

Vitor Rafael Regiani

Metilação das regiões promotoras dos genes
RASSF1A e *MGMT* na Carcinogênese de
Cabeça e Pescoço

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de São José do Rio Preto para
obtenção do Título de Mestre no Curso de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo
Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

São José do Rio Preto
2015

Regiani, Vitor Rafael

Metilação das regiões promotoras dos genes *RASSF1A*
e *MGMT* na Carcinogênese de Cabeça e Pescoço/ Regiani,
Vitor Rafael

São José do Rio Preto, 2015

76p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio
Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino

1. Metilação; 2. Câncer de cabeça e pescoço; 3. Carcinoma
Espinocelular

VITOR RAFAEL REGIANI

Metilação das regiões promotoras dos genes
RASSF1A e *MGMT* na Carcinogênese de
Cabeça e Pescoço

BANCA EXAMINADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Érika Cristina
Pavarino

1º Examinador: Debora Aparecida Pires de Campos
Zuccari

2º Examinador: Rodrigo Castro

1º Suplente: Patrícia Matos Biselli Chicote

2º Suplente: Sandro José Conde

São José do Rio Preto, 10 de junho de 2015

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	iv
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vi
Lista de Gráficos.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
I. Introdução.....	1
II. Casuística e Métodos.....	9
III. Resultados.....	20
IV. Discussão.....	30
V. Conclusão.....	39
VI. Referências Bibliográfica.....	41
VII. Anexos.....	56
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	57
Anexo II – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	58

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Aparecida Graciosa Ochiucci Regiani, pelo eterno amor, carinho, dedicação, educação e ensinamentos. Te amo mãe.

A minha irmã e meu cunhado, Carla Regiani Conde e Sandro Conde, por fazer parte da minha família e da minha vida. Te amo Carla.

Aos amigos, que estiveram presentes na realização deste trabalho por tudo que pudemos compartilhar a convivência, as alegrias, as frustrações, as descobertas, enfim pelo o que aprendemos.

À minha namorada, Carolina Martins Lima, pela paciência, apoio, incentivo e carinho. Obrigado por estar ao meu lado.

Aos professores, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência e por serem exemplos de verdadeiros profissionais.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, primeiramente, por ter me dado força durante o curso, a meio de dificuldades. Por ter me iluminado nas decisões mais difíceis e por ter me guiado ao longo do curso para trilhar o caminho mais correto possível.

À Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino pelo acolhimento, disponibilidade e orientação durante o mestrado, meus sinceros agradecimentos pela confiança e apoio, durante a realização deste trabalho.

As Professoras Dr^a Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari e Dr^a Eny Maria Goloni-Bertollo pela oportunidade de ganho de conhecimento e experiência profissional, que com competência e sabedoria me acolheram.

Aos meus amigos que sempre estiveram dispostos a ajudar Rodrigo, Ana Lúvia, Patrícia, Joice, Anelise, Cristiani, Gustavo, Tialfi, Carlos, Márcia e a todos os companheiros da **UPGEM** - Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular e do **Bloco U6**.

Ao Seu João e a turma do café pelos momentos de descontração necessários para revitalizar as energias.

Aos amigos do LIMC - Laboratório de Investigação Molecular do Câncer-FAMERP.

À Prof^ª Dr^a Claudia Rainho e sua aluna **Mariana**, UNESP – Botucatu, pela colaboração, atenção, paciência e carinho.

À Diretoria da FAMERP e do Hospital de Base de São José do Rio Preto, pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), **ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e **à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro.

Aos médicos e residentes responsáveis pelo Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FAMERP, pela colaboração na coleta de amostras e dados dos pacientes.

Aos pacientes com câncer de cabeça e pescoço que colaboraram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Nada que se realiza no mundo se constrói sozinho, meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta pesquisa.

EPIGRAFE

O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.

Abraham Lincoln

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Curva padrão com porcentagens de metilação (100, 50, 25, 10, 5 e 0%) para o gene <i>RASSF1A</i>	17
Figura 2.	Curva padrão com porcentagens de metilação (100, 50, 25, 10, 5 e 0%) para o gene <i>MGMT</i>	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados epidemiológicos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço.....	11
Tabela 2.	Dados epidemiológicos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço.....	12
Tabela 3.	Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria T). Informação obtida para 42 pacientes.....	12
Tabela 4.	Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria N). Informação obtida para 42 pacientes.....	13
Tabela 5.	Sequências dos primers para os genes <i>RASSF1</i> e <i>MGMT</i>	18
Tabela 6.	Porcentagens de metilação nos genes <i>RASSF1</i> e <i>MGMT</i> nos tecidos tumorais, tecidos normais adjacentes e sangue periférico.....	22
Tabela 7.	Presença de metilação nas 16 amostras de tecidos tumorais que possuem amostras pareadas de tecidos adjacentes ou sangue periférico para o gene <i>RASSF1A</i>	22
Tabela 8.	Presença de metilação nas 16 amostras de tecidos tumorais que possuem amostras pareadas de tecidos normais adjacentes ou sangue periférico para o gene <i>MGMT</i>	23

Tabela 9.	Presença ou ausência de metilação nos genes <i>RASSF1A</i> e <i>MGMT</i> em relação às características do paciente e do tumor em 37 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço.....	28
Tabela 10.	Associação da metilação nos genes <i>RASSF1A</i> e <i>MGMT</i> com os fatores epidemiológicos (gênero e idade), hábitos tabagista e etilista e parâmetros clínicos do tumor em 37 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecidos tumorais e não tumorais (tecido adjacente e sangue) para os genes *RASSF1A* (P=0,027) e *MGMT* (P=0,002), respectivamente..... 24

Gráfico 2. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecido tumoral, sangue e tecido adjacente analisadas para o gene *RASSF1A*..... 24

Gráfico 3. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecido tumoral, sangue e tecido adjacente analisadas para o gene *MGMT*..... 25

Gráfico 4. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecido tumoral, sangue e tecido adjacente analisadas para o gene *MGMT*..... 26

Gráfico 5. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecidos tumorais e não tumorais provenientes da cavidade oral e faringe e da laringe analisadas para o gene *MGMT*..... 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
AJCC	<i>American Joint Committee for Cancer</i>
Buffer BD	<i>Desulfonation Buffer</i>
Buffer BL	<i>Bacterial Lysis Buffer</i>
Buffer BW	<i>Wash buffer</i>
Buffer EB	<i>Elution Buffer</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CpG	<i>Cytosine phosphodiester Guanine</i>
DAPK	<i>Death-associated protein kinase</i>
DNA	Ácidodesoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
RE	Receptor de estrogênio
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
GTP	Guanosina
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IC	Intervalo de confiança
UICC	<i>Union International Control Cancer</i>
M	Metilado

M	Presença de metástase à distância
MeC	Methyl-C
<i>MGMT</i>	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
mL	Mililitro
<i>MLH1</i>	MutL Homolog 1
mM	Milimolar
MN	Não-Metilado
MSP	<i>Methylation Specific Polymerase Chain Reaction</i>
N	Presença de linfonodos regionais comprometidos
NA	Não amplificaram
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
OR	<i>Odds ratio</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RA	Ras
<i>RASSF1A</i>	<i>Ras association domain family member 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Repetições por minute
SAM	S-adenosilmetionina
SDS	Dodecilsulfato de sódio
T	Tamanho do tumor
Tris-HCl	<i>Tris-Hydrochloride</i>

UNESP Universidade Estadual Paulista

RESUMO

Introdução: A metilação do DNA desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica. Durante a tumorigênese, a hipermetilação em regiões promotoras ricas em ilhas CpG (*Cytosine phosphodiester Guanine*) é um mecanismo que pode inativar genes supressores de tumor e contribuir para o desenvolvimento do câncer.

Objetivo: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a metilação das regiões promotoras dos genes supressores de tumor *RASSF1A* (*Ras association domain family member 1*) e *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. **Casuística e Métodos:** A análise de metilação das regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* foi realizada pela técnica *High Resolution Melting* (HRM) em 42 e 37 amostras de tecidos tumorais, respectivamente.

Amostras de tecido adjacente ao tumor ou de sangue periférico foram utilizadas como controle. **Resultados:** Para o gene *RASSF1A*, 50% (21 de 42) das amostras de tecidos tumorais analisadas foram metiladas, enquanto para o *MGMT*, das 37 amostras de tecidos tumorais analisadas, 17 (46%) apresentaram metilação. A análise estatística entre os pares de amostras tumorais e controles (tecido adjacente ao tumor e sangue periférico) mostrou diferença significativa quanto à presença de metilação para o gene *RASSF1A* ($P=0,027$, teste de Qui-quadrado) e para o gene *MGMT* ($P=0,002$, teste de Qui-quadrado). A avaliação da presença de metilação entre subgrupos de tecido tumoral e tecido adjacente não mostrou diferença significativa para os genes *RASSF1A* ($P=1,0$) e *MGMT* ($P=0,38$). Para o subgrupo de tecido tumoral e sangue periférico o resultado estatístico foi significativo para os genes *RASSF1A* ($P=0,005$) e *MGMT* ($P=0,002$). A análise da presença de metilação nos tumores em relação aos tecidos não tumorais

(tecidos adjacentes ou sangue periférico) nos diferentes sítios anatômicos de ocorrência primária mostrou que, em cavidade oral e faringe não houve diferença estatística significativa para o gene *RASSF1A* ($P=0,233$) em relação às amostras não tumorais; para gene *MGMT* o resultado estatístico foi significativo ($P=0,033$). Em laringe, o resultado estatístico foi significativo para o gene *RASSF1A* ($P=0,04$) em relação às amostras não tumorais, enquanto para o gene *MGMT*, o resultado estatístico não foi significativo ($P=0,998$). A presença de metilação no gene *MGMT* bem como em ambos os genes concomitantemente, *RASSF1A* e *MGMT*, foi associada com a categoria N ($P=0,045$ e $P=0,035$, respectivamente). Para o gene *RASSF1A* não foi observada tal associação ($P=0,093$). A análise por meio da regressão logística múltipla da influência dos fatores epidemiológicos (gênero e idade), dos fatores de risco (tabagismo e etilismo) e parâmetros clínicos do tumor quanto à presença de metilação não mostrou associação significativa para essas variáveis. **Conclusões:** A presença de metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* apenas no tecido tumoral da maioria dos pares de amostras (tecido tumoral e não tumoral) sugere o envolvimento desses genes no processo neoplásico de cabeça e pescoço, em especial do gene *MGMT* em tumores da cavidade oral e faringe e do gene *RASSF1A* na laringe. Não há associação entre metilação dos genes *RASSF1A* e *MGMT* e a idade, o gênero, os hábitos tabagista e etilista e os parâmetros clínicos do tumor.

ABSTRACT

Introduction: DNA methylation plays an important role in regulating gene expression. During tumorigenesis, the hypermethylation of CpG-rich islands in promoter regions (Cytosine phosphodiester Guanine) is a mechanism that can inactivate tumor suppressor genes and contribute to the development of cancer. **Objective:** This study aimed to evaluate the methylation of promoter regions of tumor suppressor genes *RASSF1A* (Ras association domain family member 1) and *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Methods:** The methylation analysis of promoter regions of *RASSF1A* and *MGMT* genes was performed using the High Resolution Melting (HRM) in 42 and 37 tumor tissue samples, respectively. Samples of tissue adjacent to the tumor or peripheral blood were used as controls. **Results:** For the *RASSF1A* gene, 50% (21 of 42) of tumor tissue samples analyzed were methylated, whereas for *MGMT* of 37 tumor tissue samples analyzed, 17 (46%) showed methylation. Statistical analysis between pairs of tumor samples and controls (tissue adjacent to the site of tumor and peripheral blood) showed significant differences in the presence of methylation for the *RASSF1A* gene ($P = 0.027$, Chi-square test) and the *MGMT* gene ($P = 0.002$, Chi-square test). The evaluation of the presence of methylation between tumor tissue and surrounding tissue showed no significant difference for *RASSF1A* genes ($P = 1.0$) and *MGMT* ($P = 0.38$). For the subset of tumor tissue and peripheral blood statistic was significant for *RASSF1A* ($P = 0.005$) and *MGMT* ($P = 0.002$) genes. Analysis of the presence of methylation in tumors relative to non-tumor tissues (tissues adjacent to tumor or peripheral blood) in different anatomical sites of primary occurrence showed that in oral cavity and pharynx no statistically

significant difference for the *RASSF1A* gene ($P = 0.233$) relative to non-tumor samples; *MGMT* gene statistical results were significant ($P = 0.033$). In the larynx, the statistical results were significant for the *RASSF1A* gene ($P = 0.04$) compared to non-tumor samples, while for the *MGMT* gene, the result was not statistically significant ($P = 0.998$). The presence of the methylation of the *MGMT* gene in both genes simultaneously, *RASSF1A* and *MGMT*, were associated with the category N ($P = 0.045$ and $P = 0.035$, respectively). For the *RASSF1A* gene was not observed this association ($P = 0.093$). The analysis by multiple logistic regression of the influence of epidemiological factors (gender and age), risk factors (smoking and drinking) and clinical parameters of the tumor for the presence of methylation showed no significant association for these variables. **Conclusions:** The prevalence presence of methylation in the promoter region of *RASSF1A* and *MGMT* genes in tumor tissue of the pairs of samples (tumor and non-tumor tissue) suggests the involvement of these genes in the process of squamous cells carcinoma of the head and neck, in particular of the *MGMT* gene in tumors of the oral cavity and pharynx and *RASSF1A* gene in larynx tumors. No was observed association between methylation of *RASSF1A* and *MGMT* genes and age, gender, the tobacco and alcohol consumption and clinical tumor parameters.

I. INTRODUÇÃO

O “Câncer de cabeça e pescoço” é um termo coletivo que descreve tumores localizados em diferentes regiões anatômicas do trato aerodigestivo superior.^(1,2) Aproximadamente 40% ocorrem na cavidade oral (mucosa da boca, lábio, base da língua, língua e palato alto), 15% na faringe (hipofaringe, nasofaringe e orofaringe), 25% na laringe e 20% em outros sítios anatômicos (glândulas salivares e tireóide).⁽³⁾ O tipo histológico mais frequente é o carcinoma espinocelular que representa aproximadamente 90% do total de casos.^(4,5)

É considerado o quinto tipo de câncer mais comum no mundo⁽⁶⁾ e 550.000 novos casos são diagnosticados anualmente.⁽⁷⁾ No Brasil a última estimativa para as neoplasias localizadas na cavidade oral, realizada em 2012, foi de 14.170 novos casos e para aquelas localizadas na laringe a última estimativa, realizada em 2014, foi de 7.640 casos.⁽⁸⁾ Para a faringe, em 2012, foram estimados 6.308 casos (804 na nasofaringe e 5.504 em outros sítios anatômicos da faringe).⁽⁹⁾

As neoplasias de cabeça e pescoço estão associadas a altas taxas de mortalidade.⁽¹⁰⁾ A taxa de sobrevivência global para esse tipo de câncer é variável pois depende do sítio primário de ocorrência e do estágio da doença. Para o câncer da cavidade oral, a taxa global de sobrevivência é de 50% ao longo de cinco anos.⁽¹¹⁾ Para outros sítios (faringe e laringe), a taxa é superior a 50% para a doença em estágio inicial (T1-T2, N0) e, geralmente, menos de 50% em estágios avançados (T3-T4, N0, T3-T4, N+, ou qualquer T e N2-N3).⁽¹²⁾ Em 2010, 4.891 óbitos foram registrados no Brasil em função do câncer oral e, em 2011, 3.889 como resultado do câncer de laringe.⁽¹³⁾ A última estimativa para o câncer de faringe, em 2012, registrou 4.487 óbitos (364 para nasofaringe e 4.123 para outros sítios anatômicos da faringe).⁽⁹⁾

Os principais fatores associados ao desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço incluem consumo de tabaco e álcool.^(14,15) A incidência deste tipo de câncer é quatro a sete vezes maior em indivíduos fumantes^(16,17), e acredita-se que o efeito direto dos radicais livres e outros carcinógenos presentes no cigarro nas células epiteliais gradualmente acumulam-se e resultam em transformação maligna.⁽¹⁷⁾ Estudos em animais indicam que o álcool apesar de não genotóxico, pode agir como solvente para a penetração de carcinógenos e possui como metabólito primário o acetaldeído, que é um metabólito altamente reativo que pode se ligar a proteínas, constituintes celulares e ao DNA, formando adutos estáveis.^(18,19)

Outros fatores podem contribuir para a carcinogênese de cabeça e pescoço tais como a poluição ambiental, certas condições laborais associadas às indústrias metalúrgica e petroquímica e, a predisposição e herança familiar.⁽²⁰⁾ Infecções virais, especialmente causadas pelos vírus Epstein-Barr e Papilomavírus Humano dos subtipos 16 e 18, além de deficiências ou desequilíbrios de vitaminas e micronutrientes, tais como, vitaminas A, C, E, zinco, selênio e ácido fólico também estão associados à ocorrência de neoplasias de cabeça e pescoço.⁽²¹⁻²³⁾

O ácido fólico, folato ou vitamina B9, uma vitamina hidrossolúvel do complexo B, desempenha um papel importante na manutenção da metilação do DNA e, assim, da estabilidade genômica.⁽²⁴⁾ O metabolismo do folato é responsável, em uma de suas vias, pela síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador intracelular de grupos metil, para reações de metilação do DNA, proteínas e lipídios.⁽²⁵⁻³²⁾

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente nas repetições de dinucleotídeos CpG (*Cytosine phosphodiester Guanine*) no genoma humano.⁽³³⁻³⁵⁾ Os dinucleotídeos podem ser agrupados em pequenas extensões de DNA conhecidas por

"ilhas CpG".⁽³⁶⁾ Estas ilhas são frequentemente associadas às regiões promotoras dos genes e geralmente não metiladas.⁽³⁷⁾ Em contraste, a maioria (cerca de 70-80%) dos dinucleotídeos CpG não associados as ilhas CpG são fortemente metilados. A metilação também pode ocorrer em citosinas que não estão em sequências CpG, o que é raro, e acontece apenas nas células-tronco embrionárias.^(38,39)

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH₃) é transferido da SAM para o carbono 5 de uma citosina (5-MeC) que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs).⁽⁴⁰⁾ Estas enzimas estão divididas em duas classes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA (fitas de DNA em processo de replicação), conhecidas como metilases de manutenção como a *DNMT1*; outra classe, responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorre em sítios com nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as *DNMT2*, *DNMT3A* e *DNMT3B*.⁽⁴⁰⁾

Outro grupo de enzimas, representado pelas desmetilases, é responsável pela desmetilação do DNA. Este processo é necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas a perturbações ambientais. A desmetilação ainda pode ser passiva quando não há envolvimento de desmetilases e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativa durante o ciclo celular. Assim, o nível e o padrão de 5-MeC é determinado por ambos os processos de metilação e desmetilação, e as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas.⁽⁴¹⁾

Padrões alterados de metilação têm sido identificados em diversos tipos de câncer.⁽⁴²⁾ Acredita-se que a hipometilação global do genoma resulte na expressão elevada de oncogenese⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Por outro lado, a hipermetilação de ilhas CpG, localizadas em regiões promotoras de genes, é associada a alterações na expressão gênica, resultando no silenciamento de genes supressores de tumor.⁽⁴⁶⁾

Em tumores, as alterações epigenéticas do tipo hipermetilação são mais frequentemente observadas do que a hipometilação. A metilação em regiões ricas em CG pode ocorrer em genes implicados com diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer, tais como: supressão do tumor (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *TP53*, *BRCA1* e *RASSF1A*), reparo do DNA (*hMLH1* e *MGMT*) e, invasão e metástase (*CDH1*, *ECAD*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *DAPK*).⁽⁴²⁾

Alguns desses genes tais como *RASSF1A* e *MGMT* apresentam hipermetilação de regiões promotoras associadas com perda da expressão protéica em células tumorais.⁽⁴⁷⁻⁵³⁾ Em carcinoma de cabeça e pescoço, a metilação pode ocorrer anteriormente ao desenvolvimento das lesões, o que enfatiza a importância da metilação como um biomarcador precoce para esse tipo tumoral.⁽⁵⁴⁾

O gene *MGMT* (O6-methylguanine-DNA methyltransferase), localizado em 10q26, tem sido amplamente estudado neste contexto. Estudos em câncer de cabeça e pescoço mostram percentuais de metilação para a região promotora deste gene de 23 a 56,4% no tecido tumoral⁽⁵⁵⁻⁶⁰⁾ versus 9% na mucosa oral de indivíduos saudáveis.⁽⁵⁹⁾ Também têm sido observadas frequências de metilação para este gene de 68 a 73% em tecido adjacente à lesão^(58,60) e de 56 e 80% em amostras de leucoplasia oral⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ o que sugere que a metilação do gene *MGMT* pode estar associada ao estágio inicial da lesão e pode ser útil para o diagnóstico e prognóstico do câncer de cabeça e pescoço.

A proteína codificada pelo gene *MGMT* é fundamental para eliminar as lesões pré-mutagênicas que podem resultar no câncer, pois previne a citotoxicidade celular, causada por agentes metilantes endógenos e exógenos, por meio da remoção do grupo metil da posição O-6 da base guanina do DNA. Nesse processo, a *MGMT* transfere o grupo metil para seu próprio resíduo de cisteína o que resulta na sua inativação e reparo da guanina.⁽⁶²⁻⁶⁴⁾ A inativação da proteína *MGMT*, em função da metilação da região promotora do gene, é fenômeno comum observado em neoplasias de cabeça e pescoço como referido acima .

O gene *RASSF* (*Ras association family member*), isoforma *RASSF1A*, localizado em 3p21.3, também se apresenta metilado em câncer de cabeça e pescoço, com frequências de metilação na região promotora que variam de 7,5% a 71% em câncer oral, de faringe e de laringe⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾ e de 35% em câncer da glândula salivar.⁽⁷⁰⁾ Este evento também tem sido considerado útil para o diagnóstico, uma vez que representa um evento precoce na tumorigênese de cabeça e pescoço.^(54,67)

A proteína *RASSF1A* está envolvida na regulação de uma variedade de funções biológicas, incluindo controle do ciclo celular e apoptose.⁽⁷¹⁻⁷⁴⁾ Em sua estrutura, esta proteína possui um domínio de associação Ras (RA) que permite sua interação com as proteínas da família Ras.⁽⁷⁵⁾ Embora inicialmente as proteínas Ras tenham sido caracterizadas como supressoras da apoptose, estudos têm mostrado que estas oncoproteínas também podem induzir a parada do crescimento celular por meio da apoptose e senescência por interagirem com efetores específicos.⁽⁷⁶⁾ De fato, *RASSF1A* age como um efetor negativo para as proteínas Ras, de modo GTP dependente, e induz a apoptose e inibição do crescimento.⁽⁷⁷⁾

Considerando que alterações na expressão de *RASSIA* e *MGMT* podem modular a susceptibilidade do câncer, é importante estudos que investiguem a metilação da região promotora desses genes em neoplasias de cabeça e pescoço.

I.1. OBJETIVOS

1. Avaliar a presença de metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* (*Ras association domain family member 1*) e *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) em amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e em suas respectivas margens cirúrgicas ou no sangue periférico;
2. Associar a presença de metilação das regiões promotoras desses genes com as características clínico-patológicas (sítios primários de ocorrência e extensão do tumor, comprometimento de linfonodos e agressividade do tumor) e hábitos etilista e tabagista, idade e gênero.

II. CASUÍSTICA E MÉTODOS

II.1. Casuística

As amostras de tecido tumoral, tecido adjacente e de sangue periférico foram procedentes de pacientes que não receberam tratamento quimio ou radioterápico pré-operatório cirúrgico e, obtidas no Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Base, Hospital de Ensino da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Os tecidos tumorais adjacentes foram submetidos à macrodissecção no Serviço de Patologia do Hospital de Base de São José do Rio Preto para obtenção de fragmentos contendo no mínimo 70% de células tumorais ou de ausência de células neoplásicas, respectivamente.

De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 66/2012 do Conselho Nacional de Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), parecer nº 201/2009 (Anexo 1). Após consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) foram coletadas para o estudo 42 amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, 22 amostras de tecido aparentemente normal adjacente ao tumor e 20 amostras de sangue periférico de indivíduos acometidos pelo tumor. Estas últimas foram coletadas quando não foi possível a obtenção do tecido adjacente ao tumor.

Os dados clínicos e epidemiológicos dos 42 pacientes com câncer de cabeça e pescoço estão apresentados na Tabela 1. Foram analisados os dados referentes à idade, tabagismo, etilismo e gênero. Informações sobre o tabagismo e etilismo foram limitadas quanto ao consumo ou não de tabaco e álcool. Os tumores foram classificados quanto à

localização anatômica em cavidade oral, faringe e laringe, de acordo com Lee, 2003 (Tabela 2). A classificação clínica foi realizada de acordo com os parâmetros da *Union International Control Cancer (IUCC)* e *American Joint Committee for Cancer (AJCC)*, 2002, em três critérios: tamanho do tumor (T), presença de linfonodos regionais comprometidos (N) e presença de metástase à distância (M). As Tabelas 3 e 4 apresentam a classificação do tumor quanto às categorias T e N, respectivamente. Em relação à presença de metástase a distância, apenas um paciente apresentou M e foi classificado em TXN3M1. Tumores com estadios I e II (T1N0, T2N0 ou T2N1) foram agrupados em tumores com menor agressividade e aqueles com estadios III e IV (T2N2, T3N0, T3N1, T3N2, T4N0, T4N1, T4N2 ou T4N3) foram agrupados em tumores avançados.

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

	Pacientes n (%)
Nº de indivíduos	42
Idade (anos)*	
≥61	21 (50,0)
<61	21 (50,0)
Tabagista	39 (92,86)
Etilista	32 (76,20)
Gênero	
Masculino	37 (88,10)
Feminino	5 (11,90)

*mediana de idade: 61anos (variação: 22 - 88 anos)

Tabela 2. Distribuição entre os casos por sítio primário de ocorrência do tumor.

Sítio anatômico primário	n (%)
Cavidade oral	21 (50,00)
Laringe	11(26,19)
Faringe (orofaringe, nasofaringe e hipofaringe)	10 (23,81)

Tabela 3. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria T). Informação obtida para 42 pacientes.

Sítio primário do tumor	T1	T2	T3	T4	Tx
Cavidade oral	06	10	02	02	0
Laringe	01	01	02	08	0
Faringe	0	01	02	07	0

Tabela 4. Distribuição dos sítios anatômicos primários do tumor em relação ao TNM (categoria N). Informação obtida para 42 pacientes.

Sítio primário do tumor	N0	N+	Nx
Cavidade oral	13	05	02
Laringe	04	04	05
Faringe	01	08	0

N0: Ausência de linfonodos comprometidos; N+: Presença de linfonodos comprometidos; Nx – Não foi possível a avaliação.

II.2. Análise Molecular

II.2.1. Extração de DNA a partir de tecido

O DNA genômico dos tecidos tumorais e de suas respectivas margens cirúrgicas foram extraídos com *TRIzol® Reagent (Invitrogen)*, de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, os fragmentos de tecido com aproximadamente 100 mg foram macerados manualmente em almofariz, com pistilo e adição de nitrogênio líquido. Para cada 10 mg de tecido foi adicionado 1mL de *TRIzol® Reagent*. O material foi, então, distribuído em microtubos de 1,5 mL e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio gelado para cada mL de *TRIzol® Reagent*. O material foi agitado por aproximadamente 20 segundos e permaneceu por 3 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi acondicionado em gelo. As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C para separação das fases aquosa, interfase (que contém DNA) e fase orgânica. A fase aquosa

foi transferida para um microtubo para extração de RNA que é utilizado em outro estudo do grupo de pesquisa. Ao material restante foram adicionados 300 µL de etanol 100% para cada mL de *TRIzol® Reagent* e o microtubo foi homogeneizado por inversão e estocado em temperatura ambiente por 2 minutos. Após este período, o material foi centrifugado a 2.000g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de DNA foi submetido a duas lavagens com solução de 0,1M de citrato de sódio em 10% de etanol (1 mL de solução para cada mL de *TRIzol® Reagent*) e uma com etanol 75% (2 mL para cada mL de *TRIzol® Reagent*). Após incubação em temperatura ambiente por 20 minutos foi centrifugado a 2.000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi mantido por 15 minutos em temperatura ambiente e diluído em 600 µL de solução de NaOH 8mM. Foi, então, centrifugado a 12.000g por 10 minutos para remoção de material insolúvel. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para novo tubo e estocado a -20°C.

II.2.2. Extração de DNA a partir de sangue periférico

A extração de DNA a partir de sangue periférico foi realizada segundo Miller e colaboradores (1988), com modificações. Após a coleta de 5mL de sangue em tubo vacutainer contendo anticoagulante (EDTA), o tubo foi homogeneizado e o sangue distribuído em tubos de centrífuga devidamente identificados, contendo quantidade equivalente de gradiente de densidade (Ficoll-Paque) em temperatura ambiente, evitando que o mesmo se misturasse com sangue. O material foi, então, centrifugado por 30 minutos a 1.500rpm, para a formação de três camadas distintas: hemáceas na porção inferior do tubo, Ficoll-Paque na fase intermediária e plasma na porção superior. O plasma foi aspirado com uma pipeta Pasteur e descartado e a camada de linfócitos,

formada entre o plasma e o Ficoll-Paque, foi transferida para um novo tubo de centrifuga. Foi adicionado tampão PBS 1X (solução salina) aos linfócitos até completar 15mL e o tubo foi cuidadosamente invertido e centrifugado a 1.200rpm por 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” de linfócitos ressuspendido foi lavado novamente em PBS 1X. Aos linfócitos isolados, foram adicionados 3mL de tampão de lise (Tris-HCl 10mM; NaCl 400mM; Na₂EDTA 2mM); 200mL de SDS 10% e 50mL de proteinase K (20mg/ml). O tubo foi incubado por 16 horas a 37°C e, após este período, foi adicionado 1mL de NaCl 6M (solução saturada) ao material que foi submetido a agitação e, em seguida mantido no gelo por 15 minutos. Após este período, o tubo foi novamente agitado e centrifugado a 2.000rpm. Nesta etapa o material digerido precipita juntamente com o sal (NaCl) e o DNA permanece no sobrenadante. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo que recebeu 10mL de etanol 100% gelado. O tubo foi cuidadosamente invertido e o DNA precipitado foi transferido para um microtubo contendo 500mL de etanol 70% em temperatura ambiente. Em seguida, o microtubo foi centrifugado a 12.000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi ressuspendido em 200mL tampão (Tris 10mM e EDTA 1mM) e armazenado em freezer a -20°C.

II.2.2. Análise de metilação dos genes *RASSF1A* e *MGMT*

A análise de metilação das regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT*, pela técnica *High Resolution Melting* (HRM), foi realizada para 19 amostras de tecido adjacente ao tumor e 18 de sangue periférico, pois cinco amostras (três de tecido adjacente ao tumor e duas de sangue periférico) não amplificaram. Para as amostras

tumorais o gene *RASSF1A* foi analisado em 42 amostras enquanto para o *MGMT* a análise foi possível em 37 delas, pois cinco amostras tumorais não amplificaram para este gene.

II.2.3. Conversão do DNA pelo bissulfito:

Anterior à técnica de *High Resolution Melting* (HRM) as amostras foram submetidas à conversão do DNA pelo bissulfito. As reações de conversão foram realizadas com Kit de bissulfito Epitect (*Qiagen*) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA diluídas em *RNAse-freewater* (20µl), solução de bissulfito (85µl) e *DNA Protect Buffer* (35µl) foram mantidas em termociclador por aproximadamente cinco horas, alternando-se as temperaturas entre 95°C (desnaturação) e 60°C (incubação). Após este período, foi realizada a purificação das amostras. Para tanto, foram adicionados aos tubos 560µl de solução recém-preparada contendo *Buffer BL e Carrier RNA*, que foi transferida para uma coluna e, em seguida, para um tubo coletor Epitect (*Qiagen*) após centrifugação. O filtrado foi descartado e à coluna foram adicionados 500µl de *Buffer BW (wash buffer)* para nova centrifugação. Este processo foi repetido alternando-se o tampão; uma lavagem com 500µl de *Buffer BD (desulfonation buffer)* e duas com 500µl de *Buffer BW (wash buffer)*. A seguir, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e, posteriormente, foram adicionados 20µl de *Buffer EB* ao centro da membrana. Para finalizar, a coluna foi centrifugada por 1 minuto a 12000rpm para eluição do DNA purificado.

II.2.4. Técnica *High Resolution Melting* (HRM):

A amplificação por PCR e HRM foi realizada no StepOne PCR em tempo real do sistema (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante. As sequências de *primers* para os genes *RASSF1A* e *MGMT* estão listadas na Tabela 5. A PCR foi realizada em um volume de 20 uL contendo 1x Melt Doctor HRM Master Mix (*Applied Biosystems*), 200 nM de cada iniciador e 10 ng de DNA molde bissulfito-tratado. A curva padrão com porcentagens de metilação conhecidas (100, 50, 25, 10, 5 e 0%) foi incluída em cada ensaio para estimar a proporção de metilação de cada amostra, utilizando DNA genômico de CpG metilado HeLa (*New England Biolabs*) e de controle de DNA não metilado Epitect Humana como referências (Figura 1, 2). Os padrões de metilação foram realizados em duplicata, e as amostras de tecidos tumorais, tecidos adjacentes ao tumor e sangue periférico, foram realizadas em triplicatas. As condições de amplificação foram as seguintes: um ciclo de 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min, seguido por um passo de HRM 95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min, 95°C durante 15 seg, e aquisição contínua 60-95°C a 0,3%. Os dados de HRM foram analisados utilizando o Software HRM (*Applied Biosystems*). As análises foram realizadas em colaboração com Departamento de Genética do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu com a colaboração da Prof^a Dr^a Cláudia Aparecida Rainho.

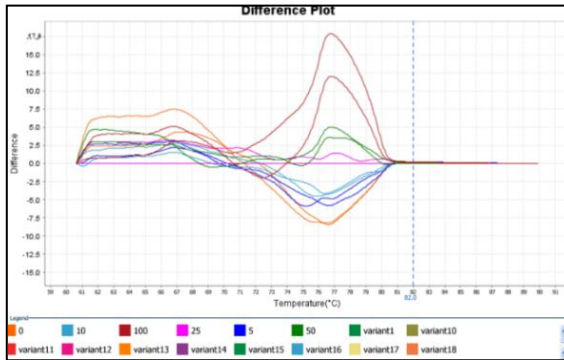


Figura 1. Curva padrão com porcentagens de metilação (100, 50, 25, 10, 5 e 0%) para o gene *RASSF1A*.

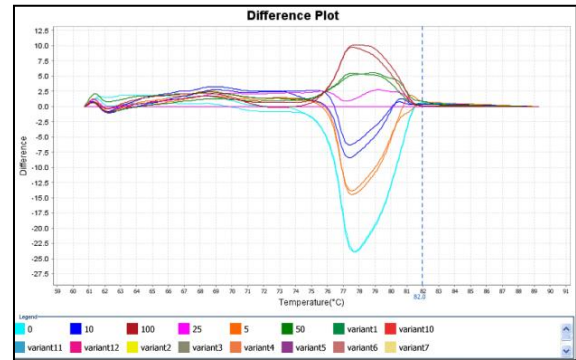


Figura 2. Curva padrão com porcentagens de metilação (100, 50, 25, 10, 5 e 0%) para o gene *MGMT*.

Tabela 5. Sequências dos primers para os genes *RASSF1A* e *MGMT*.

Genes	Primes
<i>RASSF1A</i>	5'gggttttatagttttgtatttaggtt3' e 5'aactcaataaactcaaactccccc3'
<i>MGMT</i>	5'gcggttcgggatatgttgggatagt3' e 5'cctacaaaaccactcgaaactacca3'

II.3. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *Minitab versão 14* ou *Bioestat versão 5.3*, considerando-se valores de $P \leq 0,05$ para significância estatística.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para comparar a presença de metilação nas amostras de tumores e suas respectivas margens cirúrgicas ou sangue periférico. Este teste também foi utilizado para avaliar a presença de metilação em relação à localização primária do tumor (cavidade oral e faringe *versus* tecido não tumoral ou laringe *versus* tecido não tumoral).

O teste exato de Fischer foi utilizado para avaliar a frequência de metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* em relação às características do paciente e do tumor.

A regressão logística múltipla foi utilizada para avaliar o efeito das variáveis no risco do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. O modelo incluiu gênero (referência: feminino), idade (referência: ≤ 61 anos; mediana), hábito etilista (referência: não etilista), hábito tabagista (referência: não tabagista), agressividade tumoral (referência: estadios I e II) e metilação (referência: ausência de metilação). Os resultados foram apresentados em *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95%.

RESULTADOS

III. RESULTADOS

A tabela 6 mostra as porcentagens de metilação nos genes *RASSF1A* e *MGMT* nos tecidos tumorais, tecidos adjacentes ao tumor e sangue periférico. Das 42 amostras de tecidos tumorais analisadas para o gene *RASSF1A*, 50% das amostras apresentam-se metiladas. Para o gene *MGMT*, das 37 amostras de tecidos tumorais analisadas, 17 (46%) apresentaram a metilação.

Para o gene *RASSF1A* cinco amostras (três de tecido adjacente e duas de sangue periférico) não amplificaram, totalizando 37 casos com amostras pareadas (tecido tumoral e tecido adjacente ao tumor ou sangue periférico do mesmo indivíduo). Em relação ao gene *MGMT* não amplificaram quatro amostras tumorais e três tecidos adjacentes correspondentes, além de outras duas amostras não pareadas (01 tumoral e 01 não tumoral), totalizando 36 casos com amostras pareadas.

Das 21 amostras tumorais metiladas para o gene *RASSF1A*, 16 casos possuem amostras pareadas. Em 12 pares a metilação estava presente apenas na amostra do tecido tumoral, em três casos a metilação também ocorreu no tecido adjacente ao tumor e em um caso também no sangue periférico (Tabela 7). No entanto, em três casos a metilação foi detectada somente nos tecidos não tumorais (duas amostras de tecidos adjacentes e uma de sangue periférico).

Em relação ao gene *MGMT*, das 17 amostras tumorais metiladas, 16 casos possuem amostras pareadas. Em 15 deles a metilação ocorreu somente no tecido tumoral e em um caso a metilação estava presente também no sangue periférico (Tabela 8). Foram observados dois casos discrepantes, ou seja, a metilação estava presente nos tecidos adjacentes e ausente nos tecidos tumorais.

Tabela 6. Porcentagens de metilação nos genes *RASSF1A* e *MGMT* nos tecidos tumorais, tecidos normais adjacentes e sangue periférico.

Genes	Tipos de tecidos	0%	>0%≤10%	>10%≤25%	>25%≤100%	NA*
<i>RASSF1A</i>	Tumoral	21	18	2	1	0
	Normal adjacente	14	4	1	0	3
	Sangue periférico	16	2	0	0	2
<i>MGMT</i>	Tumoral	20	17	0	0	5
	Normal adjacente	15	4	0	0	3
	Sangue periférico	17	1	0	0	2

*NA= não amplificaram

Tabela 7. Presença de metilação nas 16 amostras de tecidos tumorais que possuem amostras pareadas de tecidos adjacentes ou sangue periférico para o gene *RASSF1A*.

Código da Amostra	Tecido Tumoral	Tecido não Tumoral	
		Tecido não Tumoral Adjacente	Sangue Periférico
1	M	NM	----
2	M	NM	----
3	M	----	NM
4	M	----	NM
5	M	----	NM
6	M	----	NM
7	M	----	NM
8	M	----	NM
9	M	----	NM
10	M	----	NM
11	M	----	NM
12	M	----	NM
13	M	M	----
14	M	M	----
15	M	M	----
16	M	----	M

M = Metilado MN = Não-Metilado ---- = Amostra não analisada

Tabela 8. Presença de metilação nas 16 amostras de tecidos tumorais que possuem amostras pareadas de tecidos normais adjacentes ou sangue periférico para o gene *MGMT*.

Código da Amostra	Tecido Tumoral	Tecido não Tumoral	
		Tecido não Tumoral Adjacente	Sangue Periférico
1	M	NM	----
2	M	NM	----
3	M	NM	----
4	M	NM	----
5	M	----	NM
6	M	----	NM
7	M	----	NM
8	M	----	NM
9	M	----	NM
10	M	----	NM
11	M	----	NM
12	M	----	NM
13	M	----	NM
14	M	----	NM
15	M	----	NM
16	M	----	M

M = Metilado NM = Não-Metilado NA = Não Amplificou ---- = Amostra não analisada

A análise estatística dos 37 pares de amostras (tecido tumoral e tecido adjacente ou sangue) para gene *RASSF1A* mostrou diferença significativa quanto à presença de metilação entre os dois grupos de amostras ($P=0,027$; Gráfico 1). Para o gene *MGMT* a análise dos 36 pares de amostras também foi significativa ($P=0,002$; Gráfico 1).

A avaliação da presença de metilação entre subgrupos de tecido tumoral e tecido adjacente em 19 pares de amostras para o gene *RASSF1A* e em 18 pares de amostras para o gene *MGMT* não mostrou diferença significativa ($P=1,0$ e $P=0,38$, respectivamente). Para o subgrupo de tecido tumoral e sangue periférico o resultado estatístico foi significativo para os genes *RASSF1A* e *MGMT* ($P=0,005$ e $P=0,002$, respectivamente) em 18 pares de amostras analisados para ambos os genes (Gráficos 2 e 3).

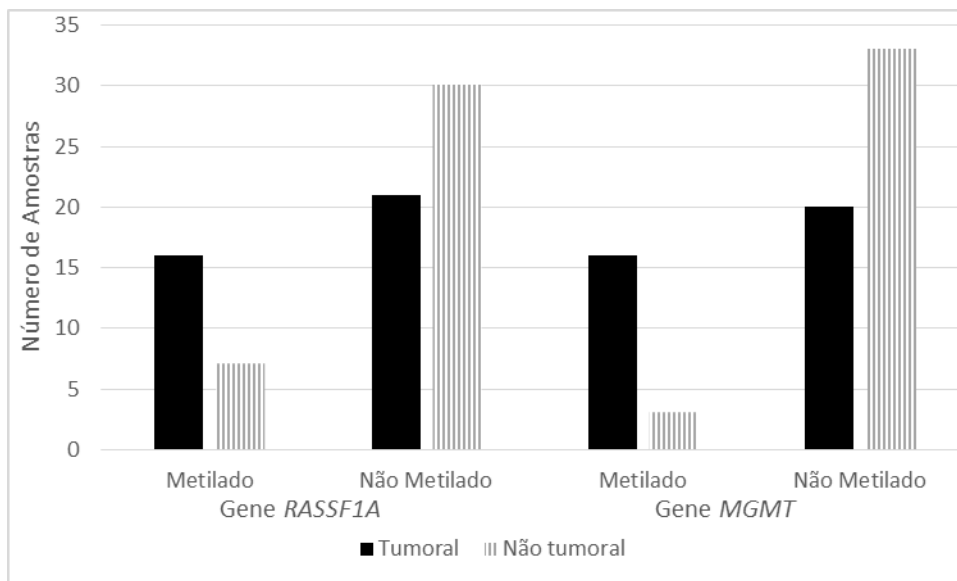


Gráfico 1. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecidos tumorais e não tumorais (tecido adjacente e sangue) para os genes *RASSF1A* ($P=0,027$) e *MGMT* ($P=0,002$), respectivamente.

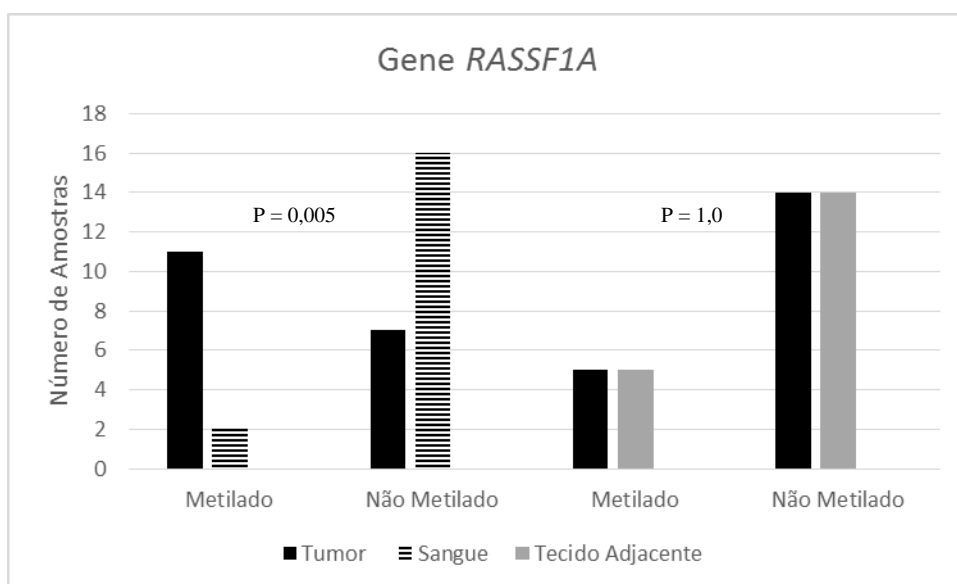


Gráfico 2. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecido tumoral, sangue e tecido adjacente analisadas para o gene *RASSF1A*.

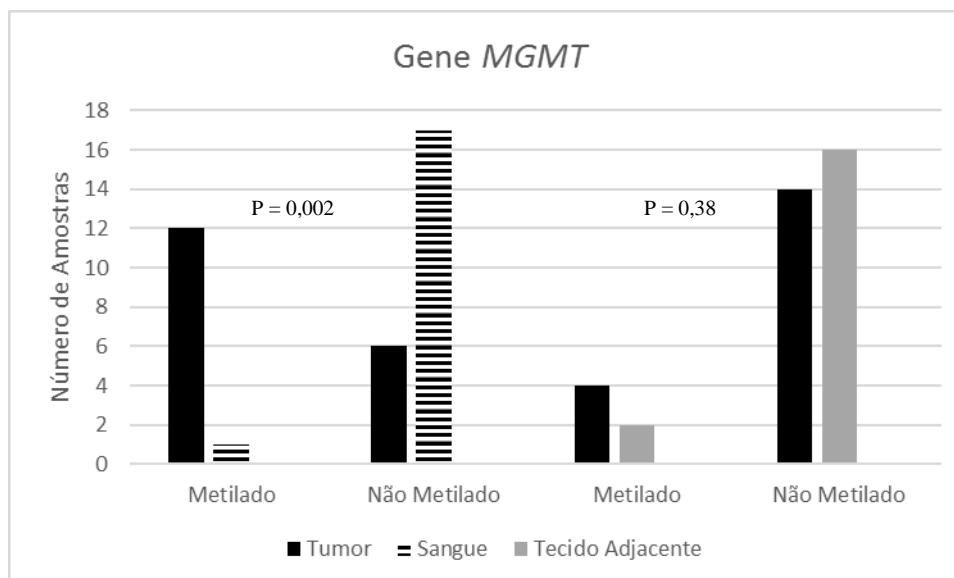


Gráfico 3. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecido tumoral, sangue e tecido adjacente analisadas para o gene *MGMT*.

A análise da presença de metilação nos tumores em relação aos tecidos não tumorais (tecidos adjacentes ou sangue periférico) nos diferentes sítios anatômicos de ocorrência primária (Gráfico 4 e 5) mostrou que, em cavidade oral (n=18) e faringe (n=8) não houve diferença estatística significativa para o gene *RASSF1A* (P=0,233) em relação às amostras não tumorais (n=26); no entanto, para gene *MGMT* o resultado estatístico foi significativo (P=0,033). Em laringe (n=11), o resultado estatístico foi significativo para o gene *RASSF1A* (P=0,04) em relação às amostras não tumorais (n=11), enquanto para o gene *MGMT* (laringe, n=10; tecido não tumoral n=10), o resultado estatístico não foi significativo (P=0,998).

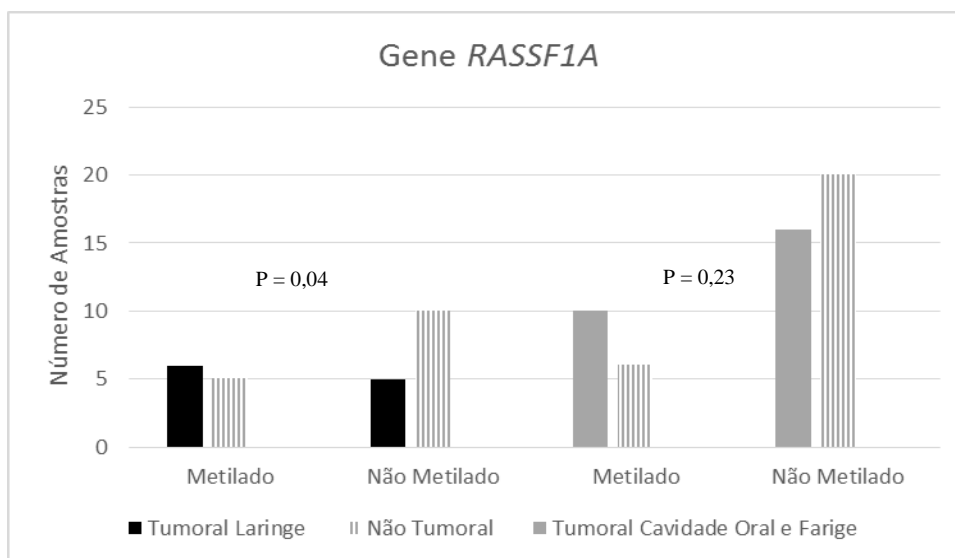


Gráfico 4. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecidos tumorais e não tumorais provenientes da cavidade oral e faringe e da laringe analisadas para o gene *RASSF1A*.

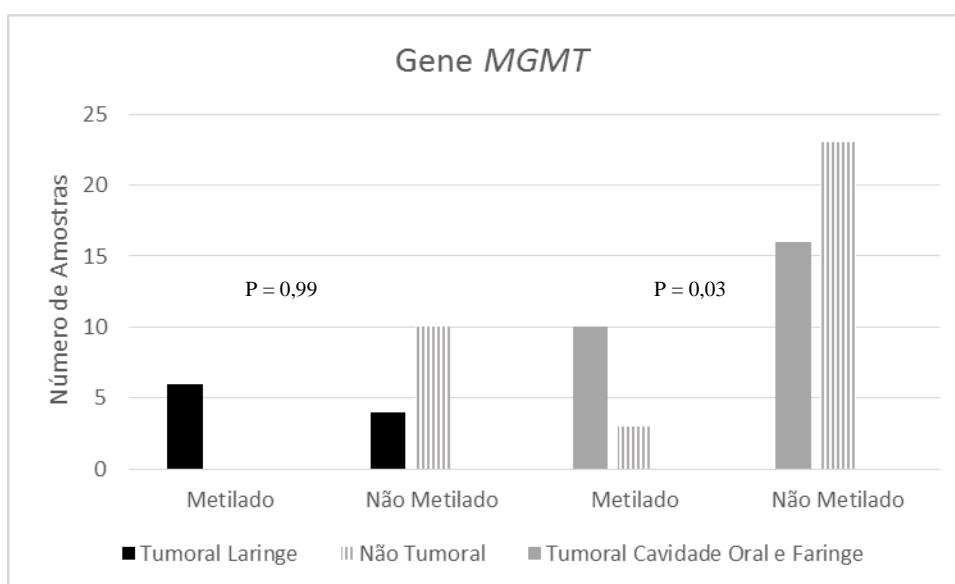


Gráfico 5. Número de amostras metiladas e não metiladas de tecidos tumorais e não tumorais provenientes da cavidade oral e faringe e da laringe analisadas para o gene *MGMT*.

A Tabela 9 apresenta a presença de metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* em relação às características do paciente e do tumor. Nenhuma associação foi observada entre metilação e gênero, idade, tabagismo e etilismo. Entretanto, a presença de metilação no gene *MGMT* bem como em ambos os genes concomitantemente, *RASSF1A* e *MGMT*, foi associada com a categoria N (P=0,045 e P=0,035, respectivamente). Para o gene *RASSF1A* não foi observada tal associação (P=0,093). A análise por meio da regressão logística múltipla da influência dos fatores epidemiológicos (gênero e idade), dos fatores de risco (tabagismo e etilismo) e parâmetros clínicos do tumor quanto à presença de metilação não mostrou associação significativa para essas variáveis (Tabela 10).

Tabela 9. Presença ou ausência de metilação nos genes *RASSF1A* e *MGMT* em relação às características do paciente e do tumor em 37 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço.

Características Clínicas	No de Pacientes	Metilação do <i>MGMT</i>	Metilação do <i>RASSF1A</i>	Metilação do <i>MGMT</i> e <i>RASSF1A</i>	Ausência de Metilação do <i>MGMT</i> e <i>RASSF1A</i>
Gênero					
Masculino	33	15	14	10	14
Feminino	04	02	02	02	02
Idade					
< 61	20	10	08	06	08
≥61	17	07	08	06	08
Tamanho					
1-2	16	09	08	06	05
3-4	21	08	08	06	11
Classificação N					
0	21	13*	12	10*	06
1-3	16	04*	04	02*	10
TNM					
Agressivo	24	09	09	06	12
Não agressivo	13	08	07	06	04
Tabagismo					
Sim	34	17	21	12	13
Não	03	00	00	00	03
Etilismo					
Sim	30	14	13	09	12
Não	07	01	02	01	05

*valor de $P < 0,05$ (teste exato de Fisher)

Tabela 10. Associação da metilação nos genes *RASSF1A* e *MGMT* com os fatores epidemiológicos (gênero e idade), hábitos tabagista e etilista e parâmetros clínicos do tumor em 37 amostras tumorais de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço.

	n (%)	<i>RASSF1A</i> Valor de P OR (95% CI)	<i>MGMT</i> Valor de P OR (95% CI)	Metilação do <i>MGMT</i> e <i>RASSF1A</i> Valor de P OR (95% CI)	Ausência de Metilação do <i>MGMT</i> e <i>RASSF1A</i> Valor de P OR (95% CI)
Gênero					
Masculino ^a	33 (89.2)	0,312 0,19 (0,01 - 4,83)	0,439 0,29(0,01-6,78)	0,863 0,76 (0,03 – 18,08)	0,965 1,07 (0,04 – 26,87)
Feminino	4 (11.1)				
Idade (mediana)					
> 61 ^a	17 (47.2)	0,535 0,61 (0,13–2,93)	0,459 0,54 (0,10 - 2,79)	0,543 1,77 (0,28 – 11,15)	0,462 1,82 (0,37 – 8,98)
≤61	20 (54.1)				
Tamanho					
1-2	16 (43.2)	0,949 1,12 (0,04 – 34,00)	0,706 1,94 (0,06 – 61,12)	0,998 6,92388E+09 (0,00 - *)	0,735 1,47 (0,16 – 13,67)
3-4 ^a	21 (56.8)				
Classificação N					
0	21 (56.8)	0,809 1,28 (0,18 – 9,32)	0,709 0,68 (0,09 – 5,08)	0,091 0,10 (0,01 – 1,44)	0,282 2,60 (0,46 – 14,83)
1-3 ^a	16 (43.2)				
TNM					
Agressivo ^a	15 (41.7)	0,734 0,51(0,10 - 24,57)	0,799 0,60(0,01 - 30,21)	0,998 0,00 (0,00 - *)	0,970 1,05 (0,09 – 12,25)
Não agressivo	22 (59.5)				
Tabagismo					
Tabagista ^a	34 (91.9)	0,480 3,09(0,13–70,86)	0,392 0,28 (0,02 - 5,20)	0,999 4,73090E+08 (0,00 - *)	0,999 0,00 (0,00 - *)
Não tabagista	3 (8.3)				
Etilismo					
Etilista ^a	30 (81.1)	0,785 0,73(0,08 – 6,75)	0,757 1,44 (0,15 - 14,09)	0,390 0,36 (0,04 – 3,69)	0,790 0,73 (0,07 – 7,66)
Não etilista	7 (19.4)				

a: Referência

DISCUSSÃO

IV. DISCUSSÃO

O *status* de metilação (metilado ou não metilado) e os padrões de expressão quando expressos em percentagem de metilação trazem novas informações para o entendimento dos mecanismos epigenéticos, pois a densidade de metilação está diretamente associada com o grau de expressividade do gene.⁽⁷⁸⁾ A técnica utilizada no presente estudo permitiu separar as amostras nas seguintes taxas de metilação: 0%, até 10%, maior que 10% até 25% e maior que 25%.

Das amostras metiladas a maioria encontra-se na faixa de até 10%, o que restringe análises de subgrupos por densidade de metilação. Assim, no presente estudo, as análises foram realizadas considerando-se a apenas a presença ou ausência de metilação conforme estudos realizados em amostras tumorais de cabeça e pescoço.^(66,79-81)

Sabe-se que os processos neoplásicos são complexos e envolvem a ativação de oncogenes e/ou silenciamento de genes supressores de tumor por meio de processos genéticos e epigenéticos.⁽⁸²⁾ Em geral, a hipometilação do DNA resulta no aumento da instabilidade genômica e ativação de protooncogenes, enquanto a hipermetilação de sítios específicos contribui com a tumorigênese por meio do silenciamento de genes supressores de tumor.⁽⁴²⁾

Diversos membros da família supressora de tumor *RASSF* são regulados por mecanismos epigenéticos específicos que podem resultar no surgimento e progressão do câncer.⁽⁸³⁾ A isoforma *RASSF1A* encontra-se metilada em vários tumores⁽⁸⁴⁻⁸⁷⁾ e também em lesões pré-neoplásicas.⁽⁸³⁾ A inativação do gene de reparo *MGMT* por meio da metilação da região promotora, também é um evento frequentemente observado em células tumorais^(53,56) e em estágios que precedem o desenvolvimento do tumor⁽⁵⁹⁻⁶⁰⁾

Assim, a investigação da metilação nesses genes torna-se valiosa para o diagnóstico e prognóstico do câncer de cabeça e pescoço, em especial na população brasileira na qual os estudos são escassos.

No presente estudo, 50% das amostras tumorais de cabeça e pescoço foram metiladas para o gene *RASSF1A* e 46% para *MGMT*. Além disso, na maioria dos pares de amostras (tecido tumoral e não tumoral) a metilação estava presente apenas no tecido tumoral e a análise estatística para os ambos os genes (*RASSF1A* e *MGMT*) mostrou diferença significativa quanto à presença de metilação entre os dois grupos de amostras, o que sugere o envolvimento desses genes no processo neoplásico por meio da metilação de suas regiões promotoras.

A hipermetilação do gene *RASSF1A* é frequente em outros tipos tumorais, como neoplasias de fígado, pulmão, próstata e mama.^(84,86,88-90) Em câncer de cabeça e pescoço a frequência de metilação deste gene varia de 7,5% a 71% entre os estudos em diferentes sítios anatômicos.⁽⁶⁵⁻⁶⁹⁾ No presente estudo, a frequência de tumores metilados para o gene *RASSF1A* (50%) está próxima àquela observada por YANG *et al.* (2011)⁽⁶⁸⁾ que foi de 62% em carcinoma de laringe. Quando consideradas apenas as 37 amostras pareadas, a frequência de metilação foi de 43,2%, que ainda é superior aos estudos de Hasegawa *et al.* (2002)⁽⁶⁵⁾, Taioli *et al.* (2009)⁽⁶⁶⁾ e KOUTSIMPELAS *et al.* (2012)⁽⁶⁹⁾, que mostram frequências de 7,5%, 12% e 13%, respectivamente, em câncer de cabeça e pescoço.

Em relação ao gene *MGMT*, a frequência de metilação para as 36 amostras pareadas foi de 44,4%, um pouco menor quando considerado o total de tumores avaliados (46%). Outros estudos relataram frequência de 23 a 56,4% de metilação em câncer espinocelular de cabeça e pescoço.⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾ Além deste tipo tumoral, Esteller *et al.*

(1999)⁽⁹¹⁾ demonstraram alta frequência de metilação no gene *MGMT* em tumores de cérebro (33%), colorretal (38%), pulmão (24%) e linfomas (25%).

No presente estudo, em três casos (Tabela 7), foi observada a presença de metilação para o gene *RASSF1A* tanto no tecido tumoral como no tecido adjacente ao tumor. É possível sugerir que pela proximidade com o tumor o tecido adjacente possa sofrer transformações carcinogênicas, e dentre estas, as transformações epigenéticas. A presença de metilação no gene *RASSF1A* em tecido adjacente ao tumor também foi relatada em câncer esofágico⁽⁸⁰⁾ e no gene *MGMT* em carcinoma espinocelular da cavidade oral^(58,60) Esses autores sugerem que a metilação pode ser útil para o prognóstico, pois este evento nas margens cirúrgicas pode representar alterações epigenéticas pré-invasivas. Um aspecto relevante é que dos três casos do presente trabalho em que foi observada metilação no tecido adjacente pareado, dois tumores foram classificados em estágio agressivo (T4N0MX, T2N1M0), o que reforça a hipótese de eventos epigenéticos pré-invasivos. Além disso, é possível sugerir que na lesão não agressiva, como no outro caso (T1N0M0) do presente estudo, a metilação no tecido adjacente possa refletir um estágio pré-invasivo ainda não detectado histologicamente.

Devido à dificuldade de obtenção de amostras de tecido adjacente ao tumor do mesmo paciente, foram incluídas no estudo amostras de sangue periférico uma vez que estas amostras se mostraram bons controles em outros estudos de metilação, devido à similaridade no padrão de metilação entre tecidos não tumorais. Estécio *et al.* (2007)⁽⁹²⁾ mostraram padrão de metilação semelhante entre leucócitos e melanócitos. Outro estudo em câncer de cólon mostra que genes de leucócitos ou de tecidos normais do cólon, utilizados como controles, apresentam o mesmo padrão de metilação⁽⁹³⁾ Além disso,

dados revelam que apenas 4% dos genes são metilados em leucócitos, e a comparação com outros tipos celulares revelou conservação desse padrão, com exceção de espermatozoides, onde esses genes não estão metilados.⁽⁹⁴⁾

No presente estudo foi observada metilação no tecido tumoral da cavidade oral e sangue periférico para os genes *RASSF1A* e *MGMT* em dois casos (Tabelas 6 e 7). Taioli *et al.* (2009)⁽⁶⁶⁾ também observaram metilação no *MGMT* em uma amostra de sangue periférico de um paciente com câncer de células escamosas na cavidade oral com estadiamento T4N0M0. Esses autores sugerem que este achado pode ser resultante da circulação de células tumorais no sangue periférico, uma vez que o câncer encontra-se em estadiamento agressivo.

O caso metilado para *RASSF1A* em ambos os tecidos (tumoral e sangue periférico) do presente estudo, apresentou estadiamento tumoral agressivo (T4N0M0) enquanto o outro, metilado para *MGMT*, foi T2N0M0, portanto, não é possível concluir que a presença de metilação no sangue periférico possa representar migração das células tumorais. Além disso, um caso mostrou metilação para o *RASSF1A* apenas no sangue periférico. Vale salientar que, segundo Marsit *et al.* (2009)⁽⁷⁹⁾, os padrões de metilação de tecidos não tumorais de indivíduos com câncer diferem daqueles de indivíduos saudáveis. Assim, a análise de amostras de tecido não tumorais, incluindo o sangue periférico, de indivíduos saudáveis, bem como a análise de amostras sanguíneas de todos os pacientes do presente estudo, poderiam fornecer dados mais precisos, entretanto, foi uma limitação do presente estudo.

Em relação à análise dos fatores epidemiológicos e de risco, o presente estudo não evidenciou associação entre metilação nos genes *RASSF1A* e *MGMT* e a idade, o gênero e os hábitos tabagista e etilista.

Há evidências na literatura que a redução nos níveis de metilação do genoma está relacionado ao envelhecimento⁽⁹⁵⁾, entretanto, embora a mediana de idade dos indivíduos do presente estudo tenha sido de 61 anos não foi observada associação desta variável com a metilação nos genes estudados.

Em relação ao sexo, os estudos epigenômicos estão voltados ao entendimento das diferenças no neurodesenvolvimento. A diferenciação sexual do cérebro por meio de eventos epigenômicos é um conceito emergente. Estudos têm relatado diferenças de metilação entre os sexos em promotores relacionados à exposição ao estradiol em ratos adultos.^(96,97) Mais recentemente, o estudo de Kurian *et al.* (2010)⁽⁹⁸⁾ demonstrou diferenças entre os sexos quanto a metilação da região promotora do receptor de estrogênio (ER) dentro da área pré-óptica do hipotálamo de rato em desenvolvimento; os machos exibiram maior frequência de metilação no promotor do ER do que as fêmeas. Além disso, esses autores observaram que a exposição precoce ao estradiol pode contribuir para as diferenças nos padrões de metilação do DNA entre os sexos e sugerem que esta exposição pode convergir o genoma a organizar diferenças sexuais duradoura no cérebro via diferenciação epigenética.

No presente estudo, o sexo masculino foi o mais representativo, com frequência de 88,10%, o que está de acordo com os estudos em câncer de cabeça e pescoço que mostram que os homens são mais acometidos por este tipo tumoral⁽⁷⁾, entretanto a presença de metilação nos genes estudados não foi associada ao gênero do indivíduo. Há necessidade de trabalhos futuros para definir o estabelecimento e as consequências da diferenciação epigenômica entre os sexos, em especial em outros genes não relacionados ao neurodesenvolvimento.

O estilo de vida, como hábitos etilista e tabagista, parece influenciar as mudanças epigenéticas que contribuem com o processo de tumorigênese. O estudo de Marsit *et al.* (2009)⁽⁷⁹⁾, em câncer de cabeça e pescoço, que avaliou o perfil de metilação de 1.413 regiões CpG em 773 genes autossômicos, por meio de metodologia de *array*, demonstrou uma associação significativa entre o perfil de metilação e a exposição ao tabaco e álcool. Além disso, esses autores observaram que os indivíduos com maior intensidade de exposição ao tabaco e ao álcool foram representados por indivíduos com idade mais avançada. Assim, sugerem que os padrões de metilação exibidos por este grupo de indivíduos podem ter sido influenciados por estas exposições e que estes indivíduos são menos susceptíveis à doença, uma vez que um período maior de exposição seria necessário para desenvolvimento da doença.

Um outro estudo, em câncer colorretal com os genes *RASSF1A* e *MGMT*, utilizando a técnica de MSP (*Methylation Specific Polymerase Chain Reaction*), mostrou associação de ingestão de álcool e exposição ao tabaco com a presença de metilação no gene *MGMT*.⁽⁹⁹⁾

No presente estudo a presença de metilação com a exposição de tabaco ou ingestão de bebida alcoólica não apresentou associação estatisticamente significativa, mas vale ressaltar que a percentagem de indivíduos fumantes foi maior que 90% e de etilistas foi de aproximadamente 76%. De fato, existe uma forte evidência de que estes fatores (tabaco e álcool) contribuem para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.^(14,100) No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer se estas exposições estão diretamente relacionadas às modificações dos padrões epigenéticos.

Em relação à análise dos parâmetros clínicos, no presente estudo a análise univariada mostrou que a ausência de linfonodos comprometidos foi associada com a

metilação dos genes *MGMT* e *RASSF1A*. Considerando o papel dos genes estudados no processo carcinogênico, era esperado que o silenciamento dos mesmos, por meio da metilação, resultaria na progressão da lesão e, conseqüentemente no aumento do número de linfonodos, o que estaria de acordo com o estudo de Pierini *et al.* (2013)⁽¹⁰¹⁾ em câncer de laringe que observou associação entre a presença de metilação nos genes *MGMT*, *CDKN2A*, *MLH1*, *DAPK*, com a presença de linfonodos comprometidos.

Nos estudos de Fendri *et al.* (2009)⁽¹⁰²⁾ e Mao *et al.* (2011)⁽⁸⁰⁾ em câncer de nasofaringe também foi observada uma associação entre a presença de hipermetilação do gene *RASSF1A* e envolvimento de nódulos linfáticos regionais. Além disso, esses autores mostraram que a metilação deste gene foi associação à diferenciação histológica e ao estadiamento do tumor.

Vale salientar que no presente estudo a associação entre metilação e ausência de linfonodos não foi confirmada por meio da regressão logística múltipla e que nesta análise não se evidencia a influência de qualquer variável avaliada na metilação das regiões promotoras dos genes *MGMT* e *RASSF1A* das amostras de câncer de cabeça e pescoço, o que está de acordo com o estudo de Taioli *et al.* (2009) realizado em 88 amostras de carcinoma de cavidade oral e de faringe.

A análise dos padrões de metilação nos diferentes sítios anatômicos de ocorrência primária, no presente estudo, mostrou metilação do gene *MGMT* em tumores da cavidade oral e faringe e metilação do gene *RASSF1A* na laringe. TAIOLI *et al.* (2009)⁽⁶⁶⁾ também demonstram metilação do gene *MGMT* no câncer oral e de faringe e sugerem este evento epigenético como um possível biomarcador prognóstico para este tipo tumoral, uma vez que associam a metilação desse gene com a sobrevida e

recorrência do tumor. Nosso achado em câncer de laringe também corrobora outros estudos que demonstram hipermetilação do gene *RASSF1A* neste tipo tumoral.^(68,103)

As alterações epigenéticas mostram-se importantes para o entendimento do processo carcinogênico e, no futuro, poderão contribuir para o diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores^(79,81) Deste modo, torna-se evidente a necessidade de estudos adicionais para a ampliação do conhecimento a respeito dos padrões de metilação no câncer de cabeça e pescoço.

CONCLUSÃO

V. CONCLUSÃO

1. A presença de metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* apenas no tecido tumoral da maioria dos pares de amostras (tecido tumoral e não tumoral) sugere o envolvimento desses genes no processo neoplásico de cabeça e pescoço por meio da inativação epigenética, em especial do gene *MGMT* em tumores da cavidade oral e faringe e do gene *RASSF1A* na laringe.
2. A presença de metilação na região promotora do gene *RASSF1A* tanto no tecido tumoral como no tecido adjacente a tumores com estadiamento agressivo sugere que este evento nas margens cirúrgicas possa representar alterações epigenéticas pré-invasivas.
3. A presença de metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* no tecido tumoral da cavidade oral e no sangue periférico, observada em dois casos, não permite concluir que este achado possa representar migração das células tumorais no sangue periférico, uma vez que um caso encontra-se em estadiamento agressivo e o outro não.
4. Não há associação entre metilação nas regiões promotoras dos genes *RASSF1A* e *MGMT* e a idade, o gênero, os hábitos tabagista e etilista e os parâmetros clínicos do tumor na casuística estudada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on a human papillomavirus. *J Den Res.* 2007;86(2):104-14.
2. Alvarenga LM, Ruiz MT, Bertelli ECP, Ruback MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008;74(1):68-73.
3. Dobrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer and Metastasis Rev.* 2005;24:9-17.
4. Curado MP e Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology.* 2009;21:194–200.
5. Mehanna H, Paleri V, West CML, Nutting C. Head and neck cancer – Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *Clinical Otolaryngology.* 2011;36:65-68.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
8. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA [www.inca.gov.br]. Rio Janeiro: INCA [Acesso em 2015 Fev 02]. *Laringe.* Disponível em:
[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/laringe.](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/laringe)

9. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 – GLOBOCAN [globocan.iarc.fr]. Lyon: GLOBOCAN [Acesso em 2015 Abril 13]. Faringe. Disponível em <http://globocan.iarc.fr/ia/World/atlas.html>.
10. Olivieri EHR, da Silva SD, Mendonça FF, Urata YN, Vidal DO, Faria MAM, *et al.* CYP1A2*1C, CYP2E1*5B, and GSTM1 polymorphisms are predictors of risk and poor outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology*. 2009;45(9):73-9.
11. Walker DM, Boey G, McDonald LA. The pathology of oral cancer. *Pathology*. 2003;35(5):376-83.
12. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2008;83(4):489-501.
13. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. [www.inca.gov.br]. Rio Janeiro: INCA [Acesso em 2015 Fev 02]. Boca. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca>.
14. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, *et al.* Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:777–89.
15. Zygogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Kelekis N, Kouloulías V. Oral squamous cell cancer: early deletion and the role of alcohol and smoking. *Head & Neck Oncology*. 2011;3:2.

16. Licitra L, Rossini C, Bossi O, Locati LD. Advances in the changing patterns of aetiology of head and neck cancers. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;14:95–99.
17. Nagler R, Dayan D. The Dual Role of Saliva in Oral Carcinogenesis. *Oncology.* 2006;71:10–17.
18. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006;7:149–56.
19. Warnakulasuriya S, Parkkila S, Nagao T, Preedy VR, Pasanen M, Koivisto H. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:157–165.
20. Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol.* 2009;55:165-74.
21. Kane, MA. The role of folates in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Detect Prev.* 2006;29:46-53.
22. Lo AK, Lo KW, Tsao SW, Wong HL, Hui JW, To KF *et al.* Epstein-Barr virus infection alters cellular signal cascades in human nasopharyngeal epithelial cells. *Neoplasia.* 2006;3:173-80.
23. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *Dent Res.* 2009;88:300-6.
24. Fenech M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). *Food Chem Toxicol.* 2002;40:1113:7.
25. Linhart HG, Troen A, Bell GW, Cantu E, Chao W, Moran E, *et al.* Folate Deficiency induces genomic uracil misincorporation and hypomethylation but does not increase DNA point mutations. *Gastroenterology.* 2009;136(1):227-35.e3.

26. Bailey LB. Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C-T polymorphism affect cancer risk: intake recommendation. *Am SocNutrl Sci.* 2003;133(11 Suppl 1):3748S-53S.
27. Charasson V, Hillaire-Buys D, Solassol I, Laurand-Quancard A, Pinguet F, Morvan VL, *et al.* Involvement of gene polymorphisms of the folate pathway enzymes in gene expression and anticancer drug sensitivity using the NCI-60 panel as a model. *Eur J Cancer.* 2009;45(13):2391-401.
28. Baluz K, do Carmo MGT, Rosas G. O papel do ácido fólico na prevenção e na terapêutica oncológica: revisão. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2002;48(4):597-607.
29. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab.* 2004. v. 40: n°5; p.311-20.
30. Xu WH, Shrubsole MJ, Xiang YB, Cai Q, Zhao GM, Ruan ZX, *et al.* Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(2):2817.
31. Lim U, Wang SS, Hartge P, Cozen W, Kelemen LE, Chanock S, *et al.* Gene-nutrient interactions among determinants of folate and one-carbon metabolism on the risk of non-hodgkin lymphoma: NCI-SEER case-control Study. *Blood.* 2007;109(7):3050-3059.
32. Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen LH, *et al.* Folatos y vitamina B12 en la salud Humana. *Rev Med Chile.* 2012;140:464-1475.
33. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16(1):6-21.

34. Zhang H, Fu WL, Huang Q. Mapping of the methylation pattern of the hMSH2 promoter in colon cancer, using bisulfite genomic sequencing. *J Carcinog.* 2006;5: 22.
35. Zilberman D, Henikoff S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development.* 2007;134(22):3959-65.
36. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat. Rev. Genet.* 2000;1(1):11-9.
37. Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR. Epigenetic control. *J. CellPhysiol.* 2009;219(2): 243-50.
38. Ramsahoye BH, Binizskiewicz D, Lyko F, Clark V, Bird A, Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cell and maybe mediated by DNA methyltransferase 3^a. *Proc. Natl. AcadSci. USA.* 2000;97(10):5237-42.
39. Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462(7271):315-22.
40. Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci.* 2007;100(1):7-23.
41. Morgan HD, Dean W, Coker HA, Reik W, Petersen-Mahrt SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *J BiolChem* 2004; 279(50):52353–60.
42. Hawes SE, Stern JE, Feng Q, Wiens LW, Rasey JS, Lu H, *et al.* DNA hypermethylation of tumors from nonsmall cell lung cancer (NSCLC) patients is associated with gender and histologic type. *Lung Cancer.* 2010;69(2):172-9.

43. Walker MS, Becker FF. DNA methylase activity of normal liver, regenerating liver, and a transplantable hepatocellular carcinoma. *Cancer BiochemBiophys*. 1981;5:169–173.
44. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, *et al*. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*. 1983;11:6883–6894.
45. Lu LJ, Randerath E, Randerath K. DNA hypomethylation in Morris hepatomas. *Cancer Lett*. 1983;19:231-239.
46. Beier V, Mund C, Hoheisel JD. Monitoring methylation changes in cancer. *AdvBiochemEngBiotechnol*. 2007;104:1-11.
47. Merlo A, Herman JG, Mo L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, *et al*. CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat. Med*. 1995;1:686–692.
48. Herman J G, Latif F, Weng W, Lerman MI, Zbar B, Liu S, *et al*. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994;91:9700–9704.
49. Herman JG, Umar A, Polyak k, Graff JR, Ahuja N, Issa PJ, *et al*. Incidence of functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998;95:6870–6875.

50. Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, *et al.* Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer*. 2001;91(12):2294-301.
51. Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci*. 2006;89(2):431-7. Epub 2005 Oct 26.
52. Nosho K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Schernhammer ES, *et al.* Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3698.
53. Schmezer P, Plass C. Epigenetic aspects in carcinomas of the head and neck. *HNO*. 2008 Jun;56(6):594-602.
54. Weber A, Dietz A, Tischoff I, Tannapfel A. Role of epigenetics in the carcinogenesis of head and neck carcinomas - possible new targeted therapy? *Laryngorhinootologie*. 2007 Jan; 86(1):9-13.
55. Sánchez-Céspedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, *et al.* Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res*. 2000;60:892-895.
56. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, Jen J, Sidransky D. 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;61:939-942.
57. Viet CT, Jordan RC and Schmidt BL: DNA promoter hypermethylation in saliva for the early diagnosis of oral cancer. *J Calif Dent Assoc*. 2007;35:844-849.

58. Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, *et al*: Aberrant promoter hypermethylation of p16 and *MGMT* genes in oral squamous cell carcinoma and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006;132:735-743.
59. Roth M, Abnet CC, Hu N, Wang QH, Wei WQ, Green L, *et al*: p16, *MGMT*, RAR β 2, CLDN3 and MT1G gene methylation in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Oncol Rep*. 2007;15:1591-1597.
60. Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, Ralhan R. *MGMT* expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol*. 2007;43:515–522.
61. Lopez M, Aguirre JM, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, *et al*: Gene promoter hyper- methylation in oral rinses of leukoplakia patients-a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur J Cancer*. 2003;39:2306-2309.
62. Pegg AE, Byers TL. Repair of DNA containing O6-alkylguanine. *Faseb J* 1992;6:2302–2310.
63. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. *MGMT*: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6:1079–1099.
64. Aquilina G, Biondo R, Dogliotti E, Meuth M, Bignami M. Expression of the endogenous O6- methylguanine DNA-methyltransferase protects Chinese hamster ovary cells from spontaneous G:C to A:T transitions. *Cancer Res*. 1992;52:6471–6475.
65. Hasegawa M, Heather HN, Peters E, Ringstrom E, Posner M and Kelsey KT: Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*. 2002;21: 4231-4236.

66. Taioli E, Ragin C, Wang X, Chen J, Langevin SM, Brown AR, *et al.* Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative *MGMT* promoter methylation. *BMC Cancer*. 2009;9:354.
67. Wang T, Liu H, Chen Y, Liu W, Yu J, Wu G. Methylation associated inactivation of *RASSF1A* and its synergistic effect with activated K-Ras in nasopharyngeal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28:160.
68. Yang J, Ji WY, Qu YR, He LX, Zhao XD, Jin MZ. [DNA methylation and histone modification relate to *RASSF1A* gene deletion in laryngeal carcinoma tissues]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2011;46(4):308-12.
69. Koutsimpelas D, Pongsapich W, Heinrich U, Mann S, Mann WJ and Brieger J. Promoter methylation of *MGMT*, *MLH1* and *RASSF1A* tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Pharmacological genome demethylation reduces proliferation of head and neck squamous carcinoma cells. *Oncology Reports*. 2012;27:1135-1141.
70. Lee ES, Issa JP, Roberts DB, Williams MD, Weber RS, Kies MS, *et al.*: Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2664-2672.
71. Thaler S, Hähnel PS, Schad A, Dammann R, Schuler M: *RASSF1A* mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt. *Cancer Res*. 2009;69(5):1748-57.

72. Shen WJ, Dai DQ, Teng Y, Liu HB: 5-Aza-CdR regulates the expression of *RASSF1A* gene in human gastric cancer cell line and inhibits the growth of cells. *Zhonghua Wei Chang WaiKeZaZhi*. 2009;12(1):57-60.
73. Xue WJ, Li C, Zhou XJ, Guan HG, Qin L, Li P, Wang ZW, Qian HX: *RASSF1A* expression inhibits the growth of hepatocellular carcinoma from Qidong County. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23(9):1448-58.
74. Vos MD, Dallol A, Eckfeld K, Allen NPC, Donniger H, Hesson L, *et al.*: The *RASSF1A* Tumor Suppressor Activates Bax via MOAP-1. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:4557-4563.
75. Dammann R, Li C, Yoon J-H, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP: Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature genetics*. 2000;25:315-319.
76. Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiroopoulos A: Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol*. 2002;21:237-41.
77. Weyden L, Adams DJ: The Ras-association domain family (*RASSF*) members and their role in human tumorigenesis. *BiochimBiophysActa*. 2007;1776(1):58-85.
78. Foster SA, Wong DJ, Barrett M T, Galloway DA. Inactivation of p16 in Human Mammary Epithelial Cells by CpG Island Methylation. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):1793-801.
79. Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, Karagas MR, Wrensch MR, Yeh RF, *et al.* Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2009;30(3):416-422.

80. Mao W, Li P, Zheng Q, Wang C, Ge M, Hu F, *et al.* Hypermethylation-modulated Downregulation of RASSF1A Expression Is Associated with the Progression of Esophageal Cancer. *Archives of Medical Research*. 2011;(42)182-188.
81. Carvalho A L, Henrique R, Jeronimo C, Nayak CS, Reddy AN, Hoque MO, *et al.* Detection of Promoter Hypermethylation in Salivary Rinses as a Biomarker for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Surveillance. *Clin Cancer Res*. 2011 July 15;17(14):4782–4789.
82. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007;128(4):683-92.
83. Volodkoa N, Gordona M, Sallab M, Ghazalehd HA, Baksh S. *RASSF* tumor suppressor gene family: Biological functions and regulation. *Febsletters*. 2014;v.588, Issue 16, 2671–2684.
84. Klajic J, Fleischer T, Dejeux E, Edvardsen H, Warnberg F, Bukholm I, *et al.* Quantitative DNA methylation analyses reveal stage dependent DNA methylation and association to clinico-pathological factors in breast tumors. *BMC Cancer*. 2013;p.456.
85. Korah R, Healy JM, Kunstman JW, Fonseca AL, Ameri AH, Prasad ML, *et al.* Epigenetic silencing of *RASSF1A* deregulates cytoskeleton and promotes malignant behavior of adrenocortical carcinoma. *Molecular Cancer*. 2013;12:87.
86. Amin KS, Banerjee PP. The cellular functions of *RASSF1A* and its inactivation in prostate cancer. *Journal of Carcinogenesis*. 2012;11:3.
87. Yi M, Yang J, Chen X, Li J, Li X, Wang L, *et al.* *RASSF1A* Suppresses Melanoma Development by Modulating Apoptosis and Cell Cycle Progression. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(9):2360-2369.

88. Wingo PA, Ries LAG, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ and Edwards BK, Annual report to the nation on the status of cancer, 1973– 1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking, J Natl Cancer Inst. 1999;(91):675–690.
89. Zhong S, Yeo W, Tang MW, Wong N, Lai PBS and Johnson PJ, Intensive hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinomas, Clin Cancer Res. 2003;(9):3376–3382.
90. Hesson, L.B., Cooper, W. N., Latif, F. The role of *RASSF1A* methylation in cancer. Disease Markers. 2007;(23):73–87.
91. 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 1999;59:793–797.
92. Estécio, MRH, Yan, PS, Ibrahim AE, Tellez CS, Shen L, Huang TH, *et al.* High-throughput methylation profiling by MCA coupled to CpG island microarray. Genome Research. 2007;17:1529–1536.
93. Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M, Lam WL, Schübeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. Nat Genet. 2005 Aug;37(8):853-62.
94. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. PLoS Genet. 2007 Oct;3(10):2023-36.

95. Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P. Old age as a privilege of the “selfish ones”. 2010;Volume 1, Number 2;139-146.
96. Singh K, Prasad S. Age- and sex-related analysis of methylation of 5-upstream sequences of Fmr-1 gene in mouse brain and modulation by sex steroid hormones. *Biogerontology*. 2008;9:455–465
97. Westberry JM, Prewitt AK, Wilson ME. Epigenetic regulation of the estrogen receptor promoter in the cerebral cortex following ischemia in male and female rats. *Neuroscience*.2008;152:982–989
98. Kurian JR, Olesen KM, Auger AP. Sex differences in epigenetic regulation of the estrogenreceptor-alpha promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology*. 2010;151(5):2297–2305.
99. Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, Kumar RS, Kumar K, Pande P, *et al*. Kras Gene Mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT Gene Promoter Hypermethylation: Indicators of Tumor Staging and Metastasis in Adenocarcinomatous Sporadic Colorectal Cancer in Indian Population. Ashktorab H, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60142.
100. Blot WJ , McLaughlin JK , Winn DM , Austin DF , Greenberg RS , Preston-Martin S, et al . Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48:3282 – 7 .
101. Pierini S, Jordanov SH, Mitkova AV, Chalakov IJ, Melnicharov MB, Kuncho V, *et al*. Promoter hypermethylation of CDKN2A, *MGMT*, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head Neck*. 2014 Aug;36(8):1103-8.

102. Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, *et al.* Inactivation of *RASSF1A*, *RARB* and *DAP-kinase* by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2009;8:444–451.
103. Paluszczak J, Misiak P, Wierzbicka M , Wozniak A, Baer-Dubowska W. Frequent hypermethylation of *DAPK*, *RARB*, *MGMT*, *RASSF1A* and *FHIT* in laryngeal squamous cell carcinomas and adjacent normal mucosa. *Oral Oncol.* 2011 Feb;47(2):104-7.



FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO

Autarquia Estadual - Lei n.º 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal n.º 74.179 de 14/06/74)

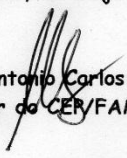
Parecer n.º 210/2009

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Protocolo nº 3598/2009 sob a responsabilidade de Patrícia Matos Biselli Chicote, com o título "Mecanismos de splicing, padrão de metilação do DNA e instabilidade genômica em câncer de cabeça e pescoço" está de acordo com a resolução CNS 196/96 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 29 de junho de 2009.


Prof. Dr. Antonio Carlos Pires
Coordenador do CER/FAMERP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Conselho Nacional de Saúde, resolução 196/96)

Título da Pesquisa: **Mecanismos de *splicing*, padrão de metilação do DNA e instabilidade genômica em câncer de cabeça e pescoço.**

Pesquisadora Responsável: _____

Eu.....RG.....
nascido(a) em/...../..... e domiciliado(a) à
....., município de
.....usuário (a) (ou responsável legal pelo
usuário).....,
declaro que consinto em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa
“**Mecanismos de *splicing*, padrão de metilação do DNA e instabilidade genômica
em câncer de cabeça e pescoço**” e que também fui satisfatoriamente esclarecido(a)
que:

A) O objetivo do estudo é investigar o material genético de tumores de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Para tanto, será utilizado um fragmento do tecido retirado durante a sua cirurgia e que se encontra estocado no Serviço de Patologia do Hospital de Base; B) o material será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, minha privacidade e identidade serão preservadas; C) todas as informações obtidas por meio da história clínica e os resultados serão mantidos em sigilo e que, estes só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas; D) se eu concordar em participar desta pesquisa não terei quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se eu não concordar ou decidir retirar meu consentimento em qualquer momento, minha decisão não influenciará, de modo algum, o meu tratamento; E) esse estudo é importante porque pode colaborar para o conhecimento científico dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do tumor; F) Os resultados serão divulgados após a conclusão do estudo em forma de artigos científicos ou trabalhos apresentados em congressos.

Declaro que, após ter convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão. Assim, consinto em participar do projeto de pesquisa em questão.

RG do prontuário médico:

Data:...../...../..... Assinatura:.....

Declaração de responsabilidade: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para esclarecimento de qualquer dúvida sobre o estudo pelo endereço abaixo indicado.

Pesquisador responsável:

Data:...../...../..... Assinatura:.....

