam levar à progressão maligna. Esse processo ocorreria em algumas áreas (campos) que apresentariam maior risco para o desenvolvimento de tumores malignos (SMITH e HAFFY 2004).

Alguns fatores associados à histopatologia e características clínicas dos CE de cabeça e pescoço podem auxiliar na determinação do prognóstico do paciente, permitindo o seguimento adequado e a adoção de abordagens terapêuticas melhor delineadas para cada paciente. Dentre os indicadores de prognóstico podem ser citados a margem da ressecção cirúrgica, tamanho do tumor, sítio tumoral, padrão de invasão, comprometimento do sistema linfático e vascular, invasão de tecidos adjacentes, metástase linfonodal, metástase a distância, resposta do paciente ao tratamento, neovascularização do tumor e presença de tumores múltiplos (QUON et al. 2001; SMITH e HAFFY 2004; BERNIER e COOPER 2005). O comprometimento linfonodal é um dos mais importantes determinantes de prognóstico para os CE das VADS (BOCKMÜHL et al. 2000). A presença de linfonodos cervicais positivos está associada a maior risco para recorrência regional, metástases à distância e pior sobrevida. A sobrevida para pacientes sem comprometimento linfonodal detectável nos exames histopatológicos pode chegar a 85%, já para pacientes com metástases em linfonodos cervicais a sobrevida cai para menos de 54%. No entanto, acredita-se que de 20% a 50% dos casos sem linfonodos comprometidos ao exame clínico-patológico apresentem micrometástases e, por essa razão, mau prognóstico (SMIRAGLIA et al. 2003). No entanto, esses fatores clínicos não são precisos na determinação do prognóstico, uma vez que tumores com as mesmas características clínicas podem apresentar evoluções diferentes (ROSAS et al. 2001; OGI et al. 2002). Por essa razão a identificação de marcadores moleculares que

possam influenciar na decisão terapêutica e no seguimento clínico tem sido alvo de diversos estudos (CALIFANO e SIDRANSKY 2004).

A possibilidade de detecção da doença precocemente e de determinar o seu prognóstico de maneira mais precisa poderiam contribuir para o aumento da taxa de sobrevida e qualidade de vida dos pacientes. Uma das opções para agrupar os pacientes de maneira homogênea no momento de delinear o tratamento seria a identificação de marcadores moleculares para esses tumores (QUON et al. 2001). Dessa forma, a identificação de novos fatores prognósticos pode fornecer subsídios no estabelecimento do planejamento terapêutico. Diversas alterações genéticas têm sido descritas para os CE das VADS, principalmente translocações não balanceadas que acarretam a ativação de protooncogenes e a inativação de genes supressores de tumor (SMIRAGLIA et al. 2003). Porém, até o momento o papel dessas alterações no comportamento do tumor e suas implicações na progressão da doença são pouco compreendidos. A perda da região cromossômica 9p e a mutações no gene *TP53* são bastante frequentes nos CE de cabeça e pescoço. A hipermetilação de promotores gênicos tem um papel conhecido na tumorigênese e a análise do perfil de hipermetilação de genes, já estudado em outros tumores, tem indicado que a metilação também está envolvida na tumorigênese dos CE das VADS (SMIRAGLIA et al. 2003).

1.2 A METILAÇÃO ABERRANTE DO DNA

O processo de tumorigênese é constituído por múltiplos passos, durante os quais ocorrem ou se acumulam várias alterações genéticas (mutações pontuais, perda de heterozigose, deleções, inserções, aneuploidia, amplificação gênica, entre outras) e alterações epigenéticas (PLASS 2002). Os eventos epigenéticos são eventos herdáveis durante a divisão celular e que acarretam alteração do fenótipo sem alterações na sequência do DNA, interferindo no perfil de expressão gênica (EGGER et al. 2004; FEINBERG e TYCKO 2004).

A metilação é um processo biológico que ocorre após a síntese de DNA e que consiste na adição covalente de um radical metil (CH_3), a partir do doador S-adenosilmetionina, ao carbono 5 das bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas a 5' das guaninas (G), formando uma nova base nitrogenada: a 5-metilcitosina (FIGURA 1) (JONES e LAIRD 1999; PLASS 2002; LAIRD 2003). A reação é catalisada por uma família de enzimas chamadas DNA metil-transferases (DNMT): DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. A DNMT1 é responsável pela manutenção da metilação. Essa enzima é transportada para a forquilha de replicação do DNA onde catalisa a reação de adição de radicais metil aos sítios hemimetilados na fita de DNA recém-sintetizada. As DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela adição de novos radicais metil ao DNA, processo conhecido como metilação *de novo* (PLASS 2002; WORM e GULDBERG 2002; LAIRD 2003).

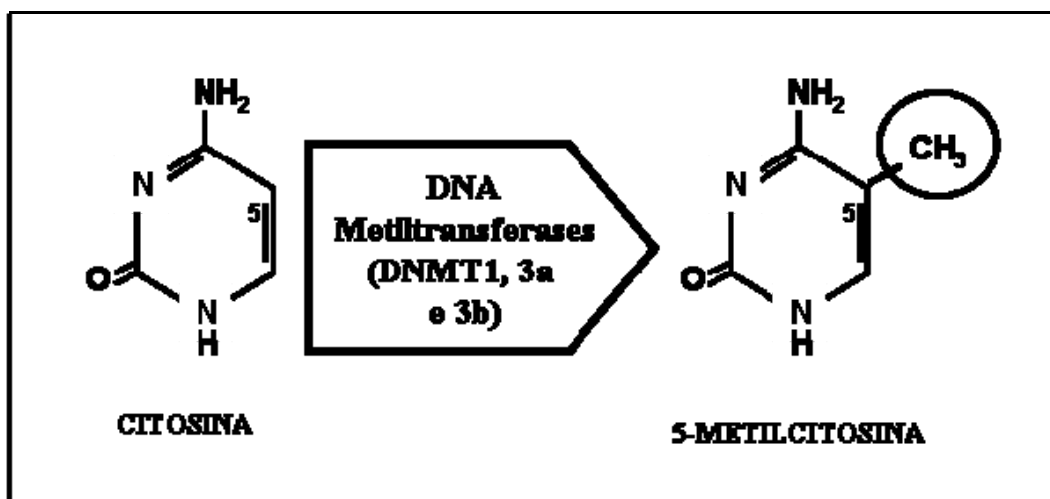


Figura 1 - Reação de adição de radical metil (CH_3) à base nitrogenada citosina. Essa reação é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMT1, 3a e 3b).

Os principais alvos da metilação em humanos são os dinucleotídeos CG. Esse dinucleotídeo apresenta uma baixa frequência no genoma talvez devido a alta taxa de mutação da 5-metilcitosina para timina, o que, ao longo da evolução, teria ocasionado a redução dos dinucleotídeos CG do genoma (WORM e GULDBERG 2002; LAIRD 2003). No entanto, existem determinadas regiões do genoma que apresentam uma alta concentração de dinucleotídeos CG, as chamadas ilhas de CpG. Estas regiões, que representam aproximadamente 1 a 2% do genoma, têm pelo menos 200 pares de base de extensão e um conteúdo de CG de pelo menos 50%. Aproximadamente 50 a 60% dos genes possuem ilhas de CpG em suas regiões promotoras (COSTELLO e PLASS 2001; ATTWOOD et al. 2002; JONES e BAYLIN 2002; PLASS 2002; WORM e GULDBERG 2002; LAIRD 2003; EGGER et al. 2004; ROBERTSON 2005).

A metilação tem um importante papel no desenvolvimento, no silenciamento de elementos repetitivos, na proteção contra seqüências virais, na repressão transcricional de determinados genes, no *imprinting* genômico e na inativação de um

cromossomo X nas mulheres (LAIRD 2003; EGGER et al. 2004; ROBERTSON 2005). O *imprinting* genômico é a modificação epigenética de um dos alelos parentais nos gametas ou no zigoto e que acarreta expressão diferencial do alelo silenciado. Através do *imprinting* genômico apenas um dos dois alelos parentais é expresso, enquanto o outro gene é mantido silenciado. A função desse mecanismo ainda não foi completamente elucidada mas existe uma hipótese segundo a qual o *imprinting* ocorre para balancear as necessidades intra-uterinas do feto e a saúde da mãe. A inativação de um cromossomo X nas mulheres ocorre durante a embriogênese com a finalidade de garantir a síntese de proteínas em quantidades equivalentes em homens e mulheres (COSTELLO e PLASS 2001; LAIRD 2003; ISSA 2004; ROBERTSON 2005).

Em células tumorais as ilhas de CpG presentes nos promotores de genes supressores de tumor são os principais alvos da chamada metilação aberrante ou hipermetilação (JONES e LAIRD 1999; EGGER et al. 2004; ROBERTSON 2005). A presença de metilação nessas regiões está associada à supressão da expressão gênica (SIDRANSKY 2002; ROBERTSON 2005; BAYLIN e OHM 2006), uma vez que esse evento inibe a transcrição gênica de maneira direta, pela inibição da ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios (FIGURA 2A), ou indireta, através da ligação de complexos de proteínas com domínios de ligação ao DNA metilado, as *metil CpG-binding domain proteins* (MBDs), que têm maior afinidade pelo DNA metilado e competem com os fatores de transcrição pelos sítios de ligação presentes no DNA (FIGURA 2B). Além disso, o silenciamento pode ser consequência da ocorrência concomitante da metilação do DNA e da deacetilação de histonas, resultando na alteração da conformação da cromatina para um estado

transcricionalmente menos ativo (FIGURA 2C). Acredita-se que complexos protéicos com afinidade pelas MBDs também se liguem ao DNA, dentre essas proteínas estão as histonas deacetilases (JONES e LAIRD 1999; ROBERTSON e JONES 2000; BAYLIN et al. 2001; JONES e BAYLIN 2002; PLASS 2002; SIDRANSKY 2002; WORM e GULDBERG 2002; ROBERTSON 2005). As enzimas histona deacetilases deacetilam resíduos de lisina na porção N (amino)-terminal das histonas, aumentando sua positividade e sua afeição por DNA ou por outras histonas, tornando a cromatina mais condensada (TYCKO 2000; COSTELLO e PLASS 2001; PLASS 2002).

Devido ao seu papel no silenciamento de genes com atividade supressora de tumor, a metilação tem sido considerada como uma via alternativa de inativação gênica às mutações e perdas cromossômicas (perda de heterozigose e deleções) na hipótese de Knudson, segundo a qual seriam necessários dois eventos para que ocorresse a inativação de genes supressores tumorais. A metilação pode inativar ambos os alelos, no caso dos cânceres esporádicos, ou um dos alelos no caso dos tumores hereditários (JONES e LAIRD 1999; COSTELLO e PLASS 2001; JONES e BAYLIN 2002; EGGER et al. 2004; BAYLIN e OHM 2006).

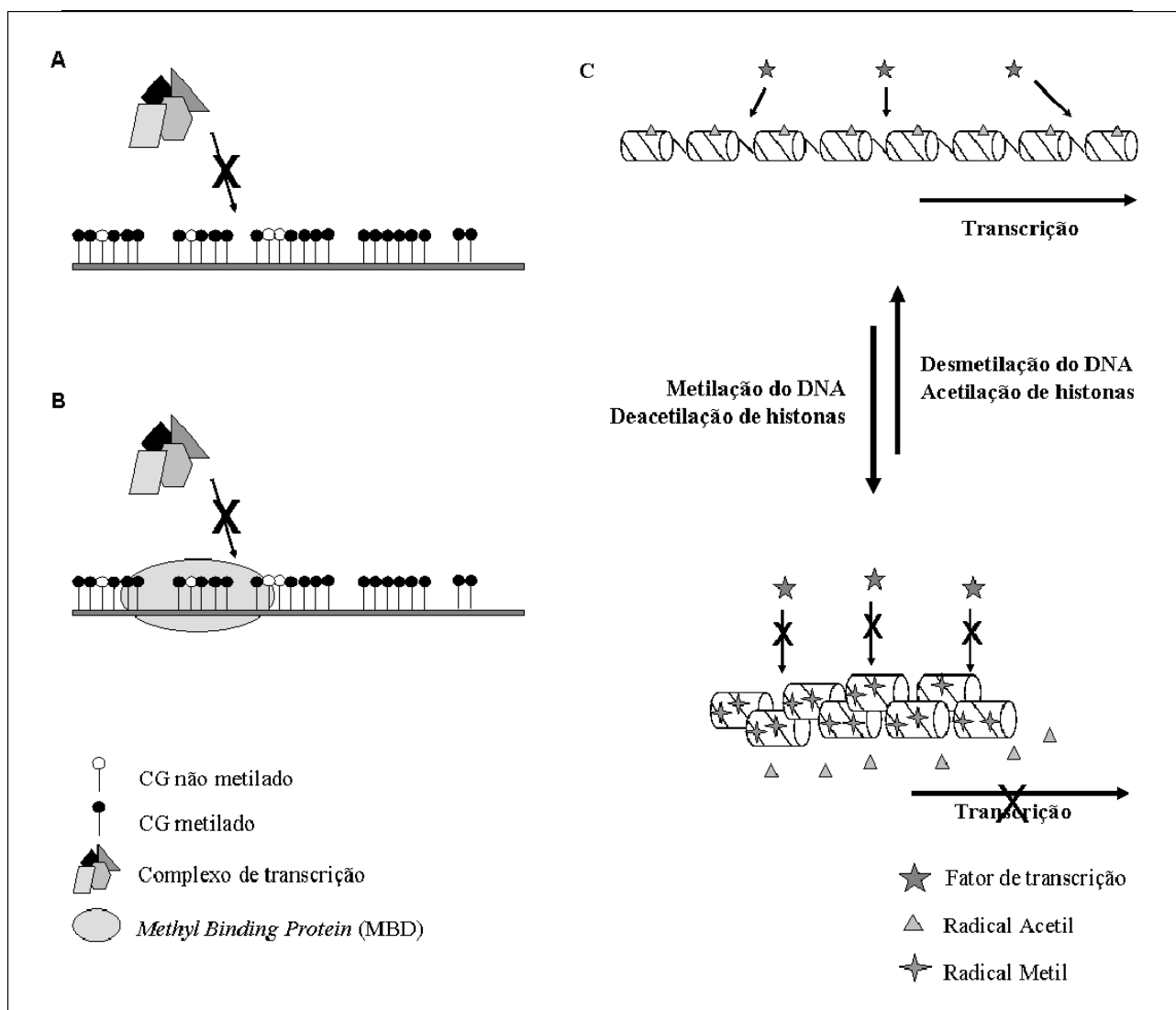


Figura 2 - Silenciamento gênico induzido pela metilação. A figura ilustra as 3 hipóteses aceitas para a inativação da transcrição via metilação. A inibição da transcrição pode ocorrer de maneira direta (A), na qual a própria presença dos radicais metil no DNA impediria a ligação do complexo de transcrição; de maneira indireta (B), a ligação das *metil CpG-binding domain proteins* ao DNA metilado não permitiria que o complexo de transcrição tenha acesso aos seus sítios de ligação no DNA; e através da alteração da conformação da cromatina (C), envolvendo os processos de deacetilação de histonas concomitante com a metilação do, que acarretaria uma maior condensação da cromatina impedindo que os fatores de transcrição reconheçam seus sítios de ligação ao DNA. Em situações normais o DNA encontra-se acetilado e desmetilado e, portanto, menos condensado de forma que os sítios de ligação dos fatores de transcrição estão expostos, permitindo que a transcrição ocorra.

Nos tumores, os genes mais frequentemente metilados são aqueles com atividade supressora tumoral, principalmente, aqueles envolvidos no controle do

ciclo celular; no reparo do DNA; na apoptose; na diferenciação celular; na invasão, metástase e angiogênese; na resistência a drogas; e nas vias de metabolização de carcinógenos (COSTELLO e PLASS 2001; ROBERTSON 2005).

O perfil de hipermetilação de determinados promotores gênicos tem sido avaliado quanto a sua utilidade como marcador tumoral na tentativa de diferenciar os tipos tumorais, determinar o risco para o desenvolvimento do câncer, diagnosticar precocemente tumores, delinear o prognóstico dos pacientes e prever a resposta ao tratamento (BAYLIN e e OHM 2006). Nesse contexto a hipermetilação de promotores gênicos pode ser empregada na prática clínica auxiliando na detecção e na determinação do risco para o desenvolvimento de tumores malignos, uma vez que a metilação já foi descrita em neoplasias em estádios precoces; e na estratificação dos diferentes tipos tumorais, através da determinação do perfil molecular das lesões (LAIRD 2003; BAYLIN e OHM 2006).

Estudos têm demonstrado que a utilização da hipermetilação como marcador tumoral apresenta resultados mais satisfatórios quando avaliados diferentes grupos de genes para cada tipo tumoral. Isso porque algumas ilhas de CpG são preferencialmente metiladas em determinados tipos tumorais. A combinação de diversos marcadores fornece resultados com maior acurácia quando avaliados os parâmetros clínicos uma vez que, de acordo com o perfil de genes hipermetilados, é possível determinar o comportamento biológico do tumor e a evolução do paciente (BAYLIN et al. 2001; COSTELLO e PLASS 2001; SIDRANSKY 2002; ISSA 2004). Com isso é possível criar marcadores para classificar os tumores, sendo que para isso a metilação não precisa estar, obrigatoriamente, associada ao silenciamento do gene (USHIJIMA 2005).

As alterações epigenéticas estão presentes nos estádios pré-malignos e precoces dos tumores, induzindo a expansão das células malignas. Nas fases mais precoces dos tumores colorretais foi possível detectar a presença de hipermetilação, que poderia estar conferindo vantagens para a ocorrência de alterações genéticas e para a progressão desses clones celulares. Dessa forma, a detecção da metilação aberrante em células normais pode permitir a determinação do risco para o desenvolvimento de neoplasias (USHIJIMA 2005; BAYLIN e OHM 2006).

1.3 O CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO E A HIPERMETILAÇÃO

Já foram descritos diversos genes como tendo seus promotores hipermetilados em neoplasias de cabeça e pescoço. Entre esses genes podem ser citados o gene supressor tumoral *P16^{INKa}* (ROSAS et al. 2001; SHINTANI et al. 2001), o gene de reparo de DNA *MGMT* (*O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase*) (ESTELLER et al. 1999a; ROSAS et al. 2001; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000), a ilha de CpG *MINT31* (*Methylated in Tumors 31*) (OGI et al. 2002), o gene *DCC* (*Deleted in Colon Cancer*) (OGI et al. 2002) e o gene *DAPK* (*Death-Associated Protein Kinase*) (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; OGI et al. 2002).

SHINTANI et al. (2001) analisaram 32 carcinomas epidermóides primários de boca e linhagens celulares tumorais derivadas desta neoplasia e identificaram inativação de *P16^{INKa}* por metilação de sua região promotora. A associação entre o padrão de metilação desse gene e as características clínico-patológicas dos pacientes

portadores de carcinomas epidermóides primários de cabeça e pescoço tem sido avaliada por diversos autores (TOYOTA et al. 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ROSAS et al. 2001; OGI et al. 2002). ROSAS et al (2001) correlacionaram a metilação de um painel de genes com a localização do tumor primário e demonstraram que pacientes com carcinomas epidermóides de boca apresentaram maior frequência de hipermetilação no gene *P16^{INKa}*. Além disso, OGI et al. (2002) encontraram associação significativa entre o padrão de metilação do gene *P16^{INKa}* e a idade dos pacientes e com o estágio T (TNM).

O silenciamento transcricional, via hipermetilação do gene *DAPK* foi relatado pela primeira vez em carcinomas da cabeça e pescoço por SANCHEZ-CESPEDES et al. em 2000. Os autores encontraram uma frequência de 18% de tumores primários que exibiram hipermetilação de sua região promotora e verificaram concordância com a frequência de hipermetilação detectada no soro destes pacientes (18%). A hipermetilação do gene *DAPK* foi encontrada significativamente com maior frequência nos carcinomas localizados na orofaringe, apresentando também associação significativa com a evolução da doença.

OGI et al (2002) verificaram o perfil de hipermetilação dos genes *DAPK*, *MINT31* e *DCC* e correlacionaram os achados com as características histopatológicas e biológicas dos carcinomas bucais. A hipermetilação do gene *DAPK* estava associada a sua perda de expressão. A metilação do gene *MINT31* sugere pior prognóstico nos casos de tumores da cavidade oral. No caso do gene *DCC*, observou-se maior frequência de invasão óssea na presença da hipermetilação de sua região promotora.

ESTELLER et al. (1999a) em revisão de genes hipermetilados nos cânceres humanos ressaltaram que a inativação do gene *MGMT* tem sido descrita em vários tipos tumorais, porém sem evidências de mutação, relatando que experimentos em linhagens celulares sugeriram ser a metilação aberrante ou a hipermetilação o único mecanismo responsável pelo silenciamento deste gene. SANCHEZ-CÉSPEDES et al. (2000), analisaram o perfil de metilação de um painel de genes, entre eles o *MGMT*, em 95 carcinomas epidermóides primários da cabeça e pescoço. A frequência de hipermetilação metilação no promotor do gene *MGMT* foi de 33%. Os autores verificaram associação entre a metilação do gene *MGMT* e topografia tumoral, particularmente orofaringe. Os resultados acima relatados foram concordantes com os descritos por ROSAS et al. (2001), que, a partir da análise de 30 amostras de pacientes com carcinomas epidermóides primários da cabeça e pescoço, identificaram o gene *MGMT* metilado em 23% dos tumores primários.

1.4 ESTUDO PRELIMINAR

Em um estudo recente, as frequências de hipermetilação de 9 genes (*P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC*) foram avaliadas em 104 amostras tumorais de carcinomas epidermóides das VADS, provenientes de pacientes tratados cirurgicamente na Johns Hopkins University, Baltimore, EUA (CARVALHO et al. 2004).

A escolha destes genes foi baseada em dados da literatura e na de análise da expressão gênica em linhagens celulares e em amostras tumorais de CE de cabeça e

pescoço (CARVALHO et al. 2004). Estudos anteriores já haviam demonstrado a presença de hipermetilação nos promotores dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, e *DCC* em amostras de CE de cabeça e pescoço (ESTELLER et al. 1999a; ESTELLER 2000; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ROSAS et al. 2001; SHINTANI et al. 2001; OGI et al. 2002). Os outros 5 genes foram selecionados porque experimentos de se cDNA *microarray* demonstraram que sua expressão encontra-se silenciada em CE de cabeça e pescoço e o tratamento com o agente desmetilante 5-aza-deoxicitidina permitiu a re-expressão dos mesmos.

Todos os 9 genes selecionados para este estudo são genes supressores tumorais ou genes com função pouco conhecida, mas que são candidatos a supressores de tumor.

O gene *AIM-1* (*absent in melanoma*), localizado na região 6q21, é um gene cuja função é desconhecida. Sua expressão parece estar associada com a tumorigênese do melanoma maligno. Embora em células de melanoma não seja possível se detectar a expressão do *AIM-1*, em linhagens celulares de melanoma transfectadas com a região cromossômica 6q21 pode-se observar supressão tumoral e a expressão deste gene (RAY et al. 1997; RAJINI et al. 2003).

O gene *CCNA1* (*cyclin A1*), é altamente expresso em testículo, sendo que outros tecidos sua expressão é menor. A *CCNA1* é essencial na progressão celular para a fase de metáfase da meiose, através da ligação à CDK2 (quinase ciclina dependente 2). Sua função é pouco conhecida, sendo que até o momento a ausência de expressão desse gene foi associada somente à infertilidade em camundongos machos (YANG et al. 1999; MÜLLER et al. 2004; KITKUMTHORN et al. 2006). Diversos fatores sugerem que essa Ciclina seja um candidato a supressor tumoral.

Em CE de cabeça e pescoço foi possível observar a hipoexpressão desse gene e a hipermetilação de seu promotor (TOKUMARU et al. 2004). Sendo que em células somáticas a presença de hipermetilação está correlacionada à ausência de expressão (MÜLLER et al. 2000). Além disso, a *CCNA1* parece participar do processo de reparo à quebra na dupla fita do DNA (MÜLLER-TIDOW et al. 2004).

A atividade supressora tumoral do gene *DAPK* (*death associated protein kinase*) parece estar associada ao controle positivo da apoptose, no entanto esse mecanismo pró-apoptótico ainda não foi elucidado. Diversas evidências sugerem o papel desse gene na supressão tumoral, devido a detecção da sua perda de expressão, através da hipermetilação do promotor, e da sua associação com a inibição de metástases (INBAL et al. 2000; WANG et al. 2002; CHEN et al. 2005). A hipermetilação do promotor de *DAPK* já foi descrito para diversos tumores, incluindo os CE de cabeça e pescoço. A hipermetilação desse gene em CE de cabeça e pescoço pode ser detectada em 7% a 67% dos tumores (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ROSAS et al. 2001; HASEGAWA et al. 2002; OGI et al. 2002; MARUYA et al. 2004; KONG et al. 2005; HA e CALIFANO 2006).

O gene *DCC* foi inicialmente descrito como um gene supressor de tumor localizado na região cromossômica 18q, freqüentemente deletada em carcinomas colorretais, mas também em outros tumores. A atividade da proteína DCC, na supressão da tumorigênese, parece estar relacionada a ativação de caspases e a inibição de CDK1 (quinase ciclina dependente 1) (INOKUCHI et al. 2002). A expressão do gene *DCC* em carcinomas colorretais está reduzida ou ausente em mais de 50% desses tumores. Em outras malignidades (tumores gástricos, de próstata, de endométrio, esofágicos) a hipoexpressão desse gene também já foi observada

(KOLODZIEJ et al. 1997; FORCET et al. 2001; MEHLEN AND FEARON 2004). As alterações genéticas associadas a essa perda de expressão do *DCC* ainda são pouco conhecidas (KOLODZIEJ et al. 1997). Um dos mecanismos envolvidos com esta perda de expressão é a hipermetilação de seu promotor, verificado em neoplasias hematológicas e no CE da cavidade oral (OGI et al. 2002; NAKAYAMA et al. 2005). Apesar da perda de expressão em diversos tumores, a atividade supressora de tumor do gene *DCC* ainda não foi esclarecida.

A hipermetilação do promotor do gene *ESR* (*estrogen receptor*) já foi descrita em alguns os tumores colorretais e de próstata (LI et al. 2004; BELSHAW et al. 2005). O gene *ESR* é um candidato a gene supressor tumoral uma vez que tem papel na inibição do desenvolvimento de metástases em pacientes com câncer de mama e também na supressão da proliferação celular *in vitro*. No entanto, sua função específica ainda não foi determinada (LI et al. 2004). O *ESR* pertence à superfamília dos receptores nucleares que regulam a transcrição através de sua ligação ao DNA e interação com hormônios esteróides, mediadores e co-fatores da transcrição (THENOT et al. 1999; AZUMA et al. 2004; PENOLAZZI et al. 2004).

O gene *MGMT* (*O⁶-methylguanine DNA methyltransferase*) codifica uma proteína que atua no reparo ao DNA, removendo radicais alquila do O⁶ de guaninas. A adição de radicais alquila ao oxigênio da posição 6 (O⁶) de guaninas é uma importante fonte de mutações pois a O⁶-metil-guanina, durante a replicação do DNA, parecia com timina e não com citosina, acarretando a troca de pares guanina-citosina por adenina-timina. Além disso, a O⁶-metil-guanina pode formar ligações cruzadas com citosinas da fita de DNA complementar, impedindo a replicação do DNA. A proteína *MGMT* participa do reparo ao DNA transferindo os grupos alquila do O⁶-

guanina para um sítio aceptor de cisteína na sua própria estrutura, a proteína então se desliga do DNA e é degradada por ubiquitinação (ESTELLER et al. 2000; ZUO et al. 2004). Até o momento o único mecanismo conhecido para a inativação do gene *MGMT* em tumores (gliomas, colorretal, pulmão, cabeça e pescoço, linfoma, melanoma, pâncreas, leucemias, bexiga, renal) é a hipermetilação (ESTELLER et al. 1999b; ZUO et al. 2004). A inativação de *MGMT* tem sido associada à melhor resposta ao tratamento de tumores com agentes quimioterápicos alquilantes, de forma que pode ser empregado como marcador de resposta ao tratamento (ZUO et al. 2004; DANAM et al. 2005). A hipermetilação do gene *MGMT* já foi descrita para em 23% a 52% dos CE de cabeça e pescoço e presença de metilação no promotor desse gene pôde ser correlacionada, à sobrevida global e livre de doença (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ROSAS et al. 2001; MARUYA et al. 2004; ZUO et al. 2004; HA e CALIFANO 2006).

O gene *TIMP-3* (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 3*), assim como as demais TIMPs, tem como função principal inibir a atividade das MMPs (*matrix metalloproteinases*) que degradam a matriz extracelular. Dessa maneira, *TIMP-3* e os outros membros da família regulam funções dependentes da composição da matriz extracelular: invasão, migração celular, diferenciação e proliferação (YU et al. 2000; BOND et al. 2002). A hiper-expressão das TIMPs está associada à supressão do crescimento local e metastático do tumor. No entanto, no caso do gene *TIMP-3* outras funções parecem estar associadas a sua atividade supressora de tumor, dentre elas indução da apoptose; e inibição do crescimento tumoral, da capacidade de invasão do tumor, da migração celular e da angiogênese (SPURBECK et al. 2002). A

alteração do equilíbrio entre MMPs e TIMPs está associada à invasão tumoral e desenvolvimento de metástases (BOND et al. 2002).

A proteína codificada pelo gene *P16^{INKa}* (ou *CDKN2a – cyclin dependent kinase inhibitor 2a*), localizado no cromossomo 9p21, participa da via da proteína RB, ou seja, atua no controle do ciclo celular. A proteína P16 impede a progressão do ciclo celular, se ligando às CDK4 e CDK6 (quinases ciclina dependentes 4 e 6) e impedindo a formação do complexo CDK4/6-ciclina D. A atividade desse complexo é essencial para hiperfosforilação da proteína RB, que permite sua dissociação dos fatores de transcrição da família E2F e o início da replicação, promovendo a progressão da fase G1/S do ciclo celular (EL-NAGGAR et al. 1999; MIRACCA et al. 1999; KRESTY et al. 2002; AI et al. 2003; SMIGIEL et al. 2004). Portanto, a inativação de *P16^{INKa}* acarreta a perda do controle da proliferação celular. Nos CE de cabeça e pescoço, a inativação do *P16^{INKa}* pode ser consequência de mutações, deleções homozigóticas e hipermetilação, sendo este último o evento mais freqüente (CODY et al. 1999; HUANG et al. 2002; YUEN et al. 2002). A perda de expressão de *P16^{INKa}*, associada a hipermetilação, parece estar presente em praticamente todos os tipos tumorais, mas parece ser mais freqüente nos subtipos epidermóides (NUOVO et al. 1999). Além disso, é descrita como um evento precoce nos CE das VADS (AI et al. 2003). A avaliação da expressão do gene *P16^{INKa}* em amostras de CE de cabeça e pescoço mostra elevadas freqüências de perda de expressão desse gene (59% a 83%) (REED et al. 1996; MIRACCA et al. 1999). A hipermetilação do gene *P16^{INKa}* é um evento bastante estudado nos CE das VADS e já foi detectada em 27% a 58% desses tumores (SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; ROSAS et al. 2001;

HASEGAWA et al. 2002; OGI et al. 2002; MARUYA et al. 2004; HA e CALIFANO 2006)

O locus *MINT31* (*methyalted in tumors 31*), compreende uma ilha de CpG e está situado no cromossomo 17q21, alvo freqüente de perda de heterozigose em diversos tumores. Essa região parece estar envolvida no controle transcricional de diversos genes ainda não identificados (TOYOTA et al. 1999; OGI et al. 2002).

Este estudo foi realizado empregando-se a técnica de PCR quantitativo específica para metilação (QMSP). Desta forma, a hipermetilação de pelo menos um dos genes foi detectada em 101 (97,1%) amostras. Os genes com as maiores freqüências de metilação foram *DCC* (78,8%), *DAPK* (74,0%), *ESR* (70,2%) e *TIMP-3* (70,2%) (Tabela 1).

Também foi possível correlacionar o perfil de hipermetilação de alguns dos genes estudados com dados clínico-patológicos, como sítio tumoral, e epidemiológicos (tabaco e álcool). Para o gene *DAPK* foi encontrada maior freqüência de hipermetilação (70,8%) em pacientes etilistas ($p=0,047$). Além disso, a hipermetilação do gene *CCNA1* foi detectada com maior freqüência em pacientes tabagistas ($p=0,008$). A hipermetilação dos genes *DAPK*, *TIMP-3* e *CCNA1* foi correlacionada a maior freqüência de tumores de orofaringe no grupo estudado ($p=0,045$; $p=0,028$; $p=0,069$; respectivamente).

Tabela 1 – Perfil de hipermetilação em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Gene	Frequência de hipermetilação
<i>DCC</i>	82 (78,8%)
<i>DAPK</i>	77 (74,0%)
<i>ESR</i>	73 (70,2%)
<i>TIMP-3</i>	73 (70,2%)
<i>CCNA1</i>	63 (60,6%)
<i>MINT31</i>	39 (37,5%)
<i>MGMT</i>	28 (26,9%)
<i>AIM-1</i>	20 (19,2%)
<i>P16^{INKa}</i>	16 (15,4%)

Frequências de hipermetilação de promotores gênicos para as amostras avaliadas no estudo de CARVALHO et al. (2004).

1.5 ANÁLISE DE AMOSTRAS INCLUÍDAS EM PARAFINA

No estudo preliminar de CARVALHO e colaboradores (2004) a maior parte das amostras era constituída por tecido submetido à congelação imediata, após a ressecção cirúrgica. Apenas 10, dos 104 casos, eram tumores incluídos em parafina. No presente estudo foram avaliados somente casos incluídos em parafina.

A extração de DNA de amostras submetidas à fixação para inclusão em parafina é um processo laborioso que demanda diversos cuidados e etapas de desparafinização e lavagens sucessivas das amostras, para a reidratação e eliminação de resíduos que possam interferir nas etapas seguintes de análise das amostras através

de abordagens de biologia molecular. Além disso, o processo de fixação das amostras pode causar danos às moléculas de ácidos nucleicos acarretando a fragmentação do DNA e do RNA, de forma que na maioria das vezes o material obtido após a extração é escasso e de baixa qualidade, permitindo a análise de fragmentos curtos de ácidos nucleicos com confiabilidade (GILLESPIE et al. 2002; ZSIKLA et al. 2004; COURA et al. 2005).

Nesse estudo, diversos parâmetros foram otimizados nas diversas etapas com a finalidade de minimizar possíveis interferências associadas ao processo de fixação das amostras e inclusão em parafina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo visou avaliar a hipermetilação das regiões promotoras dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* em amostras tumorais de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, objetivando avaliar a sua utilidade da determinação do padrão de hipermetilação destes genes como marcador molecular para esses tumores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos desse estudo foram:

- Padronizar a metodologia de PCR quantitativa específica para metilação (QMSP) em amostras incluídas em parafina, visando a otimização (1) das condições de extração de DNA mais adequadas para obtenção de material de boa qualidade para as reações de QMSP; (2) das concentrações de reagentes para o tratamento com bissulfito de sódio, com a finalidade de obter eficiência adequada que permitisse a avaliação do perfil de hipermetilação das amostras; (3) das concentrações adequadas de reagentes e das condições de amplificação das reações de QMSP.

- Determinar o perfil de hipermetilação da região promotora dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* em tumores primários de carcinoma epidermóide das VADS provenientes de pacientes tratados cirurgicamente pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A. C. Camargo, no período de 1995 a 2000.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente, sob o número 741/05, em 29 de setembro de 2005.

3.2 LEVANTAMENTO DOS CASOS E COLETA DAS AMOSTRAS

Foram levantados 104 casos de carcinomas epidermóides primários das vias aerodigestivas superiores dentre aproximadamente 1600 pacientes tratados cirurgicamente pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1995 a 2000. Esses casos foram levantados a partir de um banco de dados existente no Departamento no qual constam todos os pacientes submetidos a tratamento para tumores da região da cabeça e pescoço na instituição.

No estudo, foram incluídas as amostras que respeitassem os seguintes critérios:

- Pareamento por sítio tumoral e idade com as amostras do estudo preliminar de CARVALHO et al. (2004);
- Disponibilidade de amostra tumoral incluída em parafina no Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo;

- Quantidade suficiente de tecido no bloco de parafina para a confecção de cortes de parafina.

3.3 REVISÃO DOS CASOS E DEMARCAÇÃO DA ÁREA TUMORAL

Todas as amostras selecionadas foram submetidas à revisão diagnóstica por um patologista do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo (HCACC). Em todos os casos foi confirmado o diagnóstico de carcinoma epidermóide das vias aerodigestivas superiores.

Após a revisão, foram confeccionadas novas lâminas com coloração de hematoxilina-eosina para a demarcação da área mais representativa do tumor, excluindo-se áreas de necrose, calcificações e tecido não-tumoral. As áreas tumorais foram marcadas na própria lâmina contendo o corte histológico.

3.4 MICRODISSECÇÃO MANUAL DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO DNA

Para a microdissecção manual das amostras foram confeccionados, para cada um dos casos, 10 cortes histológicos com 5µm de espessura. Nenhuma coloração foi aplicada às amostras. Nessa etapa, a área tumoral foi raspada com lâmina de bisturi e colocada em microtubos de 1,5mL.

Para a extração do DNA foi empregado o método de digestão das amostras com proteinase K (PK) e extração do DNA com fenol-clorofórmio, seguindo os seguintes passos:

1. as amostras microdissecadas foram incubadas com 750 μ L de xilol por 2 horas a 48°, para desparafinização;
2. as amostras foram reidratadas com lavagens seqüenciais de etanol 100%, 70% e 50%;
3. as amostras foram incubadas em 300 μ L de solução de SDS-PK1% (SDS 1%, 100mg de PK e TE pH9,0 q.s.p. 100mL – 10mM de Tris-HCl pH9,0; 2,5mM de EDTA pH8,0; 62,5mM de NaCl) por 48 horas a 48°C;
4. a cada 8 horas foram adicionados 20 μ L de solução PK 20% (100mg de PK e 5mL de TE pH9,0);
5. a digestão com PK foi seguida por extração com 1 volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1);
6. as amostras foram então precipitadas com a adição de 650mM de acetato de amônio, 0,040mg de glicogênio e 2,5 volumes de etanol 100% e incubação por 12 horas a -20°C;
7. após centrifugação por 30 minutos a 4°C a 12.000rpm, as amostras de DNA foram lavadas com etanol 70% e submetidas a nova centrifugação;
8. os *pellets* de DNA secaram à temperatura ambiente e foram ressuspensos em 30 μ L de água e armazenados a -20°C.

Após a extração, a quantidade de DNA das amostras foi quantificada por espectrofotometria utilizando o equipamento *Nanodrop*. Para verificar a integridade

das amostras extraídas foi realizada PCR utilizando iniciadores para o gene β -*ACTINA* (Tabela 2), que amplificam um fragmento de 133 pares de bases (pb).

Tabela 2 – Sequência dos iniciadores para amplificação do gene β -*ACTINA* empregados para verificar a integridade das amostras de DNA.

GENE	INICIADOR SENSE (5'-3')	INICIADOR ANTISENSE (5'-3')
β - <i>ACTINA</i>	TGGTGATGGAGGAGGCTCAGCAAGT	AGCCAATGGGACCTGCTCCTCCCTTGA

Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 1X tampão de PCR, 1,5mM de MgCl₂; 0,2mM de dNTPs; 0,3μM de cada iniciador; 1,0U de *Taq DNA Polymerase (Invitrogen)* e 100ng de DNA em um volume final de reação de 25μl. O programa de PCR utilizado foi: 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 66°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto; 72°C por 7 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados as amostras foram aplicadas em gel de eletroforese de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata (SANGUINETTI et al. 1994).

3.5 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

No tratamento com bissulfito de sódio ocorre a conversão das citosinas não metiladas em uracilas, por deaminação. As citosinas metiladas são protegidas da conversão e permanecem como citosinas. Durante a amplificação, as uracilas são convertidas em timinas (Figura 3).

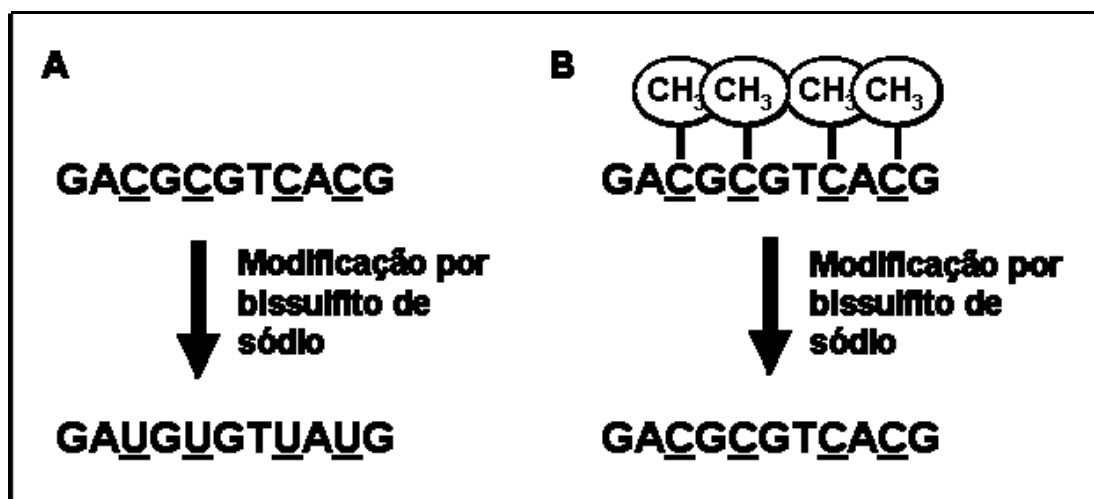


Figura 3 - Modificação do DNA durante o tratamento com bissulfito de sódio. As citosinas não metiladas são convertidas em uracilas (A) e as citosinas metiladas são protegidas do tratamento e permanecem como citosinas (B).

Para o tratamento com bissulfito de sódio foi utilizado o protocolo descrito por JERONIMO et al. (2001) com modificações. Nesse protocolo, 2µg de DNA foram denaturados com NaOH 0,3M e *Hering Sperm DNA* 0,5µg/µL, em um volume final de 20µL, por 20 minutos a 50°C. Em seguida foram adicionados às amostras 500µL de solução de bissulfito de sódio (bissulfito de sódio 2,7M; hidroquinona 135mM e NaOH 380mM) e as mesmas foram incubadas por 3 horas a 70°C. O DNA convertido foi purificado utilizando o kit *Wizard DNA Clean-up* (Promega), segundo instruções do fabricante, e eluído em 45µL de água a 80°C. As amostras eluídas foram submetidas a desulfonação com NaOH 0,3M por 10 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se incubação com acetato de amônio 790mM por 5 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, na etapa de precipitação, o DNA foi incubado por 12 horas a -20°C em 2,5 volumes de etanol 100% e 1µL de glicogênio 20mg/mL. Após centrifugação de 30 minutos a 4°C a 12.000rpm o sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado em 500µL de etanol 70%. O *pellet* formado foi seco a

temperatura ambiente por duas horas, ressuspendido em 110 μ L de água e estocado a -80°C .

3.6 EXTRAÇÃO, METILAÇÃO *IN VITRO* E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO DE DNA DE LINFÓCITOS

O DNA de linfócitos metilado *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio foi empregado como controle positivo das reações de QMSP e para a construção das curvas padrão.

Duas alíquotas de 20mL de sangue periférico foram submetidas à centrifugação (em tubo Falcon de 15mL) para separação do soro e da porção celular, o primeiro foi retirado e estocado a -80°C . À porção celular foi adicionada solução de Tris-EDTA pH8,0 1X (TE 1X) – 10mM Tris-HCl pH8,0 e 1mM EDTA pH8,0 – em volume suficiente para 15mL, para lise das hemácias, seguida de centrifugação por 5 minutos a 1.500rpm. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi submetida à nova lavagem com solução de TE 1X. Novamente o sobrenadante foi descartado e o pellet de linfócitos foi ressuspendido em 1mL de TE 1X e transferido para tubo de 1,5mL. A amostra foi submetida a nova centrifugação por 1 minuto a 13.000rpm e o sobrenadante foi descartado.

Para a obtenção do DNA foi utilizado o protocolo de digestão com PK e extração do DNA com fenol-clorofórmio, semelhante ao utilizado para as amostras de parafina excluindo-se a etapa de desparafinização com xilol. Em seguida foi

realizada quantificação do DNA por espectrofotometria (*Nanodrop*) e a integridade do DNA foi verificada com PCR para o fragmento de 133pb do gene β -*ACTINA*.

A metilação *in vitro* do DNA de linfócitos foi realizada com o kit *CpG Methylase-SssI* (*New England Biolabs*), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, o volume final da reação foi de 250 μ L contendo 20 μ g de DNA, 0,032mM de S-adenosilmetionina (SAM - doador de radicais metil) e 25 unidades de enzima metilase. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C, período após o qual foi adicionado 0,064mM de SAM e 12,5 unidades da enzima metilase. Após nova incubação de 4 horas a 37°C, as amostras foram submetidas a extração com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol. Os pellets formados foram secos a temperatura ambiente e ressuspensos em 15 μ L de água e o DNA metilado foi estocado a -20°C.

Vinte alíquotas de 2 μ g de DNA metilado *in vitro*, foram tratadas com bissulfito de sódio. Na etapa de ressuspensão das amostras, cada grupo de 10 *pellets* foi ressuspendido em 10 μ L de água. As amostras foram quantificadas e se necessário diluídas para obter a concentração de 30ng/ μ L.

3.7 PCR QUANTITATIVA ESPECÍFICA PARA METILAÇÃO (QMSP)

A QMSP é uma abordagem quantitativa baseada na PCR em tempo-real. Nessa abordagem são utilizados um par de iniciadores e uma sonda específica marcada com 2 fluoróforos: um *reporter* (6-carboxi-fluoresceína – FAM), na

extremidade 5', e um *quencher* (6-carboxi-tetrametil-rodamina – TAMRA), na extremidade 3'. O *reporter*, é o emissor de fluorescência, captada pelo segundo fluoróforo (*quencher*), devido a proximidade entre ambos. Durante a reação de PCR, a atividade de exonuclease da *Taq* DNA Polimerase hidrolisa a sonda, separando o *reporter* do *quencher*, e a fluorescência emitida pode, então, ser captada pelo aparelho. O nível de fluorescência detectado pelo aparelho é proporcional à quantidade de produto amplificado formado. A quantidade de amostra pode ser inferida tendo como base o C_T . O valor do C_T representa o ciclo da PCR em que a quantidade de fluorescência produzida na reação atinge um limite pré-estabelecido. Para que as amostras possam ser quantificadas baseadas no C_T é necessária a construção de uma curva padrão, a partir da diluição seriada de uma mesma amostra de DNA, na qual o C_T diminui linearmente de acordo com o aumento da quantidade de DNA. Baseado nos dados da curva padrão é possível determinar a quantidade de DNA amplificado em cada amostra utilizando o valor do C_T . Os dados referentes à quantificação da amostra amplificada são calculados pelo próprio aparelho de PCR em tempo-real (BUSTIN 2000; EADS et al. 2000). Como referência interna das reações foi utilizado o gene *β -ACTINA*, cujos iniciadores e sondas foram desenhados em região livre de nucleotídeos CG (Tabela 2). A amplificação do gene referência ocorre independentemente da presença ou ausência de metilação, no entanto a amplificação dos genes alvo é proporcional ao nível de metilação presente em seus promotores pois os iniciadores e sondas possuem em suas seqüências dinucleotídeos CG (JERONIMO et al. 2001; HARDEN et al. 2003; JERONIMO et al. 2004).

Antes de iniciar a avaliação do perfil de hipermetilação dos genes alvo foi realizada a padronização da reação de QMSP. Foram otimizados parâmetros

referentes ao tampão de reação utilizado (*Master Mix Applied Biosystems* X tampão preparado no laboratório), às concentrações dos iniciadores e da enzima *Platinum Taq Polimerase (Invitrogen)*.

Inicialmente, foi avaliado separadamente se o tampão de reação poderia interferir no processo de amplificação. Foram realizadas reações de QMSP utilizando-se amostras de DNA de linfócitos metilado *in vitro*, iniciadores e sonda para o gene da gene β -*ACTINA* e *Master Mix (Applied Biosystems)* ou tampão preparado no laboratório. No primeiro caso a preparação das reações seguiu as instruções do fabricante (1X *TaqMan Universal PCR Master Mix*, 200nM de cada um dos iniciadores; 60nM de sonda e 1 μ L de DNA), para o tampão preparado no laboratório as condições foram as seguintes: 1X tampão; 200nM de dNTP; 600nM de cada um dos iniciadores; 200nM de sonda; 0,75 unidade de *Platinum Taq Polimerase (Invitrogen)*; e 3 μ L de DNA. As condições de amplificação foram as mesmas nos dois casos: 95°C durante 10 minutos e de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 40 segundos.

O passo seguinte foi avaliar qual seria a melhor concentração de iniciadores e enzima. Foram testadas diferentes concentrações de iniciadores (0,6 μ M; 1,2 μ M e 3,6 μ M combinadas com diferentes concentrações de enzima (0,75U; 1,5U; 2,25U e 3,75U), como descrito na (Tabela 3).

Tabela 3 – Combinações das quantidades de iniciadores e enzima *Platinum Taq Polimerase* testadas durante as padroizações das reações de QMSP.

Concentração de iniciadores	Concentração de <i>Platinum Taq Polimerase</i>
0,6μM	0,75 unidade
0,6μM	1,5 unidade
0,6μM	2,25 unidades
0,6μM	3,75 unidades
1,2μM	0,75 unidade
1,2μM	1,5 unidade
1,2μM	2,25 unidades
1,2μM	3,75 unidades
3,6μM	0,75 unidade
3,6μM	1,5 unidade
3,6μM	2,25 unidades
3,6μM	3,75 unidades

As reações de amplificação para o gene *β-ACTINA* e para os genes alvo (*P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC*), após a padronização, foram realizadas em um volume total de 20μL contendo 1X tampão (sulfato de amônio 16,6mM, Tris-HCl 67mM, cloreto de magnésio 6,7mM, β-mercaptoetanol 10mM, DMSO 0,1%), 200nμM de dNTP, 1,2μM de cada um dos iniciadores, 1X *Rox Dye Reference*, 200nM de sonda, 0,75 unidade de *Platinum Taq Polimerase* (Invitrogen) e 3μL de DNA tratado com bisulfito de sódio. As condições de amplificação foram: uma etapa inicial de denaturação a 95°C durante 10 minutos,

seguida de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 40 segundos. Todas as reações foram preparadas em placas de 96 *wells* e todas as amostras foram analisadas em triplicatas no aparelho 7500 *Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*). Para o gene *P16^{INKa}* a concentração de cloreto de magnésio presente no tampão de reação 1X foi de 2,5mM.

Além das amostras, para cada reação foi construída uma curva padrão a partir da diluição seriada de uma mesma amostra de DNA. Nesse estudo, foi utilizado DNA de linfócitos metilado *in vitro*, submetido ao tratamento com bissulfito de sódio. Para a construção das curvas foram amplificados 6 pontos de diluição cujas concentrações eram de 90ng; 9ng; 0,9ng; 0,09ng; 0,009ng e 0,0009ng.

Os iniciadores e sondas (Tabela 4) para todos os genes alvo foram desenhados em regiões que continham dinucleotídeos CG e considerando somente a sequência metilada.

Antes da realização das reações de QMSP foram verificadas as eficiências de amplificação de todos os conjuntos de iniciadores e sondas. Para tanto, foram construídas curvas padrão para cada um dos genes, incluindo o gene referência. Essas curvas foram construídas a partir de uma diluição seriada (como descrita acima) de uma mesma amostra de DNA de linfócitos metilado *in vitro*. Após a amplificação a eficiência foi calculada através da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$, onde E é a eficiência e *slope* é a inclinação da reta formada pelos pontos da curva padrão, este valor é fornecido pelo próprio aparelho de PCR em tempo-real.

As amostras foram consideradas metiladas quando foi possível detectar amplificação em pelo menos duas das triplicatas. A ausência de amplificação ou amplificação de apenas uma das triplicatas indicava amostras não metiladas. O

cálculo do nível de metilação foi realizado com base na quantificação das amostras determinada pela curva padrão. Para esse cálculo foi obtida a razão entre a quantidade de amostra amplificada para o gene alvo e para o gene β -*ACTINA* que em seguida foi multiplicada por 100 (quantidade do gene alvo/quantidade do gene β -*ACTINA* X 100), gerando dados percentuais (HARDEN et al. 2003; JERONIMO 2004). Com os dados obtidos foram construídos gráficos de dispersão para cada um dos 9 genes alvo.

3.8 LEVANTAMENTO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Os dados clínico-patológicos e epidemiológicos dos pacientes foram coletados dos prontuários médicos seguindo uma ficha padronizada (Anexo 2) pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Os dados foram coletados através de levantamento de prontuários no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Foram levantados dados referentes a idade do paciente, sexo, raça (branco ou negro), tempo de seguimento, consumo de tabaco e álcool, sítio tumoral, conduta terapêutica, laudo da anatomia patológica (grau, presença de infiltração, comprometimento linfonodal), evolução do paciente (recidiva loco-regional, metástase, segundo tumor primário e situação do paciente).

Tabela 4 – Sequências de iniciadores e sondas utilizados nas reações de QMSP para o gene referência (*β-ACTINA*) e para os genes alvo.

GENE	INICIADOR SENSE (5'-3')	SONDA (5' FAM-3' TAMRA)	INICIADOR ANTISENSE (5'-3')
<i>β-ACTINA</i>	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	ACCACCACCCAACACACAATAACAAACACA	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA
<i>AIM-1</i>	CGCGGGTATTGGATGTTAGT	GGGAGCGTTGCGGATTATTCGTAG	CCGACCCACCTATACGAAAA
<i>CCNA1</i>	TCGCGGCGAGTTTATTCG	CGTTATGGCGATGCGGTTTCGG	CCGACCGCGACAAACG
<i>DAPK</i>	GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC	TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGGTTTGG	CCCTCCCAAACGCCGA
<i>DCC</i>	TTGTTCGCGATTTTGGTTTC	GCGCTAAACAAAAAACTCCGAAAA	ACCGATTACTTAAAAATACGCG
<i>ESR</i>	GGCGTTCGTTTTGGGATTG	CGATAAAACCGAACGACCCGACGA	GCCGACACGCGAACTCTAA
<i>MGMT</i>	CGAATATACTAAAACAACCCGCG	AATCCTCGCGATACGCACCGTTTACG	GTATTTTTTCGGGAGCGAGGC
<i>MINT31</i>	GAGTGATTATTAGGTTTCGTC	ACGCCGAAAAACACTTCCCCAAC	CGAAAACGAAACGCCGCGA
<i>P16^{INKa}</i>	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	AGTAGTATGGAGTCGGCGGCGGG	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
<i>TIMP-3</i>	GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	AACTCGCTCGCCCGCCGAA	CTCTCCAAAATTACCGTACGCG

Nos casos de tabagismo e etilismo foram considerados unicamente os dados presentes no prontuário preenchido pelo corpo clínico do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. Não foram coletados dados referentes à dose consumida e nem o período, somente se o paciente em algum momento declarou ser tabagista ou etilista.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico *SPSS 10.0 for Windows*

Para comparação dos dados clínico-demográficos e da frequência de metilação, para cada gene entre os pacientes tratados nas duas instituições, foram utilizados os testes de Qui-quadrado e exato de Fischer. A representação gráfica dos níveis de metilação para cada gene foi realizada com um gráfico de dispersão, agrupando-se os pacientes de cada instituição. A avaliação da correlação entre a presença de hipermetilação para cada gene e as variáveis clínico-demográficas foi realizada utilizando-se todo o grupo de pacientes e aplicando-se os testes estatísticos de qui-quadrado e exato de Fischer.

A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR QUANTITATIVA ESPECÍFICA PARA METILAÇÃO (QMSP)

Quando a reação foi preparada com *Master Mix* não houve amplificação adequada. No entanto o resultado foi positivo quando utilizou-se o tampão preparado no laboratório (Figura 4). A partir deste resultado, foi descartada a utilização do reagente *Master Mix*, e as padronizações prosseguiram com a utilização do tampão preparado no laboratório.

Após os testes com as diferentes concentrações de iniciadores e de enzima *Platinum Taq* Polymerase (Invitrogen), as concentrações ideais de iniciadores e de enzima observadas foram 1,2 μ M e 0,75 unidades, respectivamente. Não foram observadas alterações nas curvas de amplificação quando foram utilizadas maiores concentrações de iniciadores e enzima. Dessa forma, como os resultados obtidos foram idênticos, as reações foram realizadas utilizando as menores quantidades de iniciadores e enzima possíveis.

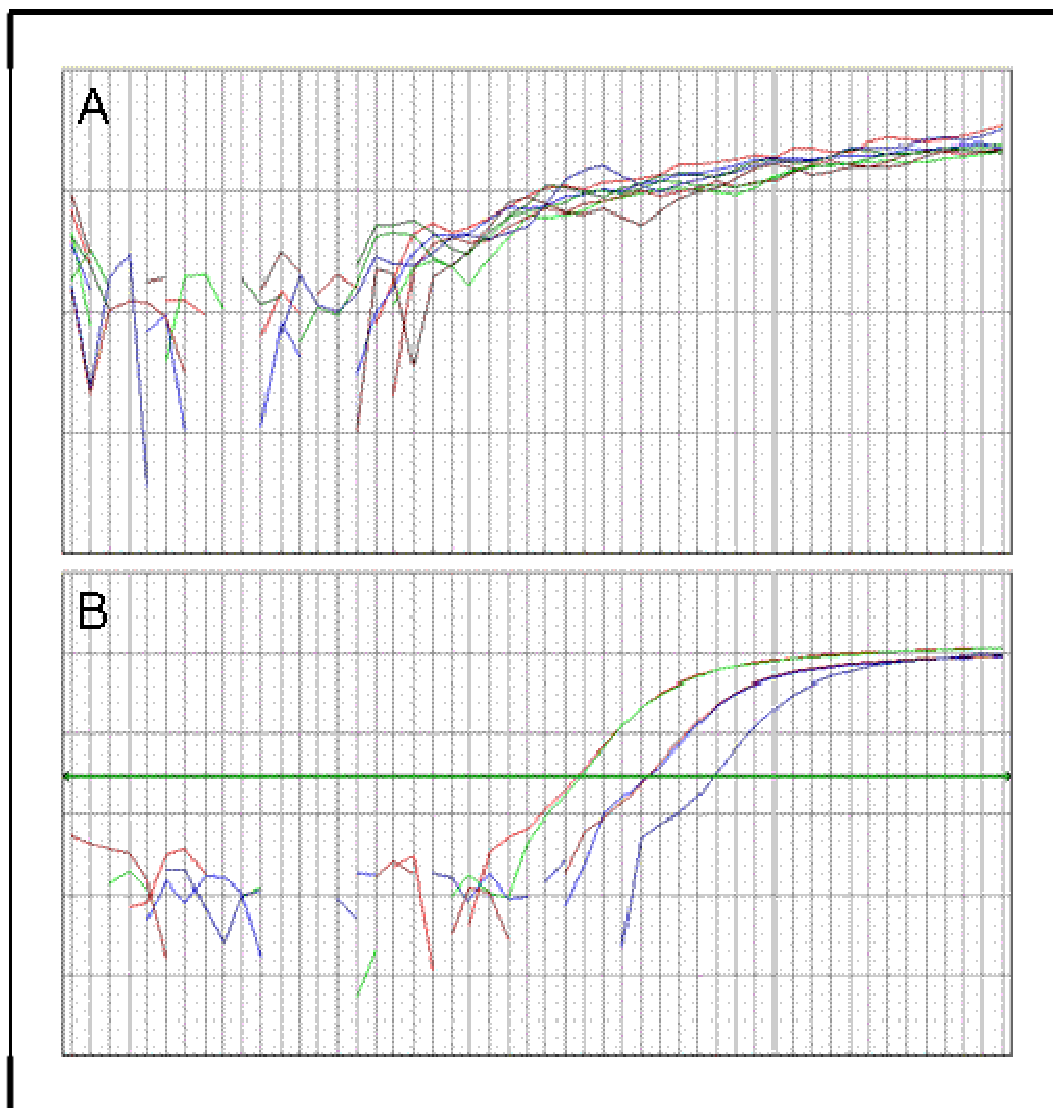


Figura 4 – Gráficos das curvas de amplificação para a padronização do tampão de reação para as reações de QMSP. Não foi possível obter a amplificação do fragmento do gene β -*ACTINA* quando as reações foram preparadas com o tampão comercial *Master Mix* (A), no entanto os pontos de diluição amplificaram satisfatoriamente quando empregado o tampão *Home Made* (B)

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Das 104 amostras selecionadas a partir do banco de dados do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, 69 amostras obedeciam os critérios de inclusão no estudo.

Todas as 69 amostras selecionadas foram microdissecadas manualmente e submetidas à extração do DNA utilizando o protocolo de digestão com PK e extração com fenol-clorofórmio. As quantidades das amostras de DNA obtidas variaram entre 15µg e 35µg. Em seguida, a integridade das amostras foi verificada através da amplificação de um fragmento do gene da β -ACTINA (Figura 5). Todas as amostras amplificaram o fragmento de 133pb demonstrando que a integridade do DNA era adequada para os experimentos seguintes.

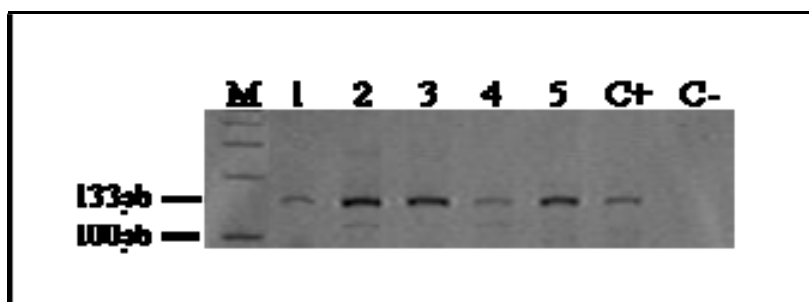


Figura 5 - Gel de eletroforese representativo da PCR para teste da integridade do DNA. A PCR foi realizada com iniciadores para o gene β -ACTINA (133-pb). M, Ladder 100-bp (Invitrogen); 1 a 5, amostras; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

A etapa seguinte foi o tratamento de todas as amostras com bissulfito de sódio utilizando o protocolo descrito por JERONIMO et al. (2001), no qual a denaturação das amostras foi realizada com NaOH 0,2M e a conversão com bissulfito de sódio 2,5M; hidroquinona 125mM e NaOH 350mM. Após o tratamento, a conversão das citosinas foi verificada através de reação de QMSP utilizando iniciadores e sonda para o gene β -*ACTINA*. Inicialmente, foi realizada uma reação de QMSP com 26 amostras tratadas com bissulfito de sódio. O resultado observado foi que 20 amostras puderam ser amplificadas, porém, em um nível muito baixo (após o ciclo 33) e 6 amostras não demonstraram amplificação (Figura 6). Nesse caso, foi descartado um possível erro na preparação da reação, uma vez que a curva padrão pôde ser amplificada com sucesso.

Visando verificar um possível erro ocorrido durante as etapas do tratamento com bissulfito de sódio, as mesmas 26 amostras foram submetidas a um novo tratamento com bissulfito de sódio e avaliadas através de PCR convencional utilizando os mesmo iniciadores para o gene β -*ACTINA* utilizados na QMSP. Após a amplificação as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Foi possível observar que 20 amostras apresentaram bandas de baixa intensidade no gel de poliacrilamida e que 6 amostras não amplificaram (Figura 7). Houve uma alta correlação entre a MSP e a QMSP, sendo que, as amostras que não amplificaram por um método também não amplificaram pelo outro, e as amostras para as quais se observou amplificação tardia na QMSP apresentaram bandas fracas no gel. Com esses resultados, foi possível concluir que os ciclos tardios de amplificação na QMSP eram consequência de uma baixa eficiência do tratamento com bissulfito de sódio.

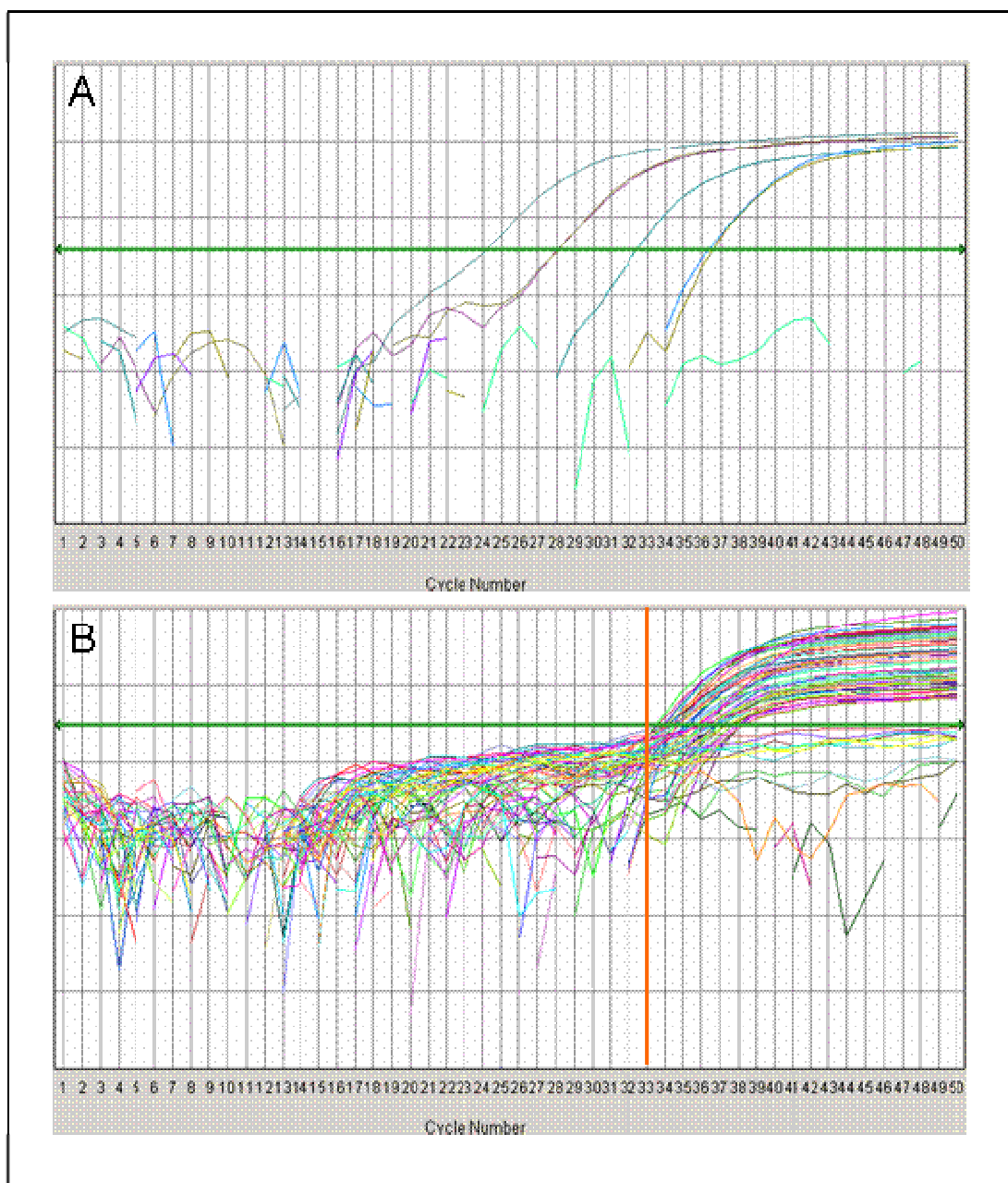


Figura 6 - Curva padrão e curvas de amplificação para o gene referência β -*ACTINA* para 26 amostras. Os resultados foram insatisfatórios uma vez que a maior parte das amostras amplificou após o ciclo 33 e algumas amostras não sofreram amplificação (B). Erros no preparo da reação de QMSP foram descartados uma vez que os pontos da curva padrão (A), cuja função é permitir a quantificação das amostras e é o controle positivo da reação, amplificaram da maneira esperada.

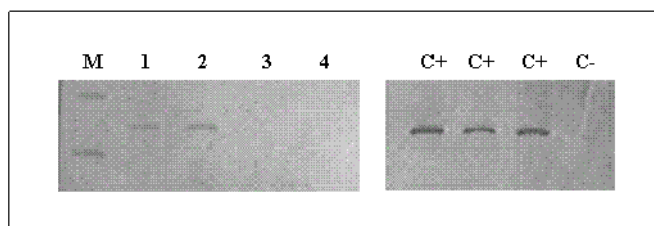


Figura 7 – Gel de eletroforese representativo da PCR com iniciadores para o gene β -*ACTINA* (133-pb) empregados na QMSP. Experimento realizado para verificar a eficiência do tratamento com bissulfito de sódio. M, Ladder 100-bp (Invitrogen); 1 a 4, amostras; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

Uma possível razão para a baixa eficiência do tratamento com bissulfito de sódio obtida seria que, após a extração do DNA através do método de digestão com PK e extração com fenol-clorofórmio, restariam resíduos do processo de fixação das amostras durante o emblocamento em parafina, e que estes resíduos poderiam estar inibindo, total ou parcialmente, o tratamento com bissulfito de sódio. Diante desta possibilidade, optou-se por uma nova extração do DNA das amostras com a utilização do kit *Nucleon HT* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Esse kit já havia sido empregado com sucesso em estudos anteriores realizados no laboratório, nos quais amostras extraídas com ele foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio e analisadas por MSP convencional. Para a nova extração de DNA foram selecionadas 10 amostras tumorais. Após a extração, para verificação da integridade do DNA, foi realizada uma PCR utilizando iniciadores para o gene β -*ACTINA* (133pb). Todas as amostras apresentaram boa qualidade (Figura 4) e foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio e em seguida a QMSP para o gene β -*ACTINA*. Todas as 10 amostras amplificaram o fragmento do gene β -*ACTINA*, porém, novamente com $C_T > 33$ (Figura 8). Esses resultados sugeriram que a deficiência de amplificação observada após o tratamento com

bissulfito de sódio não deveria estar relacionada à qualidade do DNA extraído, pois, apesar da utilização de dois métodos de extração distintos, a baixa eficiência de amplificação persistiu.

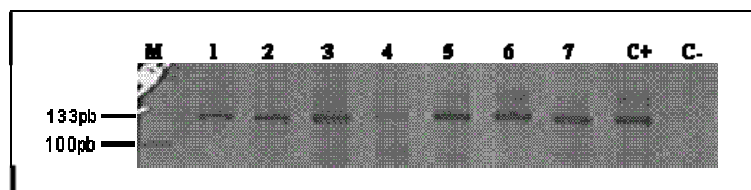


Figura 8 - Gel de eletroforese representativo da PCR para verificação da integridade do DNA extraído com kit *Nucleon HT*. A PCR foi realizada com iniciadores para o gene β -*ACTINA* (133pb). M, 100pb; 1 a 7, amostras; C+, controle positivo; C-, controle negativo.

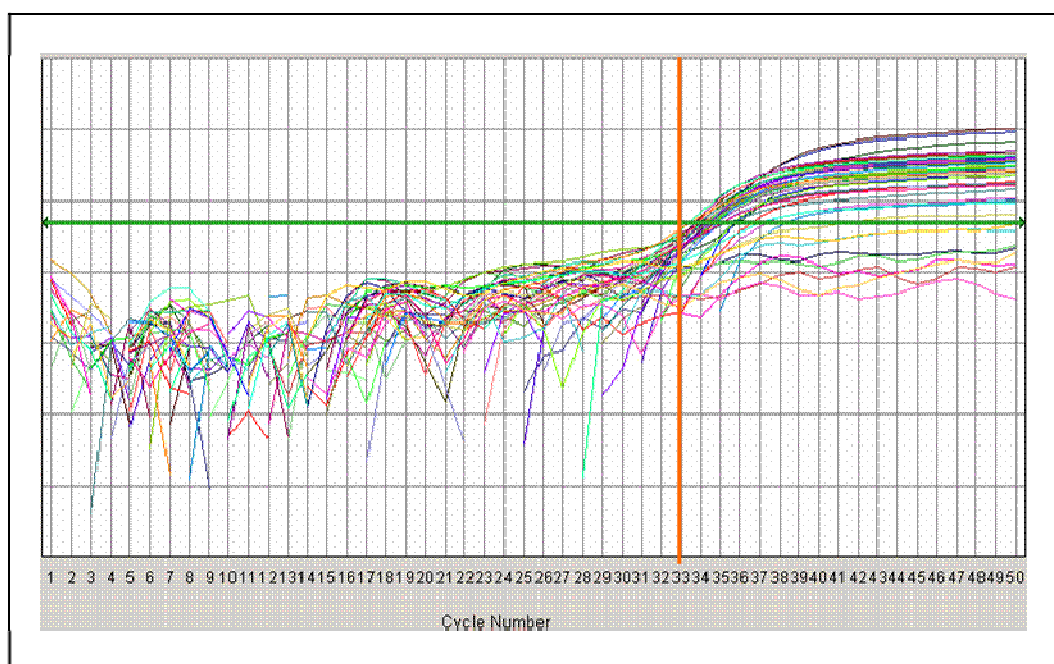


Figura 9 - Curvas de amplificação para o gene β -*ACTINA* de 10 amostras após nova extração de DNA, utilizando o kit *Nucleon HT* (Amersham Biosciences). Uma vez que as curvas continuaram a amplificar após o ciclo 33 da reação, foi descartada qualquer possível interferência do processo de extração do DNA nas reações de QMSP.

Uma outra possibilidade para a baixa eficiência do tratamento com bissulfito de sódio seria uma baixa eficiência de denaturação das moléculas de DNA, no passo inicial do protocolo de tratamento com bissulfito de sódio, devido à presença de ligações covalentes que o fixador utilizado no processo de inclusão em parafina poderia formar com o DNA, dificultando a sua denaturação (WU 2002). Para contornar esta possibilidade, foi adicionado um novo passo ao protocolo de tratamento com bissulfito de sódio com o intuito de auxiliar o processo de denaturação das moléculas de DNA: após a denaturação das amostras com NaOH 0,2M por 20 minutos a 50°C, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 95°C. As demais etapas do tratamento não sofreram modificações. Para esse teste foram utilizadas as 10 amostras extraídas com o kit *Nucleon HT*. Após o tratamento, as amostras foram submetidas à QMSP para o gene *β -ACTINA*. Não houve qualquer alteração dos resultados observados anteriormente (Figura 10), portanto foi descartada a possibilidade de que a baixa eficiência observada após o tratamento com bissulfito de sódio fosse consequência de denaturação inadequada das amostras de DNA.

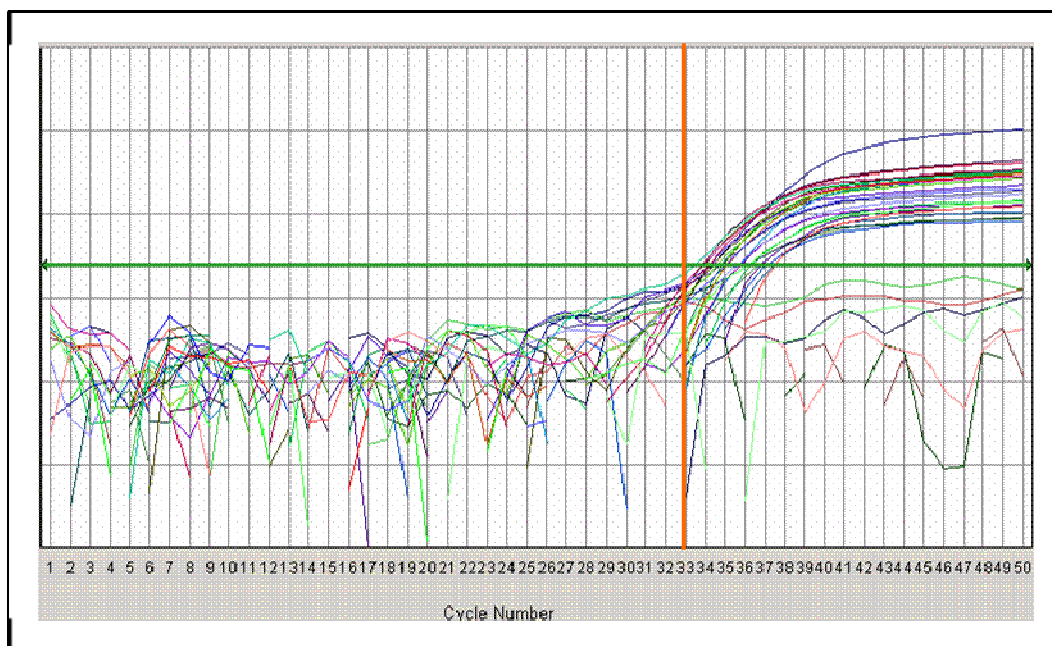


Figura 10 - Curvas de amplificação para o gene β -ACTINA de 10 amostras após tratamento com bissulfito de sódio com etapa adicional de denaturação. Foram submetidas ao novo tratamento 10 amostras de DNA. As amostras continuaram a amplificar após o ciclo 33, de forma que foi descartada a hipótese de baixa eficiência do tratamento com bissulfito de sódio associada a denaturação incompleta do DNA.

Durante todas as etapas desse projeto foi utilizado o protocolo de tratamento com bissulfito de sódio descrito por JERONIMO et al. (2001). Nesse protocolo, 2 μ g de DNA genômico são denaturados com NaOH 0,2M e tratados com solução de bissulfito de sódio e hidroquinona (bissulfito de sódio 2,5M; hidroquinona 125mM; 350mM de NaOH). Entretanto, em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, o tratamento com bissulfito de sódio era realizado com soluções de NaOH e bissulfito de sódio levemente mais concentradas (NaOH 0,3M e solução de bissulfito de sódio contendo 2,7M de bissulfito de sódio, 135mM de hidroquinona e 380mM de NaOH). Visando verificar mais essa possível variável, o DNA de 10 amostras extraídas com o protocolo de digestão com PK e extração com fenol-clorofórmio, foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio segundo estas

condições e, em seguida, as amostras foram submetidas à amplificação para o gene *β-ACTINA* (iniciadores *β-ACTINA*). As curvas de amplificação das amostras indicaram amplificação dos fragmentos de *β-ACTINA* abaixo do ciclo 33 para todas as 10 amostras avaliadas (Figura 11).

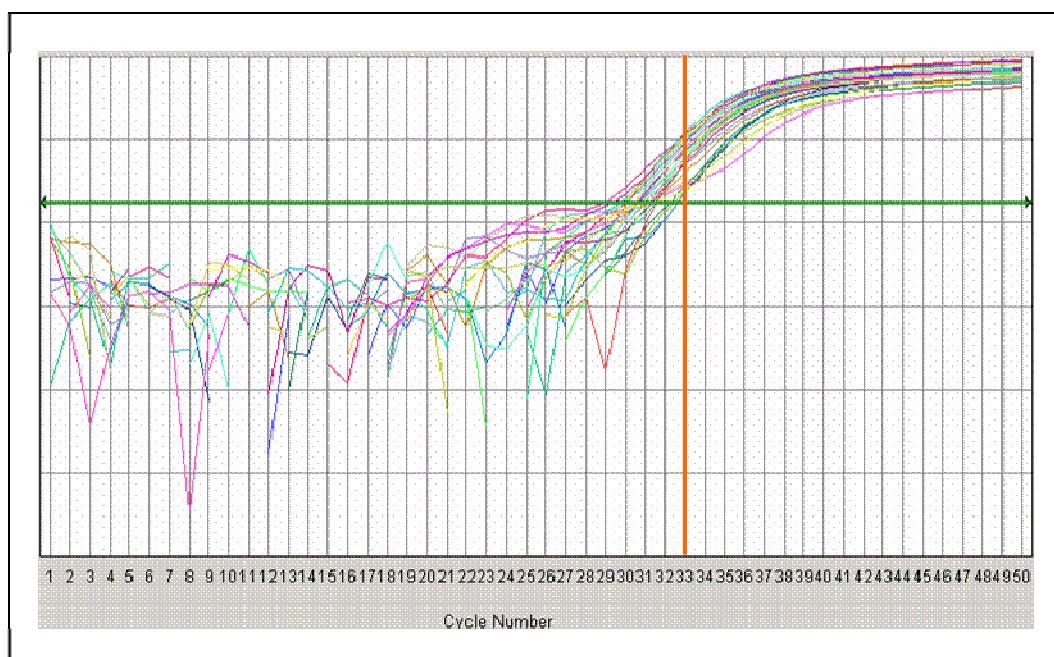


Figura 11 - Curvas de amplificação após tratamento com bissulfito de sódio com concentrações aumentadas de reagentes. Dez amostras foram denaturadas com NaOH 0,3M e convertidas com solução mais concentrada de bissulfito de sódio e hidroquinona. Todas as amostras amplificaram antes do ciclo 33.

Diante destes resultados, foi possível comprovar que os problemas encontrados na amplificação do gene referência eram, possivelmente, consequência da baixa eficiência do tratamento com bissulfito de sódio, corrigida com o aumento da concentração dos reagentes NaOH, na etapa de denaturação, e bissulfito de sódio, hidroquinona e NaOH, na etapa de conversão das citosinas das amostras de DNA.

Todas as amostras incluídas em parafina, cujo DNA fora extraído através do método de digestão com proteinase K e extração com fenol-clorofórmio, foram submetidas a novo tratamento com bissulfito de sódio, utilizando o protocolo com concentrações aumentadas de NaOH, bissulfito de sódio e hidroquinona, e em seguida à QMSP para o gene β -*ACTINA* para verificação da eficiência do tratamento e quantificação das amostras. Das 69 amostras incluídas no estudo, 64 amplificaram o fragmento do gene β -*ACTINA* (Figura 12), as quais prosseguiram no estudo. Com esse resultado verificou-se uma eficiência de 95,75% para o tratamento com bissulfito de sódio.

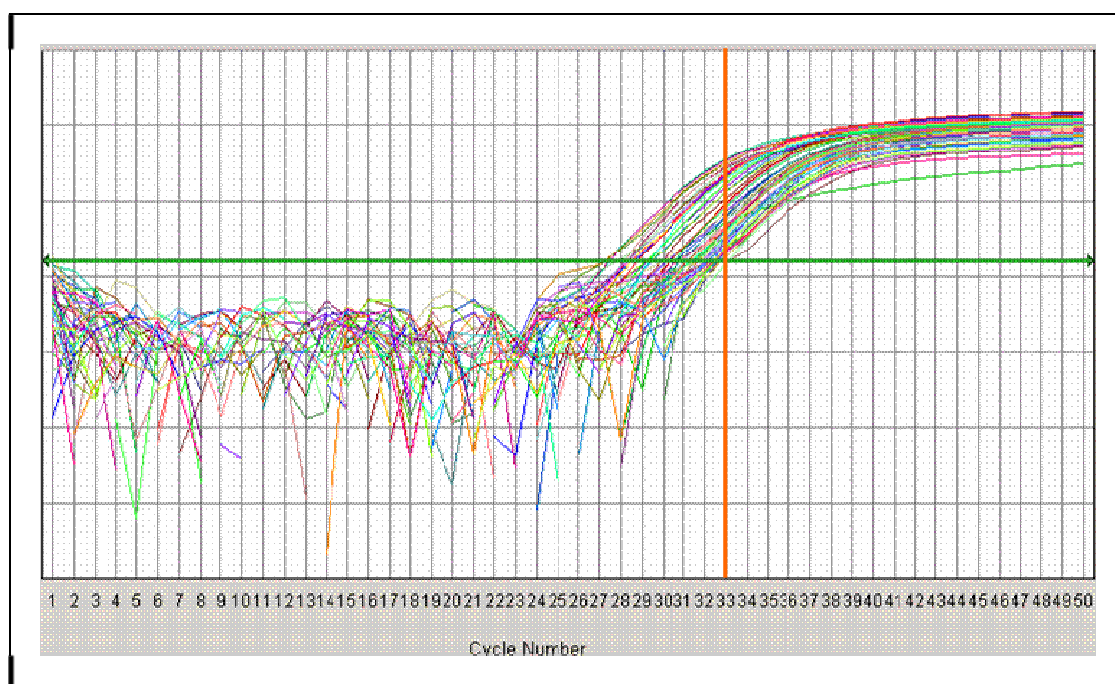


Figura 12 – Figura representativa das curvas de amplificação para o gene β -*ACTINA* para as amostras tumorais. O gráfico mostra as curvas de amplificação para 26 amostras. É possível observar que todas as amostras amplificaram antes do ciclo 33.

4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO NAS AMOSTRAS DE CE DE CABEÇA E PESCOÇO

Previamente ao início das análises para determinação do padrão de hipermetilação dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC*, foram realizadas reações de QMSP, para todos os conjuntos de iniciadores e sondas de cada um dos genes alvo, com a finalidade de verificar a eficiência de amplificação e descartar possíveis falhas de amplificação decorrentes da síntese inadequada dos iniciadores e das sondas. Para tanto, foram construídas curvas padrão com diluições seriadas de DNA de linfócitos metilado *in vitro* para todos os 9 genes (Figura 13) e com os resultados obtidos com a construção dessas curvas foram calculadas as eficiências de cada reação. Dessa forma, nos experimentos seguintes, caso não ocorresse a amplificação adequada de qualquer amostra, problemas associados à baixa eficiência dos iniciadores e das sondas poderiam ser descartados.

As eficiências de amplificação para os conjuntos de iniciadores e sondas foram considerados adequados quando os valores foram de 100%±10. Para todos os casos a eficiência de amplificação atingiu valores dentro do intervalo citado, variando de 94,6% (*MINT31*) e 100,7% (*ESR*) (Tabela 5).

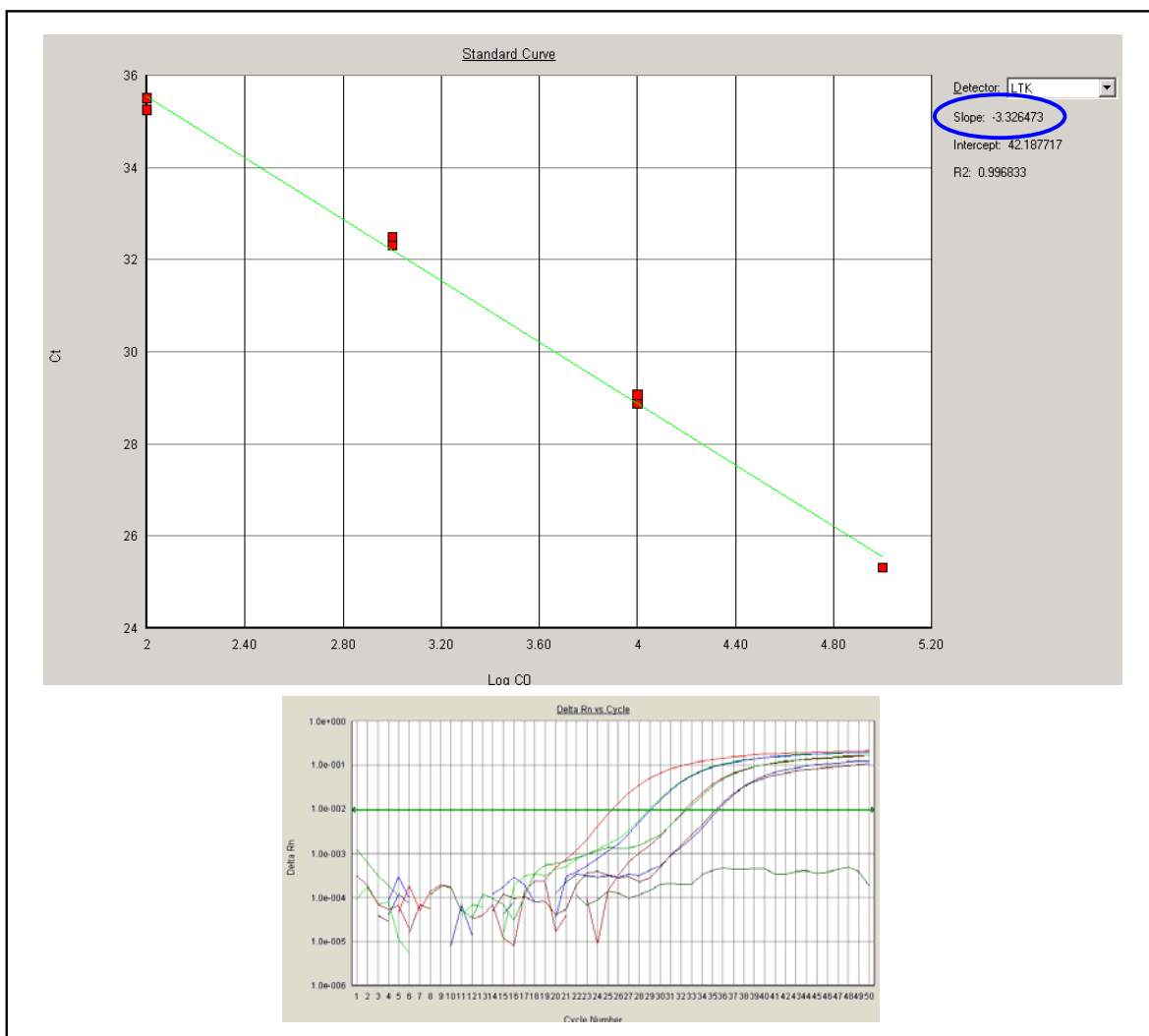


Figura 13 – Curva padrão construída para o cálculo da eficiência de amplificação dos conjuntos de iniciadores e sondas. A figura mostra a curva padrão para o gene *DAPK*. No gráfico superior está representada a reta obtida a partir dos pontos de diluição da curva padrão, em destaque o valor do *slope* (inclinação da reta). No gráfico menor pode-se observar as curvas de amplificação dos pontos da curva padrão.

Uma vez verificada a eficiência dos iniciadores e sondas, foram realizadas as reações de QMSP para os 9 genes alvo nas 64 amostras do estudo. Todas as reações foram realizadas em placas de 96 *wells*, sendo que cada placa continha uma curva padrão, cujos pontos foram amplificados em duplicatas, para o gene a ser avaliado e mais 26 amostras em triplicatas.

Tabela 5 – Eficiências de amplificação para os conjuntos de iniciadores e sondas dos genes alvo e do gene referência.

GENE	EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO (%)
<i>B-ACTINA</i>	100,3
<i>AIM-1</i>	100,2
<i>CCNA1</i>	99,9
<i>DAPK</i>	99,8
<i>DCC</i>	95,7
<i>ESR</i>	100,7
<i>MGMT</i>	96,8
<i>MINT31</i>	94,6
<i>P16^{INKa}</i>	100,3
<i>TIMP-3</i>	97,5

Nas reações de QMSP, a curva padrão, além de permitir a quantificação das amostras, também funciona como controle positivo da reação. Portanto, a não amplificação ou amplificação inadequada da curva padrão (Figura 14A) sugere que ocorreu um erro em uma das etapas da preparação da reação, exigindo a repetição de do experimento. A amplificação e construção adequada da curva padrão permitem a análise das amostras de acordo com o padrão das curvas de amplificação. Uma vez que a curva padrão é construída com diluições seriadas de 10 vezes, cada ponto de diluição deve apresentar uma diferença equivalente a 3,3 ciclos de amplificação (Figura 14B). A ausência de amplificação (Figura 14C), caracterizada pela ausência de captação fluorescência, indica amostras não metiladas. As amostras foram

consideradas metiladas todas as vezes em que foram geradas curvas de amplificação (Figura 14D).

Na análise dos resultados todas as amostras que amplificaram foram consideradas metiladas independente do nível de metilação detectado pelo aparelho pois no estudo de CARVALHO et al. (2004) foram avaliadas 500 amostras de epitélio normal para os genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* e o nível de metilação para todos os casos foi considerado desprezível. Dessa forma, o valor da linha de corte (*cutoff*) estabelecido para que as amostras fossem consideradas metiladas foi zero.

Nesse estudo, foi possível detectar a hipermetilação de pelo menos um gene em 30 (46,9%) das 64 amostras estudadas. Para 17 amostras foi possível detectar a hipermetilação em mais de um dos promotores gênicos avaliados (Tabela 7). Os DNAs de algumas amostras se esgotaram e as análises dos genes *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* não puderam ser realizada nas 64 amostras. Dessa forma, o perfil de metilação dos genes *MGMT*, *DAPK*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR* e *AIM-1* foi avaliado em 62 amostras, do gene *MINT31* em 58 amostras e do gene *DCC* foi analisado em 47 amostras. Somente para o gene *P16^{INKa}* o perfil de hipermetilação foi avaliado em todas as amostras. Os genes mais frequentemente metilados no grupo de amostras de CECP de pacientes atendidos no Hospital do Câncer A. C. Camargo foram o *CCNA1* (29,0%) e o *DAPK* (16,1%), os demais genes apresentaram uma frequência de metilação inferior a 15% (Tabela 6).

CASO	AIM-1	CCNA1	DAPK	DCC	ESR	MINT31	MGMT	P16	TIMP-3
25									
26									
27				NA					
28									
29									
30				NA					
31									
32				NA					
33				NA					
34	NA	NA	NA		NA	NA	NA		NA
35				NA					
36				NA					
37				NA					
38				NA					
39									
40									
41									
42									
43									
44									
45									
46									
47									
48									
49									
50									
51									
52									
53									
54									
55									
56									
57									
58									
59									
60									
61									
62									
63									
64									

Os retângulos preenchidos representam a presença de hipermetilação no promotor do gene; retângulos vazios indicam ausência de hipermetilação. NA – não foi possível avaliar.

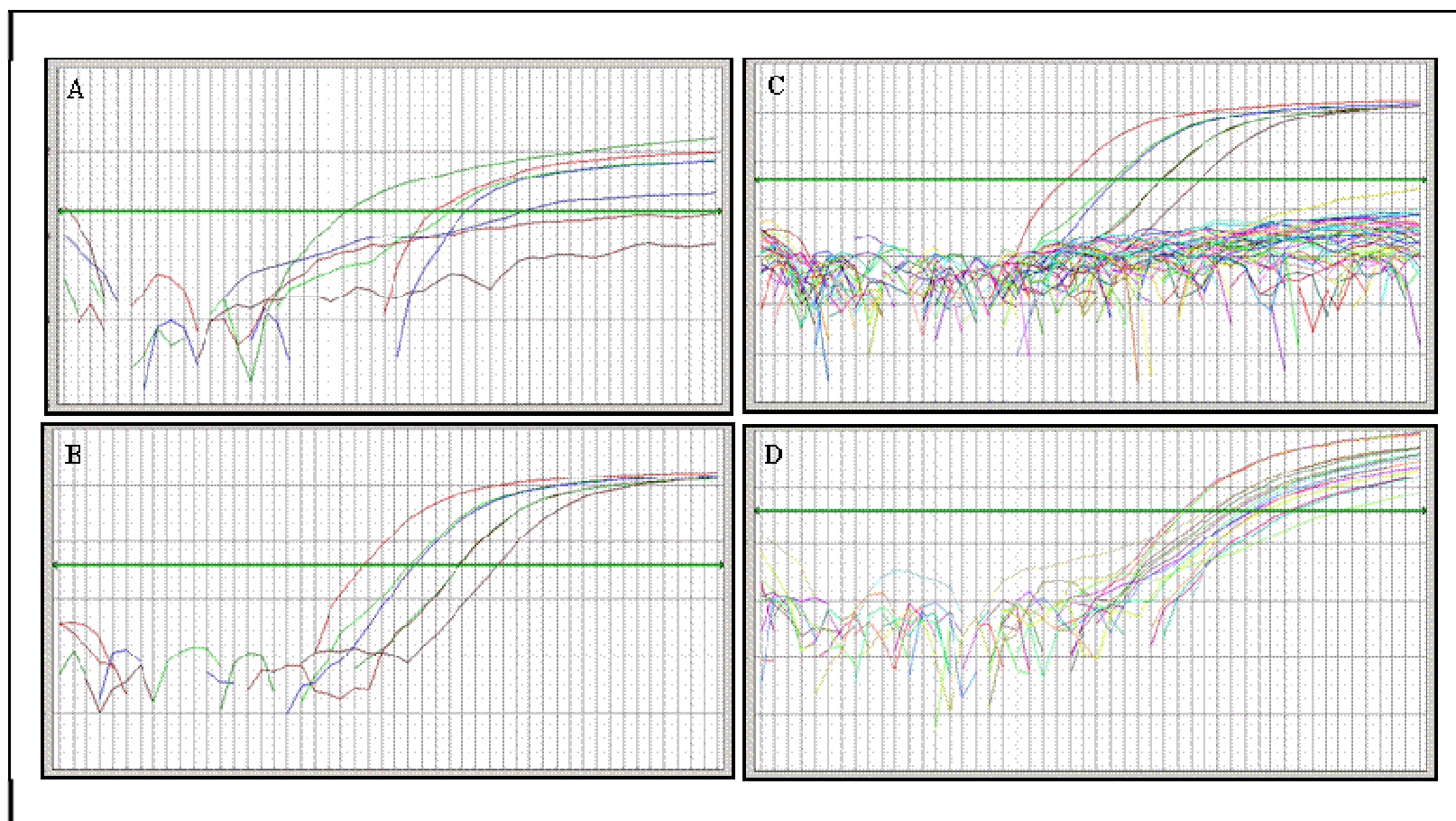


Figura 14 - Exemplos de curvas de amplificação consideradas na análise das reações de QMSP. A amplificação inadequada da curva padrão (A) indicava que reação não funcionou e que todas as amostras deveriam ser submetidas a nova reação de QMSP. A boa amplificação da curva padrão (B) permitia prosseguir com as análises das amostras, consideradas não metiladas na ausência de curvas de amplificação (C) e metiladas na presença das curvas (D).

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E CORRELAÇÕES COM ASPECTOS CLÍNICOS

Os casos analisados pela Johns Hopkins University (JHU) que não puderam ser pareados com amostras provenientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo (HCACC), foram excluídos no momento das análises estatísticas. Dessa forma, as comparações entre os dois grupos de amostras foram realizadas considerando 64 amostras de cada uma das instituições.

A análise dos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes indicou que as duas populações eram semelhantes, não foram observadas diferenças quanto à prevalência do sítio tumoral, estágio clínico, consumo de tabaco e álcool e distribuição quanto ao sexo (Tabela 8).

A comparação entre os padrões de hipermetilação para os genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC*, obtidos nas análises realizadas nos dois grupos de amostras, sugere diferenças entre as frequências de hipermetilação nas populações brasileira e americana. Para sete genes a frequência de hipermetilação foi significativamente maior para as amostras provenientes da JHU. No caso do gene *P16^{INKa}*, a diferença não foi estatisticamente significativa mas sugere que hipermetilação desse gene é mais frequente na população americana. O único caso cujas frequências sugerem que não há diferença entre as populações é o gene *AIM-1* (Tabela 9).

Tabela 8 – Descrição dos dados clínico-patológicos avaliados no estudo. Pode-se verificar que não existe diferença significativa quando avaliados o sítio tumoral, o estágio clínico, o consumo de tabaco e álcool e na distribuição entre os sexos. HCACC, Hospital do Câncer A.C. Camargo; JHU, Johns Hopkins University.

PARÂMETRO	INSTITUIÇÃO		P valor
	HCACC	JHU	
Estádio clínico			0,703
I e II	14 (23,3%)	11 (20,4%)	
III e IV	46 (76,7%)	43 (79,6%)	
Consumo de tabaco			0,755
Sim	52 (88,1%)	50 (86,2%)	
Não	7 (11,9%)	8 (13,8%)	
Consumo de álcool			0,531
Sim	45 (76,3%)	43 (81,1%)	
Não	14 (23,7%)	10 (18,9%)	
Sexo			1,000
Masculino	55 (85,9%)	55 (85,9%)	
Feminino	9 (14,1%)	9 (14,1%)	

Para cada um dos genes analisados foram gerados gráficos de dispersão (Figura 15). Nos gráficos, as duas populações de estudo foram separadas e cada círculo representa o nível de metilação (gene alvo/ β -ACTINA X 100) de cada uma

das amostras para as quais foi possível detectar a presença de hipermetilação no promotor do gene em análise. Através desses gráficos foi possível notar que as amostras metiladas provenientes do HCACC apresentaram, na maioria dos casos (*ESR*, *MGMT*, *DAPK*, *TIMP-3* e *P16^{INKa}*), níveis de metilação elevados, enquanto que as amostras da JHU também apresentaram níveis baixos de metilação.

Tabela 9 - Frequências de metilação para os genes estudados para os dois grupos de pacientes (brasileiros e norte-americanos). HCACC, Hospital do Câncer A.C. Camargo; JHU, Johns Hopkins University.

GENE	FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO		P valor
	HCACC	JHU	
<i>AIM1</i>	7 (11,3%)	12 (18,8%)	0,242
<i>P16^{INKa}</i>	3 (4,7%)	9 (14,1%)	0,069
<i>CCNA1</i>	18 (29,0%)	37 (57,8%)	0,001
<i>DAPK</i>	10 (16,1%)	48 (75,0%)	<0,001
<i>DCC</i>	5 (10,6%)	49 (76,6%)	<0,001
<i>ESR</i>	7 (11,3%)	43 (67,2%)	<0,001
<i>MGMT</i>	5 (8,1%)	19 (29,7%)	0,002
<i>MINT31</i>	1 (3,6%)	27 (42,2%)	<0,001
<i>TIMP3</i>	9 (14,5%)	46 (71,9%)	<0,001

Em seguida, os dados referentes ao padrão de metilação foram correlacionados aos dados clínicos e epidemiológicos (raça, sexo, sítio tumoral e consumo de álcool e tabaco) dos pacientes tratados no HCACC.

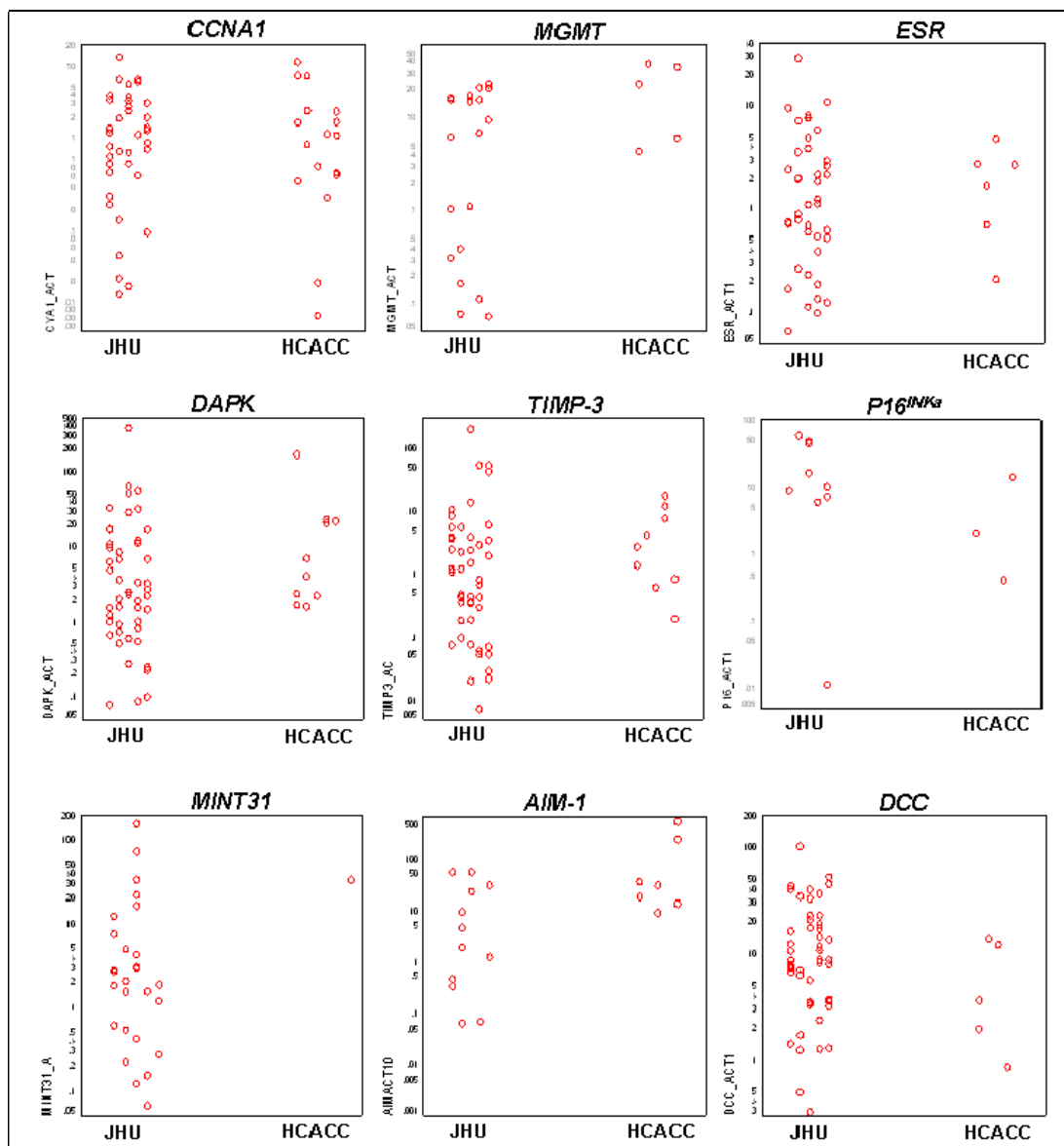


Figura 15 – Gráficos de dispersão referentes aos genes avaliados no estudo. Cada círculo vermelho representa uma amostra para a qual foi possível detectar a hipermetilação do promotor gênico. O eixo Y representa, em escala logarítmica, o nível de metilação. As amostras estão agrupadas de acordo com a instituição a que pertencem: JHU – Johns Hopkins University e HCACC – Hospital do Câncer A.C. Camargo.

A análise dos dados do padrão de hipermetilação dos promotores dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* e dos dados clínico-patológicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no HCACC não indicou correlações com significância estatística, entretanto, os dados sugerem que o consumo de álcool pode estar associado à presença de hipermetilação no gene e *CCNA1* ($p=0,057$) (Tabelas 10 a 18).

Tabela 10 – Correlações entre a hipermetilação do gene *MINT31* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			58	0,732
Branços	51 (98,1%)	1 (1,9%)	52	
Negros	6 (100,0%)	0 (0,0%)	6	
Sexo*			58	0,687
Masculino	49 (98,0%)	1 (2,0%)	50	
Feminino	8 (100,0%)	0 (0,0%)	8	
Sítio tumoral*			58	0,779
Cavidade oral	27 (96,4%)	1 (3,6%)	28	
Orofaringe	10 (100,0%)	0 (0,0%)	10	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	18 (100,0%)	0 (0,0%)	18	
Consumo de tabaco**			53	0,694
Sim	45 (97,8%)	1 (2,2%)	46	
Não	7 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			53	0,545
Sim	38 (97,4%)	1 (2,6%)	39	
Não	14 (100,0%)	0 (0,0%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 11 – Correlações entre a hipermetilação do gene *PI6^{INKa}* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça			64	0,568
Branços	55 (94,8%)	3 (5,2%)	58	
Negros	6 (100,0%)	0 (0,0%)	6	
Sexo			64	0,473
Masculino	52 (94,5%)	3 (5,5%)	55	
Feminino	9 (100,0%)	0 (0,0%)	9	
Sítio tumoral			64	0,812
Cavidade oral	28 (93,3%)	2 (6,7%)	30	
Orofaringe	12 (100,0%)	0 (0,0%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	19 (95,0%)	1 (5,0%)	20	
Consumo de tabaco**			59	0,711
Sim	51 (98,1%)	1 (1,9%)	52	
Não	7 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			59	0,071
Sim	45 (100,0%)	0 (0,0%)	45	
Não	13 (92,9%)	1 (7,1%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 12 – Correlações entre a hipermetilação do gene *TIMP-3* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,875
Branços	48 (85,7%)	8 (14,3%)	56	
Negros	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6	
Sexo*			62	0,083
Masculino	47 (88,7%)	6 (11,3%)	53	
Feminino	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9	
Sítio tumoral*			62	0,658
Cavidade oral	26 (86,7%)	4 (13,3%)	30	
Orofaringe	9 (75,0%)	3 (25,0%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,291
Sim	43 (86,0%)	7 (14,0%)	50	
Não	7 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			57	0,792
Sim	38 (88,4%)	5 (11,6%)	43	
Não	12 (85,7%)	2 (14,3%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 13 – Correlações entre a hipermetilação do gene *DAPK* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,970
Branços	47 (83,9%)	9 (16,1%)	56	
Negros	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6	
Sexo*			62	0,658
Masculino	44 (83,0%)	9 (17,0%)	53	
Feminino	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9	
Sítio tumoral**			62	0,788
Cavidade oral	24 (80,0%)	6 (20,0%)	30	
Orofaringe	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,413
Sim	42 (84,0%)	8 (16,0%)	50	
Não	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7	
Consumo de álcool			57	0,660
Sim	36 (83,7%)	7 (16,3%)	43	
Não	11 (78,6%)	3 (21,4%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 14 – Correlações entre a hipermetilação do gene *ESR* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,661
Branços	50 (89,3%)	6 (10,7%)	56	
Negros	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6	
Sexo*			62	0,985
Masculino	47 (88,7%)	6 (11,3%)	53	
Feminino	8 (88,9%)	1 (11,1%)	9	
Sítio tumoral*			62	0,885
Cavidade oral	27 (90,0%)	3 (10,0%)	30	
Orofaringe	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,333
Sim	44 (88,0%)	6 (12,0%)	50	
Não	7 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			57	0,635
Sim	38 (88,4%)	5 (11,6%)	43	
Não	13 (92,9%)	1 (16,7%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 15 – Correlações entre a hipermetilação do gene *MGMT* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,416
Branços	52 (92,9%)	4 (7,1%)	56	
Negros	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6	
Sexo*			62	0,717
Masculino	49 (92,5%)	4 (7,5%)	53	
Feminino	8 (88,9%)	1 (1,1%)	9	
Sítio tumoral*			62	0,658
Cavidade oral	27 (90,0%)	3 (10,0%)	30	
Orofaringe	12 (100,0%)	0 (0,0%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	16 (88,9%)	2 (11,1%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,381
Sim	45 (90,0%)	5 (10,0%)	50	
Não	7 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			57	0,182
Sim	38 (88,4%)	5 (11,6%)	43	
Não	14 (100,0%)	0 (0,0%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 16 – Correlações entre a hipermetilação do gene *CCNA1* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,807
Branco	40 (71,4%)	16 (28,6%)	56	
Negro	4 (66,7%)	2 (33,3%)	6	
Sexo*			62	0,758
Masculino	38 (71,7%)	15 (28,3%)	53	
Feminino	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9	
Sítio tumoral*			62	0,754
Cavidade oral	20 (66,7%)	10 (33,3%)	30	
Orofaringe	9 (75,0%)	3 (25,0%)	12	
Hipofaringe	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2	
Laringe	14 (77,8%)	4 (22,2%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,421
Sim	36 (72,0%)	14 (28,0%)	50	
Não	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7	
Consumo de álcool**			57	0,057
Sim	33 (76,7%)	10 (23,3%)	43	
Não	7 (50,0%)	7 (50,0%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 17 – Correlações entre a hipermetilação do gene *AIM-1* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,661
Branços	50 (89,3%)	6 (10,7%)	56	
Negros	5 (83,3%)	1 (16,7%)	6	
Sexo*			62	0,247
Masculino	46 (86,8%)	7 (13,2%)	53	
Feminino	9 (100,0%)	0 (0,0%)	9	
Sítio tumoral*			62	0,819
Cavidade oral	27 (90,0%)	3 (10,0)	30	
Orofaringe	11 (91,7%)	1 (8,3%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	15 (83,3%)	3 (16,7%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,381
Sim	45 (90,0%)	5 (10,0%)	50	
Não	7 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			57	0,401
Sim	40 (93,0%)	3 (7,0%)	43	
Não	12 (85,7%)	2 (14,3%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

Tabela 18 – Correlações entre a hipermetilação do gene *DCC* com dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo.

PARÂMETROS CLÍNICOS	PADRÃO DE METILAÇÃO		n	P valor
	NÃO METILADO	METILADO		
Raça*			62	0,473
Branco	38 (90,5%)	4 (9,5%)	56	
Negro	4 (80,0%)	1 (20,0%)	6	
Sexo*			62	0,734
Masculino	36 (90,0%)	4 (10,0%)	53	
Feminino	6 (85,7%)	1 (14,3%)	9	
Sítio tumoral*			62	0,950
Cavidade oral	19 (90,5%)	2 (9,5%)	30	
Orofaringe	7 (87,5%)	1 (12,5%)	12	
Hipofaringe	2 (100,0%)	0 (0,0%)	2	
Laringe	14 (87,5%)	2 (12,5%)	18	
Consumo de tabaco**			57	0,398
Sim	33 (89,2%)	4 (10,8%)	50	
Não	6 (100,0%)	0 (0,0%)	7	
Consumo de álcool**			57	0,301
Sim	29 (93,5%)	2 (6,5%)	43	
Não	10 (83,3%)	2 (16,7%)	14	

* n<64 pois não foi possível avaliar a hipermetilação do promotor gênico para todas as amostras.

** n<64 pois não haviam dados clínicos e/ou epidemiológicos disponíveis.

5 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide (CE) das vias aerodigestivas superiores (VADS) está entre as 10 neoplasias mais freqüentes no mundo. Nas últimas décadas, apesar dos diversos estudos visando uma melhor compreensão do comportamento desses tumores, as baixas taxas de sobrevida e as altas taxas de recorrências loco-regionais ainda constituem os principais problemas associados aos tumores epidermóides de cabeça e pescoço (MARUYA et al. 2004). O planejamento terapêutico e o estabelecimento do prognóstico dos carcinomas da cabeça e pescoço são fundamentalmente determinados pela localização do tumor primário e pelo estadiamento do tumor de acordo com o sistema TNM. Porém, a identificação de fatores complementares, capazes de determinar com maior precisão o prognóstico da doença, parece ser bastante necessária uma vez que tumores que apresentam o mesmo estadiamento clínico podem apresentar padrões de crescimento e evolução distintos.

Por essa razão os principais objetivos desse estudo foram a determinação do padrão de hipermetilação dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* em amostras de CE das VADS de pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo, correlacionando os dados moleculares aos dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes visando determinar sua utilidade como marcadores moleculares para esse tipo de tumor. Também foi um dos objetivos deste estudo comparar o perfil de metilação observado nos pacientes tratados aqui com aquele descritos para os pacientes tratados na Johns Hopkins University

CARVALHO et al. (2004). O intuito dessa comparação foi verificar se a análise do perfil de hipermetilação poderia apresentar utilidade como marcador tumoral e identificar possíveis diferenças populacionais.

Nesse estudo, e no preliminar de CARVALHO et al. (2004), a avaliação do perfil de hipermetilação dos CE das VADS foi realizada através da técnica de QMSP. Essa abordagem, baseada na PCR quantitativa em tempo-real, é uma técnica bastante específica e sensível, permitindo a detecção de um alelo metilado em meio a 10.000 alelos não metilados, e permite determinar o nível de metilação presente na amostra com precisão (EADS et al. 2000). Além disso, não há manipulação do produto de PCR, evitando erros associados à contaminação com material amplificado e reduzindo o tempo gasto na análise das amostras.

A avaliação do perfil de hipermetilação tem sido amplamente avaliada por diversos grupos de instituições internacionais e brasileiras em diferentes tipos tumorais. Diversas abordagens técnicas são empregadas nas análises, no entanto têm se observado nos últimos anos a aplicação da QMSP em um número crescente de estudos. No Brasil, o presente estudo é o primeiro a descrever a utilização da QMSP para a detecção da hipermetilação de promotores gênicos. Para que a técnica pudesse ser implementada vários parâmetros foram verificados e otimizados. Durante as padronizações se observou que o tampão comercial *Master Mix (Applied Biosystems)* apresentou baixa eficiência de amplificação quando comparado ao tampão preparado no laboratório. Além disso, o protocolo utilizado no estudo preliminar de CARVALHO et al. (2004) teve as quantidades de iniciadores e *Platinum Taq Polymerase* aumentadas. Porém para que as reações de QMSP apresentassem resultados satisfatórios, etapas anteriores à amplificação das amostras também

sofreram alterações. Inicialmente, foi questionado se o processo de extração do DNA das amostras incluídas em parafina poderia interferir nos resultados da QMSP. Para tanto dois protocolos distintos foram testados e os resultados verificados foram os mesmos. Em seguida, foram verificados três protocolos distintos para o tratamento com bissulfito de sódio, uma vez que a conversão ineficiente das amostras de DNA poderia acarretar resultados falso-negativos para a presença de hipermetilação nos promotores gênicos. As amostras foram tratadas com o protocolo que utilizava concentrações maiores de reagentes (NaOH, bissulfito de sódio e hidroquinona). As etapas de verificação das condições adequadas para a extração e tratamento com bissulfito de sódio do DNA consumiram a maior parte do estudo, uma vez que os dois métodos de extração de DNA de material incluído em parafina que foram testados são bastante laboriosos e dispensam cuidados para que o DNA possa ser obtido com qualidade (pouco fragmentado e com poucos resíduos do processo de fixação e inclusão em parafina) e em quantidade suficiente para as análises de hipermetilação. Além disso, o tratamento com bissulfito de sódio também inclui diversas etapas, incluindo tempos de incubação em diferentes temperaturas, etapas lavagem das amostras e reações de denaturação, deaminação e desulfonação, que se realizadas de maneira inadequada não permitem a conversão eficiente das amostras. Durante a padronização das condições de tratamento com bissulfito de sódio, os três protocolos testados empregavam diferentes concentrações de reagentes nas diferentes etapas do processo. O protocolo que empregava as maiores concentrações de reagentes foi mais eficiente. Os pequenos aumentos nas concentrações de bissulfito de sódio e hidroquinona, quando comparados aos outros 2 protocolos, provavelmente não seriam suficientes para o aumento da eficiência. No entanto, a concentração maior de

NaOH pode explicar a melhora na conversão das amostras, uma vez que participa da denaturação do DNA antes da etapa de conversão que só ocorre em DNA simples fita. Até que os resultados satisfatórios pudessem ser atingidos, todos os testes realizados foram verificados através de reações de QMSP.

Nesse estudo, foi possível detectar a hipermetilação de pelo menos um gene em 46,9% das amostras, sendo que as frequências de hipermetilação para cada gene variaram de 3,6% a 29%. Esses resultados foram bastante diferentes daqueles descritos por CARVALHO et al. (2004), no qual a frequência de hipermetilação dos promotores gênicos variou de 14,1% a 76,6%. e pelo menos um gene apresentou-se hipermetilado em mais de 90% das amostras. As frequências de hipermetilação dos promotores dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* nas amostras de CE das VADS provenientes da JHU e do HCACC sugerem que o perfil de hipermetilação é diferente para os dois grupos, uma vez que as amostras brasileiras apresentaram frequências significativamente menores de hipermetilação para 7 dos 9 genes estudados (com exceção dos genes *AIM-1* e *P16^{INKa}*). A análise dos gráficos de dispersão (Figura 15) também sugere que existem diferenças relacionadas ao nível de hipermetilação nos dois grupos de amostras. No caso das amostras da JHU, foram detectados tanto níveis baixos de metilação quanto elevadosn o entanto a maior parte das amostras metiladas do HCACC apresentou níveis elevados de metilação. Essas diferenças observadas tanto para as frequências quanto para os níveis de hipermetilação quando comparados os dois grupos de amostras podem ser consequência do processo de fixação das amostras para inclusão em parafina, da diferença de sensibilidade dos aparelhos empregados nas reações de

QMSP e da existência de diferenças populacionais (população americana versus população brasileira).

No presente estudo (HCACC) somente amostras incluídas em parafina foram selecionadas, enquanto que no estudo de CARVALHO et al. (2004) (JHU) 94, dos 104, tumores avaliados eram provenientes de tecido congelado e somente 10 eram de amostras incluídas em parafina. A utilização de amostras submetidas a diferentes processos de conservação pode ser um dos fatores associados às diferenças observadas para o perfil de metilação dos promotores gênicos quando foram comparados os dois grupos de amostras. O processo de fixação de amostras pode causar danos aos ácidos nucleicos e às proteínas presentes no tecido, sendo que na maioria das vezes esse processo causa a fragmentação dessas moléculas. A obtenção de DNA de boa qualidade para amplificação, a partir de amostras incluídas em parafina, é um processo laborioso uma vez que o material é escasso e degradado, geralmente contendo resíduos que podem inibir a amplificação da amostra, como o formol, ou que podem inibir a ação da proteinase K, como o xilol, durante o processo de extração do DNA (COURA et al. 2005). Os protocolos atuais empregados para fixação das amostras utilizam formol como fixador, pois esse reagente é pouco tóxico, de fácil manipulação, apresenta baixo custo, preserva a morfologia do tecido e permite a utilização de uma grande gama de anticorpos para as análises de imunohistoquímica. No entanto, o formol pode induzir a formação de ligações cruzadas entre proteínas e torna trabalhosa a purificação de ácidos nucleicos (GILLESPIE et al. 2002; ZSIKLA et al. 2004). Em um estudo comparando diferentes fixadores os resultados sugerem que a fixação das amostras com etanol 70% permite a extração de DNA de melhor qualidade, quando comparada à fixação com formol

tamponado a 10% (GILLESPIE et al. 2002). Além disso, ZSIKLA et al. (2004) comprovaram que os resultados obtidos a partir da PCR em tempo-real com amostras de DNA proveniente de tecidos emblocados em parafina é confiável, no entanto, estes autores também afirmam que a quantificação por espectrofotometria das amostras de DNA de tecidos incluídos em parafina não é confiável. Levando em consideração os resultados dos diversos estudos citados, no presente estudo foi possível extrair DNA de todas as amostras (fixadas em formol tamponado a 10%), as quais amplificaram um fragmento de 133pb do gene β -*ACTINA*. Porém, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria, método pouco confiável segundo ZSIKLA et al. (2004). Uma vez que o tratamento com bissulfito de sódio foi realizado considerando uma quantidade de DNA inicial de 2 μ g, tanto essa etapa da análise quanto as reações de QMSP podem ter sido prejudicadas pela quantificação inadequada das amostras, ou seja, a quantidade de DNA submetida ao tratamento com bissulfito de sódio e, em seguida, à QMSP, pode ter sido menor do que o necessário e insuficiente, em alguns casos, para a amplificação do fragmento dos genes alvo. Dessa forma, a utilização de amostras submetidas a diferentes processos de fixação pode ser a causa principal das diferenças encontradas para os perfis de hipermetilação das amostras da JHU (tumores submetidos a congelamento) e do HCACC (tumores fixados em formol e incluídos em parafina).

Um segundo fator que pode ter interferido nos resultados seria uma possível diferença na sensibilidade dos aparelhos nos quais as reações de QMSP foram realizadas. As reações de QMSP com as amostras provenientes de pacientes tratados na JHU foram realizadas no aparelho *7900 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, cuja fonte de excitação dos fluoróforos é um emissor de raios *laser*. No

caso das amostras de pacientes tratados no HCACC, a análise do perfil de hipermetilação dos CE das VADS foi realizada no aparelho *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)*, cuja fonte de excitação dos fluoróforos é uma lâmpada halogênica (luz branca). Ambos os equipamentos utilizam uma câmera CCD para captar a fluorescência. Devido à diferença observada entre os níveis de metilação detectados para os dois grupos foi levantada a hipótese de que a sensibilidade dos aparelhos poderia ser diferente. Para alguns genes, como *CCNA1*, foi possível detectar níveis baixos de hipermetilação, no entanto em um número muito pequeno de amostras. Se o equipamento com *laser* realmente for mais sensível, isto permitiria a detecção de maior número de amostras com baixos níveis de hipermetilação, o que se refletiria diretamente em um maior número de amostras consideradas metiladas. Cabe ressaltar que não existe até o momento nenhum estudo comparado resultados obtidos nestes dois aparelhos ou discutindo eventuais diferenças de sensibilidade entre eles. O fabricante de ambos os equipamentos é o mesmo, a *Applied Biosystems*, e eles também não possuem dados comparativos da sensibilidade destes equipamentos.

As duas hipóteses anteriores podem não ser verdadeiras e as diferenças nas frequências de hipermetilação observadas entre os dois grupos podem ser devido a peculiaridades intrínsecas a cada uma das populações estudadas, brasileira e americana. É importante ressaltar que a metilação aberrante de promotores gênicos é um mecanismo de inativação de genes com função supressora de tumor alternativo às mutações e deleções, portanto, as diferenças encontradas nos padrões de hipermetilação dos genes avaliados nos pacientes da JHU e do HCACC podem ser consequência da inativação desses genes por outros mecanismos, na população

brasileira, e que não foram avaliados nesse estudo, como por exemplo as mutações e deleções. No entanto, a presença de outros mecanismos de inativação gênica não explica as diferenças observadas nos níveis de metilação das amostras. No entanto, a ocorrência de diferentes mecanismos para inativação dos genes em estudo não é suficiente para explicar as diferenças encontradas nos níveis de hipermetilação.

Com isso, a hipótese mais coerente para as diferenças encontradas nos perfis de hipermetilação dos grupos tumorais avaliados parece ser a utilização de amostras submetidas a diferentes processos de conservação. Foi possível extrair DNA íntegro das amostras incluídas em parafina (HCACC), no entanto a quantidade foi insuficiente para que após o tratamento com bissulfito de sódio amostras com poucas células que apresentavam metilação aberrante nos promotores gênicos avaliados pudessem ser amplificadas. Talvez a fixação das amostras com outro fixador, que não o formol (como sugerido por GILLESPIE e colaboradores (2002)), pudesse preservar o DNA das amostras de maneira adequada, permitindo a extração de material de melhor qualidade em quantidades suficientes para as análises de hipermetilação. Além disso, a denaturação poderia ser mais eficiente permitindo a conversão adequada das amostras. No entanto, outro parâmetro associado ao processo de fixação das amostras que deveria ser verificado é o tempo de exposição das amostras ao fixador antes da inclusão em parafina. Uma vez que o fixador pode acarretar danos ao DNA e RNA das amostras, talvez a fixação por um período de tempo reduzido diminua o grau de fragmentação causado aos ácido nucléicos.

A análise de correlações do perfil de hipermetilação com os parâmetros clínicos e epidemiológicos dos pacientes foi realizada levando em consideração cada grupo de amostras, pacientes tratados no HCACC e na JHU. No caso das amostras

provenientes do HCACC, a metilação não apresentou qualquer correlação estatisticamente significativa com os parâmetros clínicos e epidemiológicos, pois o número de amostras com hipermetilação de promotores gênicos foi pequeno. Para as amostras da JHU os dados estatísticos sugerem uma correlação entre o etilismo e a detecção de metilação no genes *ESR* e *MGMT*, e do tabagismo com a metilação do gene *DCC*.

Esse estudo corrobora o fato de que a hipermetilação de promotores gênicos, nos CE das VADS, ocorre em diferentes genes, sugerindo a necessidade de se avaliar conjuntos de genes na tentativa de se determinar um perfil de hipermetilação como marcador para esses tumores. No entanto, variáveis externas não associadas às características biológicas das amostras (processo de preservação das amostras em parafina) podem ter interferido na análise e, por isso, não foi possível concluir se a determinação do perfil de hipermetilação dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* pode ser utilizada como marcador tumoral para os CE das VADS. Este estudo chegou a algumas respostas interessantes, entretanto, várias questões ainda permanecem em aberto, e, portanto, as análises devem prosseguir para que estas novas questões também sejam respondidas.

Com o intuito de verificar a sensibilidade dos aparelhos utilizados nas reações de QMSP (7900 e 7500 *Real Time PCR System*) são de fato diferentes ou se o processo de fixação das amostras para inclusão em parafina pode influir nas reações de QMSP, 20 amostras do HCACC serão enviadas para o laboratório do Dr. Joseph Califano para que as reações de QMSP sejam realizadas no aparelho 7900 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems) e 20 amostras da JHU serão analisadas no

aparelho *7500 Real Time PCR System* no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer (ILPC). Ao mesmo tempo, a hipermetilação de amostras de CE das VADS conservadas por congelação serão analisadas no aparelho *7700 Real Time PCR System*, que também emprega como fonte de excitação dos fluoróforos um emissor de raios *laser*, pertencente ao Laboratório de Virologia do ILPC. Desta forma, espera-se confirmar se os resultados obtidos para as comparações entre as amostras das duas instituições apresentam diferenças decorrentes das características moleculares dos tumores ou devido à sensibilidade dos aparelhos.

Nesse estudo não foi possível correlacionar o padrão de metilação dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC* com critérios clínicos dos pacientes. No entanto, foi possível detectar a hipermetilação de pelo menos um dos genes em quase 47% das amostras, demonstrando que a hipermetilação no promotor desses genes pode estar envolvido no processo de tumorigênese do CE das VADS. Desse modo, um estudo que avaliasse o padrão de hipermetilação desses genes em amostras de pacientes tratados no HCACC e que foram submetidas a congelação seria de grande relevância para a comprovação dos dados obtidos nesse estudo. Com esse intuito, está em andamento um estudo que visa avaliar o perfil de hipermetilação de CE das VADS em amostras tumorais submetidas à congelação e em amostras de soro e saliva dos mesmos pacientes. Alguns dos genes avaliados no presente estudo serão avaliados nessas amostras para verificar a utilidade de amostras incluídas em parafina no estudo da hipermetilação.

6 CONCLUSÕES

1. Os resultados da padronização da reação de QMSP demonstraram que o tampão, preparado no próprio laboratório, apresentou curvas de amplificação adequadas, e pôde ser utilizado para o preparo das reações. Além disso, foram otimizadas as concentrações de iniciadores e de *Plaitnum Taq Polymerase*, que tiveram suas concentrações aumentadas em relação ao protocolo empregado no estudo de CARVALHO et al. (2004).
2. Através da técnica de QMSP foram determinadas as frequências de hipermetilação dos promotores dos genes *P16^{INKa}*, *MGMT*, *DAPK*, *MINT31*, *CCNA1*, *TIMP-3*, *ESR*, *AIM-1* e *DCC*.
3. Foi possível detectar a hipermetilação de pelo menos um gene em 30 (46,9%) das 64 amostras selecionadas para o estudos.
4. Nas análises para comparação entre as populações brasileira e americana, os grupos de amostras apresentaram-se clinicamente iguais. No entanto, as frequências de hipermetilação dos promotores gênicos para as amostras provenientes de pacientes tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo foram significativamente menores quando comparadas àquelas obtidas para as amostras do estudo de CARVALHO et al. provenientes da Johns Hopkins University.

5. A análise dos gráficos de dispersão construídos a partir dos níveis de hipermetilação detectados sugere que as amostras da população brasileira apresentavam somente níveis mais elevados de metilação nos promotores gênicos, enquanto que nas amostras dos pacientes americanos foi possível detectar níveis mais reduzidos ou elevados de hipermetilação.
6. Não foi possível estabelecer correlações significativas entre o perfil de hipermetilação de promotores gênicos e os dados clínicos e epidemiológicos das amostras provenientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures**. Available from: <URL:<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2005BrF.pdf>> [2006 jun 12].

Ai L, Stephenson KK, Ling W, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. **Mod Pathol** 2003; 16:944-50.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:241-57.

Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R. Analysis of estrogen receptor alpha signaling complex at the plasma membrane. **FEBS Lett** 2004; 577:339-44.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. **Hum Mol Genet** 2001; 10:687-92.

Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? **Nat Rev Cancer** 2006; 6:107-16.

Belbin TJ, Singh B, Barber I, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. **Cancer Res** 2002; 62:1184-90.

Belshaw NJ, Elliott GO, Williams EA, et al. Methylation of the ESR1 CpG island in the colorectal mucosa is an 'all or nothing' process in healthy human colon, and is accelerated by dietary folate supplementation in the mouse. **Biochem Soc Trans** 2005; 33:709-11.

Bernier J, Cooper JS. Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence? **Oncologist** 2005; 10:215-24.

Bockmühl U, Schluns K, Kuchler I, Petersen S, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. **Am J Pathol** 2000; 157:369-75.

Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. **J Biol Chem** 2002; 277:13787-95.

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol** 2000; 25:169-93.

Califano JA, Sidransky D. Molecular Biology of Head and Neck Cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. **Head and Neck Cancer: a multidisciplinary approach**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.929-36.

Carvalho A, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. **Oral Dis** 2003; 9:112-8.

Carvalho AL, Jeronimo C, Henrique R, et al. Feasibility of screening for head and neck squamous carcinoma in saliva and detection of promoter hypermethylation by quantitative-MSP. In: Proceedings of the 12th **SPORE Meeting**, 2004 July 10-13, Baltimore (USA).

Chen CH, Wang WJ, Kuo JC, et al. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. **EMBO J** 2005; 24:294-304.

Cody DT 2nd, Huang Y, Darby CJ, Johnson GK, Domann FE. Differential DNA methylation of the p16 INK4A/CDKN2A promoter in human oral cancer cells and normal human oral keratinocytes. **Oral Oncol** 1999; 35:516-22.

Costello JF, Plass C. Methylation matters. **J Med Genet** 2001; 38:285-303.

Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. **J Clin Pathol** 2005; 58:894-5.

Danam RP, Howell SR, Brent TP, Harris LC. Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. **Mol Cancer Ther** 2005; 4:61-9.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acid Res** 2000; 28:e32

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature** 2004; 429:457-63.

El-Naggar AK, Lai S, Clayman GL, et al. Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. **Hum Pathol** 1999; 30:1013-8.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999a; 59:67-70.

Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. **Cancer Res** 1999b; 59:793-7.

Esteller M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur J Cancer** 2000; 36:2294-300.

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:143-53.

Forcet C, Ye X, Granger L, Corset V, Shin H, Bredesen DE, Mehlen P. The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:3416-21.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer** 1989; 43:992-1000.

Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, et al. Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. **Am J Pathol** 2002; 160:449-57.

Groome PA, Schulze K, Boysen M, et al. A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. **Head Neck** 2001; 23:613-24.

Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **Lancet Oncol** 2006; 7:77-82.

Hall SF, Groome PA, Rothwell D, et al. Using TNM staging to predict survival in patients with squamous cell carcinoma of head and neck. **Head Neck** 1999; 21:30-8.

Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1370-5.

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2003; 260:502-8.

Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. **Oncogene** 2002; 21:4231-6.

Huang MJ, Yeh KT, Shih HC, et al. The correlation between CpG methylation and protein expression of P16 in oral squamous cell carcinomas. **Int J Mol Med** 2002; 10:551-4.

Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. **Mol Cell Biol** 2000; 20:1044-54.

Inokuchi K, Yamaguchi H, Hanawa H, et al. Loss of DCC gene expression is of prognostic importance in acute myelogenous leukemia. **Clin Cancer Res** 2002; 8:1882-8.

Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:988-93.

Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, et al. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1747-52.

Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:8472-78.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 3:415-28.

Jones PA, Laird PW. Cancer-epigenetics comes of age. **Nat Genet** 1999; 21:163-7.

Kitkumthorn N, Yanatatsanajit P, Kiatpongsan S, et al. Cyclin A1 promoter hypermethylation in human papillomavirus-associated cervical cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:55.

Kolodziej PA. DCC's function takes shape in the nervous system. **Curr Opin Genet Dev** 1997; 7:87-92.

Kong WJ, Zhang S, Guo C, Zhang S, Wang Y, Zhang D. Methylation-associated silencing of death-associated protein kinase gene in laryngeal squamous cell cancer. **Laryngoscope** 2005; 115:1395-401.

Kowalski LP, Bagietto R, Lara JRL, et al. Prognostic significance of the distribution of neck node metastasis from oral carcinoma. **Head Neck** 2000; 22:207-14.

Kowalski LP; Nishimoto IN; Carvalho AL; et al. Looking beyond tobacco and alcohol: the role of lifestyle and other environmental risk factors for laryngeal cancer. **Applied Cancer Research** 2005; 25:10-19.

Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. **Cancer Res** 2002; 62:5295-300.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature Reviews** 2003; 3:253-6.

Li LC, Shiina H, Deguchi M, et al. Age-dependent methylation of ESR1 gene in prostate cancer. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 321:455-61.

Maruya S, Issa JP, Weber RS, et al. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. **Clin Cancer Res** 2004; 10:3825-30.

Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. **J Clin Oncol** 2004; 22:3420-8.

Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **Am J Surg** 1998; 176:428-9.

Ministério da Saúde. Head and neck epidermoid carcinoma. Condutas do INCA/MS / INCA/MS Procedures. **Rev Bras Cancerol** 2001; 47:361-76.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Miracca EC, Kowalski LP, Nagai MA. High prevalence of p16 genetic alterations in head and neck tumours. **Br J Cancer** 1999; 81:677-83.

Mork J, Lie AK, Glatte E, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2001; 344:1125-31.

Müller C, Readhead C, Diederichs S, et al. Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. **Mol Cell Biol** 2000; 20:3316-29.

Müller-Tidow C, Ji P, Diederichs S, et al. The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol** 2004; 24:8917-28.

Nakayama K, Inokuchi K, Dan K. Hypermethylation of the putative tumor-suppressor genes DCC, p51/63 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and loss of their expressions in cell lines of hematological malignancies. **J Nippon Med Sch** 2005; 72:270-7.

Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJG. Circulating tumor-derived DNA may permit the early diagnosis of head and neck squamous cell carcinomas. **Int J Cancer** 2001; 92:214-9.

Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA, Baylin SB, Herman JG. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:12754-9.

Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3164-71.

Partridge M, Emilion G, Falwoth M, et al. Patient-specific mutation databases for oral cancer. **Int J Cancer** 1999; 84:284-92.

Penolazzi L, Lambertini E, Giordano S, et al. Methylation analysis of the promoter F of estrogen receptor alpha gene: effects on the level of transcription on human osteoblastic cells. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2004; 91:1-9.

Pintos J, Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP. Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aero-digestive tract: a case-control study. **Int J Epidemiol** 1998; 27:936-40.

Plass C. Cancer epigenomics. **Hum Mol Genet** 2002; 11:2479-88.

Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. **Head Neck** 2001; 23:147-59.

Rajini B, Graham C, Wistow G, Sharma Y. Stability, homodimerization, and calcium-binding properties of a single, variant betagamma-crystallin domain of the protein absent in melanoma 1 (AIM1). **Biochemistry** 2003; 42:4552-9.

Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS, Trent JM. AIM1, a novel non-lens member of the betagamma-crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:3229-34.

Reed AL, Califano J, Cairns P, et al.. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 1996; 56:3630-3.

Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. **Carcinogenesis** 2000; 21:461-7.

Robertson KD. DNA methylation and human disease. **Nature** 2005; 6:597-610.

Rosas SLB, Koch W, Carvalho MGC, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2001; 61:939-42.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. **Biotechniques** 1994; 17: 914-21.

Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, et al. Inactivation of the p14ARF, p15INK4B and p16INK4A genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 2001; 37:498-504.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:210-9.

Sidransky D. Cancer of the head and neck. In: De Vitta VT, Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p.653-743.

Smigiel R, Sasiadek M, Krecicki T, Ramsey D, Jagielski J, Blin N. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. **Mol Carcinog** 2004; 39:147-54.

Smiraglia DJ, Smith LT, Lang JC. Differential targets of CpG island hypermethylation in primary and metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **J Med Genet** 2003; 40:25-33.

Smith BD, Haffty BG. Prognostic factors in patients with head and neck cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. **Head and neck cancer: a multidisciplinary approach**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.49-73.

Spitz MR, Sturgis EM, Wei Q. Molecular epidemiology and genetic predisposition for head and neck cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. **Head and neck cancer: a multidisciplinary approach**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.937-47.

Spurbeck WW, Ng CY, Strom TS, Vanin EF, Davidoff AM. Enforced expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 affects functional capillary morphogenesis and inhibits tumor growth in a murine tumor model. **Blood** 2002; 100:3361-8.

Teppo H, Koivunen P, Hyrykangas K, et al. Diagnostic delays in laryngeal carcinoma: professional diagnostic delay is a strong independent predictor of survival. **Head Neck** 2003; 25:389-94.

Thenot S, Bonnet S, Boulahtouf A, Margeat E, Royer CA, Borgna JL, Cavailles V. Effect of ligand and DNA binding on the interaction between human transcription intermediary factor 1alpha and estrogen receptors. **Mol Endocrinol** 1999; 13:2137-50.

Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, et al. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. **Cancer Res** 2004; 64:5982-7.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:8681-6.

Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. **J Clin Invest** 2000; 105:401-7.

Ushijima T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:223-31.

Wang WJ, Kuo JC, Yao CC, Chen RH. DAP-kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. **J Cell Biol** 2002; 159:169-79.

Worm J, Guldberg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target to anticancer therapy. **J Oral Pathol Med** 2002; 31:443-9.

Wu L, Patten N, Yamashiro CT, Chui B. Extraction and amplification of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2002; 10:269-74.

Wünsch-Filho V The epidemiology of oral and pharyngeal cancer in Brazil. **Oral Oncol** 2002; 38:737-46.

Yang R, Müller C, Huynh V, Fung YK, Yee AS, Koeffler HP. Functions of cyclin A1 in the cell cycle and its interactions with transcription factor E2F-1 and the Rb family of proteins. **Mol Cell Biol** 1999; 19:2400-7.

Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. **J Biol Chem** 2000; 275:31226-32.

Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. **J Clin Pathol** 2002; 55:58-60.

Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. **J Clin Pathol** 2004; 57:654-6.

Zuo C, Ai L, Ratliff P, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:967-75.

ANEXOS

Anexo 1 - Registro da coleta de dados

Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

Laboratório de Genética do câncer

Fundação Antônio Prudente / Hospital do Câncer

Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia

“HIPERMETILAÇÃO DE PROMOTORES GÊNICOS EM SORO E SALIVA DE PACIENTES COM CÂNCER DAS VIAS AERODIGESTIVAS SUPERIORES”

Luciane Tsukamoto Kagohara, Dr. André Lopes Carvalho,
Dr. André Luiz Vettore, Dra. Otávia LD Caballero, Dr. Luiz Paulo Kowalski

I. Identificação e dados demográficos:

1. Número no estudo: _____
2. RGH: _____
3. Idade: _____ anos
4. Sexo: ☐ 1-masculino ☐ 2-feminino
5. Raça: ☐ 1-branca ☐ 2-não branca

II. História clínica:

6. Tempo de história: _____ meses (999 se desconhecido)
7. Tabagismo: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-desc.
8. Etilismo: ☐ 0-não ☐ 1- sim ☐ 9-desc.

III. Locorregional:

9. Local de tumor: ☐ 1- boca ☐ 2- orofaringe ☐ 3-hipofaringe ☐ 4-laringe
10. Tipo de lesão: ☐ 1-ulcerovegetante ☐ 2-ulceroinfiltrativa
11. Estádio T (atualizar UICC 87): ☐ 1-T1 ☐ 2-T2 ☐ 3-T3 ☐ 4-T4
12. Estádio N (atualizar UICC 87): ☐ 0-N0 ☐ 1-N1 ☐ 2-N2a ☐ 3-N2b ☐ 4-N2c ☐ 5- N3
13. Estádio clínico: ☐ 0-E0 ☐ 1-E1 ☐ 2-E2 ☐ 3-E3 ☐ 4-E4a ☐ 5- E4b ☐ 6- E4c

IV. Cirurgia:

14. Data da cirurgia: ____/____/____
15. Cir. Tumor primário: ☐ 1-cirurgia sem esvaz. cervical ☐ 2- cirurgia com esvaz. cervical ipsilateral
☐ 3- cirurgia com esvaz. cervical contral. (simult.)
16. Data da alta hospitalar: ____/____/____

V. Coleta sangue:

17. ☐ 0-não ☐ 1-sim pré e pós-operatórias - datas: _____

V. Coleta saliva:

18. ☐ 0-não ☐ 1-sim pré e pós-operatórias - datas: _____

VI. Radioterapia pós-operatória:

19. : ☐ 0-não ☐ 1-sim

VII. Quimioterapia pós-operatória:

- 20 ☐ 0-não ☐ 1-sim

VIII. AP:

- 21 ☐ 1-CEC GI ☐ 2-CEC GII ☐ 3-CEC GIII ☐ 4-CEC INDIFERENCIADO
- 22 Embolização vascular: ☐ 0-não ☐ 1-linfática ☐ 2-sangüínea ☐ 3-ambas ☐ 9-ign.
- 23 Infiltração perineural: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
- 24 Infiltração muscular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
- 25 Infiltração óssea: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
- 26 Margens: ☐ 0-livres ☐ 1-comprometidas ☐ 9-ignorado
- 27 Linfonodos ☐ 0-livres ☐ 1-comprometidos ipsi ☐ 2- compr. contra ☐ 3- compr. bilateral ☐
9-ignorado

VIII. Evolução:

20. Recidiva local: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ign.
21. Recidiva cervical: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ign.
22. Metástase à distância: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ign.
23. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (10/10/1910 se não teve)
24. Locais de recidiva: ☐ 0-não teve ☐ 1-local ☐ 2-pescoço ipsi ☐ 3-pescoço contra ☐ 4-pulmão ☐ 5-osso ☐ 6-fígado ☐ 7-outra à distância _____ ☐ 8-teve recidiva, local ignorado ☐ 9-ignorado (perdido de vista assintomático < 5 anos)
25. Segundo tumor primário: ☐ 0-não ☐ 1-sim ☐ 9-ign.
26. Data do diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (10/10/1910 se não teve)
27. Local do segundo tumor primário: CID-O _____ 9 (se não teve)
28. Data da última informação objetiva de seguimento: ____/____/____
29. Situação na última informação de seguimento: ☐ 1-vivo 000 ☐ 2-vivo com CA ☐ 3 - Moca ☐ 4- Moci ☐ 5-Moass _____ ☐ 6-perdido de vista (definição: para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como vivos 000)

OBS: Para pacientes perdidos de vista: anotar nome, endereço e telefone. Entregar o prontuário aos responsáveis pela convocação de pacientes esta lista diariamente.