



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Louyse Vizotto, RA 136570, esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado *“EFEITO DO CO-CULTIVO DE CÉLULAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR SOBRE O PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA E DO GENE TP73 EM QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS”* nos anos de 2013/2014.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS101 - Trabalho de Conclusão de Curso.

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Piracicaba, 29 de setembro de 2016.

Ana Paula de Souza

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ana Paula de Souza".

(nome e assinatura do orientador)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**EFEITO DO CO-CULTIVO DE CÉLULAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR
SOBRE O PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA E DO GENE *TP73* EM
QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS**

Autora: Louyse Vizotto Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Souza

Instituição: Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP

Piracicaba - SP

2016

Louyse Vizotto Carvalho Moura Leal

**EFEITO DO CO-CULTIVO DE CÉLULAS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR
SOBRE O PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA E DO GENE *TP73* EM
QUERATINÓCITOS HUMANOS NORMAIS**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo

Piracicaba - SP

2016

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

L473e Leal, Louyse Vizotto Carvalho Moura, 1992-
Efeito do co-cultivo de células de carcinoma espinocelular sobre o perfil de metilação global do DNA e do gene *TP73* em queratinócitos humanos normais / Louyse Vizotto Carvalho Moura Leal. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Ana Paula de Souza Pardo.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Epigenética. 2. Queratinócitos. 3. Neoplasias bucais. I. Pardo, Ana Paula de Souza, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Epigenetics

Keratinocytes

Mouth neoplasms

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 03-10-2016

Agradecimentos

Agradeço a Deus, a quem dedico minha vida, ao meu amado marido, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado, aos meus pais, e todos os amigos que de certa forma estiveram envolvidos para que este trabalho fosse possível.

RESUMO

O conceito de campo de cancerização sugere que áreas adjacentes ao tumor primário tem maior potencial para o desenvolvimento de neoplasias. Com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular, o conceito de campo de cancerização passou a incorporar além das alterações morfológicas, já bem estabelecidas, alterações moleculares.

Contudo, um mecanismo molecular específico envolvido no processo de carcinogênese do carcinoma espinocelular ainda não foi completamente descrito. Com base em estudos que comprovaram alterações epigenéticas durante o processo carcinogênico responsável pela transição do epitélio de mucosa normal para epitélio tumoral, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito dos fatores químicos produzidos por células tumorais sobre o perfil epigenético de queratinócitos humanos normais em ensaio *in vitro* de co-cultura celular. As análises epigenéticas mostraram haver significantes alterações epigenéticas nas células normais após o período de co-cultivo com as células tumorais.

Os resultados obtidos pelo método COBRA e pelo ensaio de citometria de fluxo revelaram que a exposição aos mediadores químicos produzidos por células tumorais promoveu hipometilação global do DNA, hipometilação em sequências LINE-1 e hipermetilação na região promotora do gene supressor de tumor *TP73* nos queratinócitos normais. Desta forma, nossos resultados nos levam a acreditar que fatores químicos produzidos pelas células tumorais, liberados nos fluídos ou tecidos adjacentes ao tumor possam contribuir para que ocorram alterações moleculares ocorram nas células adjacentes aos tumores e, provavelmente, este mecanismo esteja relacionado com o aparecimento de tumores em regiões vizinhas, o fenômeno denominado “campo de cancerização”.

PALAVRAS-CHAVE: Epigenética, Carcinoma espinocelular, queratinócitos, HaCaT, Supressor de tumor TP73, metilação global.

ABSTRACT

The field cancerization concept suggests that adjacent areas to the primary tumor has the greatest potential for developing neoplasias. With the development of new techniques of molecular biology, field cancerization concept passed to incorporate addition to morphological changes, already well established, molecular changes.

However , a specific molecular mechanism involved in the carcinogenesis of squamous cell carcinoma has not been fully described . Based on studies that have proven epigenetic changes during the carcinogenic process responsible for the transition from normal mucosa epithelium to tumor epithelium , the objective of this study was to investigate the effect exerted by chemical factors produced by tumor cells in epigenetic changes. Epigenetic analyzes showed important epigenetic changes . The results obtained by COBRA and flow cytometry methodology revealed that exposure to chemical mediators tumor leads to hypomethylation event of LINE- 1 sequences, DNA global hypomethylation and hypermethylation of the promoter region of TP73 gene.

Thus , our results lead us to believe that chemical factors produced by tumor cells contribute to the molecular changes observed in adjacent cells to tumors and it is probably related to the molecular mechanisms responsible for the appearance of tumors in other regions, a phenomenon called " field cancerization " .

KEYWORDS: Epigenetics, squamous cell carcinoma, keratinocytes, HaCaT, tumor suppressor TP73, global methylation.

SUMÁRIO:

1. Introdução.....	07
2. Revisão de literatura.....	08
2.1. Câncer e metilação.....	08
2.2. Câncer de cabeça e pescoço.....	11
2.3. Campo de cancerização.....	12
2.4. Família do gene TP53.....	13
3. Proposição.....	15
4. Materiais e métodos.....	16
5. Resultados.....	23
6. Discussão.....	36
7. Conclusão.....	41
8. Referências.....	42

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos realizados por diferentes órgãos de saúde mostram o crescente aumento do número de casos de câncer anualmente, sendo considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (Guerra et al., 2005). Por esta razão, o câncer é uma das doenças mais estudadas na atualidade.

Pesquisas realizadas na área de biologia celular e molecular comprovam que componentes epigenéticos estão envolvidos nas diferentes fases do desenvolvimento tumoral; estas alterações reversíveis que ocorrem na cromatina (DNA + proteínas histonas) podem modificar a expressão gênica. Dentre os diferentes eventos epigenéticos, as modificações (acetilação e metilação) de histonas e a metilação do DNA são cruciais para estabelecimento e controle da correta programação da expressão genica. Desta forma, falhas nestes processos podem promover importantes alterações na expressão gênica (Rothhammer e Bosserhoff, 2007).

O câncer bucal representa 3% das neoplasias que afetam a população brasileira. O carcinoma espinocelular (CEC) é o principal câncer de cabeça e pescoço das vias superiores e representa 90% dos tumores malignos que acometem a cavidade oral.

Apesar das tecnologias e recursos que a medicina dispõem atualmente, o prognóstico e índice de sobrevida de pacientes diagnosticados com CEC não são favoráveis. Isto se deve muito ao fato da frequente presença de lesões múltiplas e não focais que surgem próximo ao tumor primário e geram novos “campos de cancerização”.

Sucessivas alterações e erros moleculares formam a base para o desenvolvimento de tumores. Estudos apontam cada vez mais a participação das alterações epigenéticas em fenômenos associados ao processo carcinogênico (Venturi et al., 2004; Worsham et al., 2011). Assim, este estudo teve como objetivo principal a avaliação da exposição de células normais aos fatores químicos produzidos e liberados por células de carcinoma espinocelular oral humano sobre o perfil da metilação global do DNA e da região do promotor do gene *TP73*.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 Câncer e Metilação

Atualmente, a definição científica para câncer (neoplasia) especificamente para tumores malignos, é o crescimento descontrolado de células transformadas que matam pela invasão destrutiva dos tecidos, seja por expansão direta ou por disseminação pela corrente sanguínea para outros órgãos (metástases) (Bordini et al., 2007; Little et al., 2008). O câncer se apresenta como uma das principais causas de morte no mundo, sendo a segunda causa de morte por doença no Brasil. (Almeida et al., 2005). Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) projetam aproximadamente 600.000 novos casos de câncer em todo o País no bienio 2016-2017, sendo mais da metade destes novos casos somente para a região sudeste (**Fig. 01**) (INCA, 2016). Hoje existem aproximadamente 200 tipos caracterizados, os quais correspondem aos diferentes sistemas do corpo. Uma importante característica que os clínicos utilizam para classificação é a capacidade de invadir tecidos e/ou órgãos vizinhos.

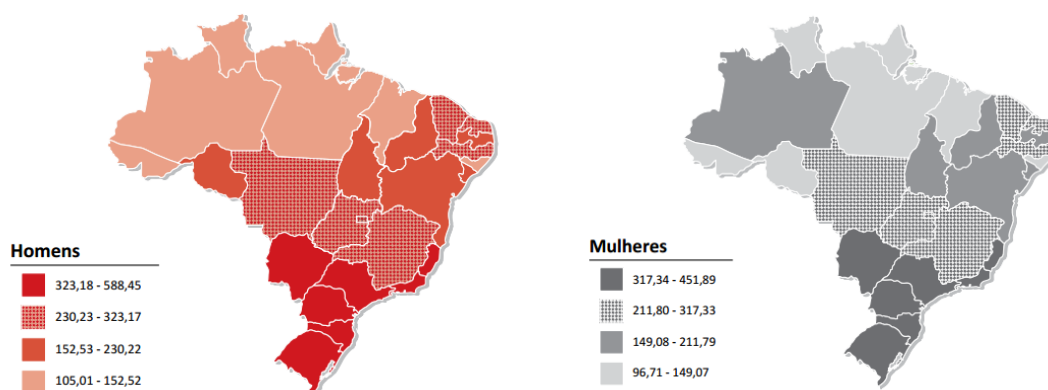


Fig.01: Estimativa de Câncer no Brasil

Adaptada/Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasi/Neoplasias malignas, 2016.

Com base nas estimativas do Ministério da Saúde, aproximadamente 16.000 casos acometeriam a cavidade bucal, colocando o câncer bucal como o décimo segundo mais prevalente no gênero feminino, com 4.010 casos e o quinto no gênero masculino, com 11.280 casos (**Fig. 02**). Vale ressaltar que metade dos portadores de câncer bucal é fumante e consumidores de bebidas alcoólicas, portanto o INCA estabeleceu o vício do álcool e cigarro como fatores principais para o desenvolvimento desse tipo de tumor (INCA, 2013).

Localização Primária	Casos Novos	%		Localização Primária	Casos Novos	%
Próstata	68.800	22,8%		Mama feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%		Côlon e Reto	17.530	6,4%
Côlon e Reto	15.070	5,0%		Colo do útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%		Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%		Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%		Corpo do útero	5.900	2,2%
Bença	6.750	2,2%		Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%		Linfoma não-Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%		Leucemias	4.320	1,6%
Linfoma não-Hodgkin	4.940	1,6%		Sistema Nervoso Central	4.130	1,5%
Pele Melanoma	2.960	1,0%		Cavidade Oral	4.010	1,5%
Linfoma de Hodgkin	1.300	0,4%		Pele Melanoma	2.930	1,1%
Glândula Tireoide	1.150	0,4%		Esôfago	2.770	1,0%
Todas as Neoplasias sem pele*	203.930			Bença	2.190	0,8%
Todas as Neoplasias	302.350			Linfoma de Hodgkin	880	0,3%
				Laringe	770	0,3%
				Todas as Neoplasias sem pele*	190.520	
				Todas as Neoplasias	274.230	

Fig. 02: Estimativa de novos casos de câncer no Brasil.

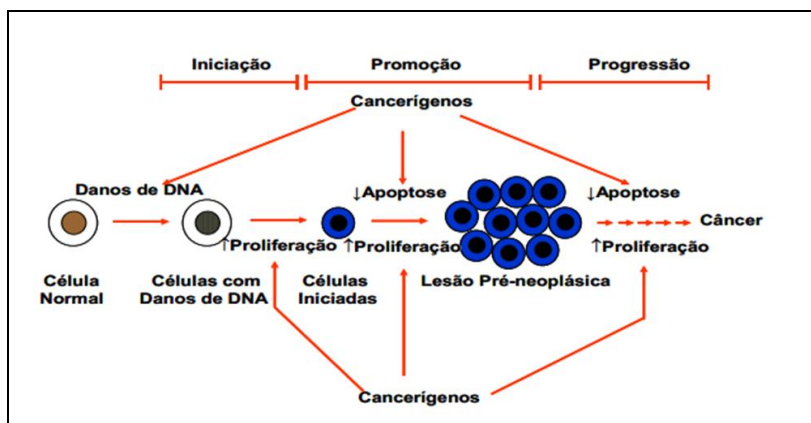
Adpatada/Fonte: MS/INCA/ Estimativa de Câncer no Brasil, 2013.

Devido a sua alta taxa de incidência e mortalidade, o câncer hoje é uma das doenças mais estudada. Inúmeros estudos no campo da biologia celular/molecular comprovam o envolvimento de componentes genéticos e epigenéticos nas diferentes fases de seu desenvolvimento; iniciação, promoção e evolução (Egger et al., 2004). Neste contexto, os eventos epigenéticos podem ser definidos como alterações de caráter reversível, alterações estas que não promovem modificações na sequência do DNA, mas sim no fenótipo celular, exercendo, assim, influência nos mecanismos de expressão gênica. O termo epigenética origina-se do prefixo grego epi, que significa “acima ou sobre algo” e estuda as mudanças herdadas nas funções dos genes, observadas na genética, mas que não alteram as sequências de bases na molécula de DNA, sendo os padrões epigenéticos sensíveis a modificações ambientais e hábitos psicossociais que podem causar mudanças fenotípicas, as quais serão transmitidas pela mitose ao longo das gerações (Egger et al., 2004). Dentre os diferentes eventos epigenéticos, as modificações (acetilação e metilação) de histonas e a metilação do DNA são cruciais para estabelecimento e controle da correta programação da expressão genica. Desta forma, falhas nestes processos podem promover importantes alterações na expressão genica (Rothhammer e Bosserhoff, 2007).

A metilação do DNA é o evento epigenético mais frequente e que afeta diretamente a molécula do DNA e, talvez por este motivo, seja o mais bem estudado. A metilação é uma alteração química caracterizada pela adição de um grupamento metil no carbono 5 de citosinas que precedem guaninas (dinucleotídeos-CpG) (Yang et al., 2010). Trata-se de um processo biológico

extremamente importante, pois sua presença está relacionada principalmente ao silenciamento genético. Assim, a metilação de CG presentes nas regiões promotoras dos genes pode impedir a ligação de fatores de transcrição, formando uma barreira física ao sistema de reconhecimento dos fatores de transcrição ao DNA, resultando em diminuição da atividade do gene (Comb et al., 1990).

A hipermetilação de regiões ricas em CpG denominadas “ilhas CpG”, normalmente localizadas em regiões promotoras de genes supressores tumorais, como a hipometilação de regiões que deveriam originalmente estarem metiladas apresentam importante papel no desenvolvimento do câncer (Muller e Prado, 2008). Aproximadamente 60% dos genes humanos apresentam alta concentração de dinucleotídeos CpG, as ilhas de CpGs em seus promotores. A metilação nestas ilhas pode alterar drasticamente a transcrição gênica, as vezes silenciando o gene por completo. Isto porque de maneira geral promotores contendo ilha de CpGs não estão metilados (Jones and Liang, 2009). Em células tumorais regiões promotoras de genes supressores tumorais tornam-se hipermetilados, resultando em parcial ou total silenciamento da expressão. Já a perda da metilação (hipometilação) em regiões promotoras de genes pró-oncogenes pode aumentar o risco para o desenvolvimento do câncer, possibilitando que células transformadas escapem do processo de apoptose, fiquem não sensíveis a sinais de parada do ciclo celular e o que gera alto potencial de proliferação, como demonstrado no **Esquema 1**, além de produzir sinais de crescimento que possibilitam a angiogênese e em estágios avançados do câncer a invasão tecidual (metástase) (Scarano et al., 2005). Com base nestas informações, o estudo da hipermetilação de regiões promotoras pode fornecer informações importantes para a compreensão do processo da carcinogênese, assim como a avaliação do padrão de metilação de diferentes tumores pode ser utilizado como um biomarcador para seu diagnóstico precoce, planejamento terapêutico e prognóstico de um indivíduo.



Esquema 01: Etapas da Carcinogênese.

2.2 Câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço é representado na sua imensa maioria por neoplasias epiteliais do tipo carcinoma espinocelular (CEC) que acometem as vias aerodigestivas superiores (Dedivitis et al., 2004). Os carcinomas estão entre os tipos mais comuns, originando-se de células que revestem o corpo incluindo a pele (ectodermas) e uma série de revestimentos internos (endodermas) (boca, garganta, brônquios, esôfago, estômago, intestino, bexiga, útero, ovários, dutos mamários, pâncreas e próstata). Dentre os diferentes tipos, o carcinoma de células escamosas (CEC), também conhecido como carcinoma espinocelular, é definido como uma neoplasia maligna que exibe características morfológicas de epitélio escamoso (Dedivitis et al., 2004).

O CEC é frequentemente o estágio final de alterações neoplásicas no epitélio escamoso estratificado, que começa como uma displasia epitelial e progride até que as células do epitélio displásico rompam a membrana basal e invadem o tecido conjuntivo adjacente, podendo ser originado também diretamente (de novo) de um epitélio de revestimento estratificado, não apresentando a fase de lesão pré-maligna (Sapp et al., 1997). Este tipo de neoplasia maligna é mais comum na cavidade bucal, representando aproximadamente 90% dos tumores malignos da boca. Embora ocorra em vários locais da cavidade bucal, é mais comum no lábio inferior, na borda lateral da língua ou no assoalho bucal. Estudos epidemiológicos mostram que sua incidência aumenta com o passar da idade, sendo mais comum após 40 anos (Wood e Goaz, 1997). Entretanto, estudos recentes constataram importante

aumento do seu desenvolvimento em pacientes com idade inferior a 45 anos (Venturi et al., 2004).

Este tipo de neoplasia de boca é considerado de alta incidência, possuindo uma das taxas mais alta do mundo. Sua prevenção e prognóstico positivo estão intimamente relacionados ao diagnóstico precoce e à mudança de comportamento do indivíduo (Falcão et al., 2014). Com base em dados de estudos epidemiológicos e artigos científicos, pode-se concluir que não houve uma melhora significativa no prognóstico em relação ao tratamento, mesmo sendo observados avanços nas técnicas cirúrgicas, e nos tratamentos como radio e quimioterapia (Mork, 1998). Os baixos índices de sobrevida encontrados refletem a necessidade de maior atenção ao câncer bucal (Oliveira et al., 1996). Uma provável explicação para os baixos índices de sucesso dos tratamentos, talvez seja pelo fato de que frequentemente os pacientes acometidos com neoplasia de cabeça e pescoço desenvolvem lesões múltiplas em diferentes sítios anatômicos, estando esse padrão multifocal de acordo com o modelo denominado de "campo de cancerização" (Slaughter et al., 1953).

2.3 Campo de cancerização

O conceito de campo de cancerização foi estabelecido por Slaughter et al. em 1953 estudando neoplasias multicêntricas da mucosa oral. Este termo foi introduzido na literatura baseado no fato de que a neoplasia oral origina-se de áreas multifocais com alterações pré-cancerosas e mesmo apresentando caráter multifocal podem coalescer. O desenvolvimento de um segundo tumor primário ocorre em uma razão de 20 a 30% dos pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico (Hong, 1987). Estudos realizados nas margens de segurança do tumor evidenciaram a existência de alterações genômicas em epitélios histologicamente normais adjacentes aos carcinomas orais. Estas células em especial, apresentavam vantagem de crescimento e elevada taxa proliferativa (Raimondi et al., 2005). Desta forma, análises moleculares em tecidos clinicamente "normal" adjacente ao tumor, assim como das margens cirúrgicas após a excisão tumoral, têm sido largamente utilizada em estudos moleculares de importantes marcadores de perda de heterozigose, instabilidade cromossômica e mutações em genes candidatos com o objetivo de melhor compreender o campo molecular deste fenômeno. Adicionalmente, estudos demonstram que o campo de cancerização não é limitado somente a cavidade bucal, podendo ser expansível para qualquer tecido epitelial. Este fato explica em

parte o motivo do controle cirúrgico local deste tipo de neoplasia não ser uma terapia totalmente eficiente (Raimondi et al., 2005). Hoje já está bem estabelecida a relação entre as alterações moleculares acumuladas nesses campos de cancerização com o início do processo de carcinogênese, no entanto os mecanismos moleculares que promovem tais alterações ainda não foram totalmente elucidados. Assim, acreditamos que a presença de células “mutadas” em um campo de cancerização seja a base para iniciar o processo de carcinogênese (Rubin, 2011).

Contudo, apenas as evidências clínicas, muitas vezes, não são relevantes para prever uma resposta ao tratamento do câncer bucal. Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de se obter novos marcadores que auxiliem no diagnóstico precoce e na predição de resposta às diferentes modalidades de terapia oncológica (Tan e Ogden, 1997; Tsuchiya et al., 2001; Grabenbauer et al., 2003; Blomberg et al., 2011). Acreditamos que as sucessivas alterações moleculares formam a base para o desenvolvimento de tumor em campo de cancerização. Desse modo, outros fatores vêm sendo investigados, principalmente os componentes moleculares, onde os estudos apontam cada vez mais a participação de eventos epigenéticos regulando os fenômenos iniciais do processo carcinogênico (Venturi et al., 2004; Worsham et al., 2011).

2.4 Família do Gene *TP73*

O gene *TP73* pertence a família que inclui o gene *TP53*. Esta pequena família de genes inclui além do gene *TP53*, em mamíferos, os ortólogos adicionais *TP63* e *TP73* (Costanzo et al., 2014). O gene *TP53* codifica a proteína p53, que ocupa posição de destaque no complexo processo carcinogênico no microambiente tumoral. Quando identificado foi relacionado principalmente no processo de reparo ao DNA. Por bloquear a proliferação de células com o DNA alterado por fatores carcinogênicos, levando à parada do ciclo celular ou à apoptose, foi nomeado como “Guardião do Genoma” (Lange, 1992). O papel da proteína p53 como supressora tumoral já está amplamente caracterizado. Ela atua diretamente em diversos efetores como fator de transcrição, regulando em especial a transcrição de proteínas da família Bcl2 (Moll et al., 2003). Desde sua descrição em 1979, a complexa via de sinalização ativada pela proteína p53 têm sido alvo de importantes pesquisas devido à sua gama de funções em diversos processos celulares (Lan et al., 2005). Estudos recentes confirmam que *TP53* é o gene mais frequente alterado no câncer em

humanos (Pfeifer et al., 2011), sendo demonstrado que aproximadamente 50% de todos os tipos de câncer apresentam alterações que inativam a função supressora tumoral de p53 (Lan et al., 2005).

No final de 1990, foram identificados com base em uma identidade compartilhada de seus três domínios funcionais: domínio de transcrição, de ligação ao DNA e de oligomerização, seus dois genes ortólogos, o *TP63* e *TP73* (Yang et al., 1998). Na época, a descoberta criou bastante expectativa em relação a suas funções biológicas. Enquanto o *TP53* possuía como principal função proteger a integridade do DNA a diferentes insultos, o *TP63* parecia ser essencial ao desenvolvimento e diferenciação de determinados tecidos (De Laurenzi e Melino, 2000) e o *TP73* para a diferenciação neuronal e desenvolvimento olfativo (Gonzalez-Cano et al., 2013). Atualmente, sabe-se também que os genes *TP63* e *TP73* possuem grandes similaridades e muitas diversidades ainda não descritas. Mesmo com as diferentes funções específicas associadas a estes genes, as inúmeras reações bioquímicas cruzadas entre os membros desta família sugerem uma rede funcional que pode influenciar diferentes aspectos da ação individual de cada gene (Moll et al., 2003).

Entretanto existem evidências de que danos ao DNA possam induzir a acetilação do p73 através da acetiltransferase p300, causando apoptose por um mecanismo independente do p53 (Costanzo et al., 2002). Diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de elucidar o envolvimento deste gene na carcinogênese e progressão tumoral. Contudo, sua participação em processos carcinogênicos de tumores escamosos da cabeça e pescoço já foi demonstrada por diferentes grupos de pesquisa (Choi et al., 2002; Faridoni-Laurens et al., 2001; Weber et al., 2002).

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito da exposição de queratinócitos normais humanos (linhagem celular HaCaT) aos fatores químicos produzidos por células de linhagens tumorais de carcinoma de células escamosas bucais humanas. Foram avaliados o efeito desta exposição sobre o perfil de metilação global do DNA, a instabilidade genômica via análises da região LINE-1 e o *status* de metilação do promotor do gene *TP73*.

Considerando os objetivos centrais propostos, os seguintes objetivos específicos foram realizados:

1. Avaliação da viabilidade das células HaCaT após exposição ao meio condicionado por células tumorais via ensaio de redução do MTT;
2. Comparação do perfil de metilação global do DNA e do perfil de metilação da região LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*) das células HaCaT e das linhagens de CEC (KB, SCC4, SCC9 e SCC15) empregando o ensaio de citometria de fluxo e o método COBRA;
3. Determinação do perfil de metilação global do DNA em HaCaT expostos ao meio condicionado por células tumorais pela citometria de fluxo;
4. Avaliação da instabilidade genômica através da determinação do perfil de metilação da região LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*) pelo método COBRA nas diferentes linhagens tumorais e HaCaT expostos ao meio condicionado.
5. Determinação do *status* de metilação do gene *TP73* em HaCaT e em linhagens de células tumorais (KB, SCC4, SCC9 e SCC15) pelo método COBRA;
6. Avaliação do efeito dos mediadores químicos produzidos por células tumorais no perfil de metilação do gene *TP73* em HaCaT expostas por 24, 48, 72 e 96 h ao meio condicionado pelas diferentes linhagens tumorais (KB, SCC4, SCC9 e SCC15) pelo método COBRA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes

Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina e penicilina foram obtidos da LGC Biotecnologia Ltda (São Paulo, SP, Br). MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), albumina de soro bovino (BSA), Tween 20, Triton X-100, *primers* foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Anticorpo primário anti-5-metil citosina (5-MeC) foi obtido da Oncogene (La Jolla, CA, USA) e anticorpo secundário anti-mouse conjugado à PE obtido da Invitrogen, Molecular Probes (Eugene, OR, USA). As enzimas de restrição *TaqI* e *TasI* foram obtidas da Fermentas (Burlington, ON, Canada).

Métodos

Cultura celular - As linhagens celulares de queratinócito humano normal HaCaT [gentilmente doada pela Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira (Laboratório de Bioensaios *in vitro* e Transdução de Sinal – IB-UNICAMP, Campinas, São Paulo)], de Carcinoma bucal humano (KB) [gentilmente doada pela Dra. Luciana Holanda (IB-UNICAMP)] e de Carcinoma Espinocelular humano (SCC4, SCC9 e SCC15) [gentilmente doada pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta (FOP-UNICAMP)], foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (antibióticos), em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para manutenção as células foram cultivadas em frascos de cultura celular com repiques periódicos a cada 48 h.

Coleta e armazenamento do meio condicionado – As linhagens de células tumorais (KB, SCC4, SCC9 e SCC15) foram plaqueadas em placa de cultura a uma densidade de 1×10^4 cel/mL e mantidas em cultura em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. Ao atingirem a semi-confluência (72 h após o plaqueamento), o meio condicionado pelo crescimento celular foi coletado, devidamente identificado, clarificado por centrifugação (14.000 rpm por 15 minutos) e imediatamente armazenado a -20°C.

Padronização do modelo experimental

Exposição aos mediadores químicos tumorais – Para a realização dos testes iniciais de padronização da proporção de meio condicionado, as células HaCaT foram plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 7×10^3 células por poço. Para exposição aos mediadores químicos tumorais foram utilizadas diferentes proporções de meio condicionado por diferentes linhagens tumorais (10%, 25%, 50%, 75% e 100%) diluídos em meio DMEM suplementado com 10% SFB e antibióticos novo. A seguir as células foram mantidas em cultura por 24, 48, 72 e 96 h. Após, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT. A viabilidade celular foi estimada comparando-se os valores de absorbância das células expostas ao meio condicionado com os valores de absorbância do grupo controle, sendo expressos em percentagem em relação ao controle (100%). Como controle positivo foi utilizado DMEM 10% SFB novo e como controle negativo foi utilizado o condicionado pela própria linhagem normal (HaCaT). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

Análise da viabilidade celular

Ensaio de redução do MTT – Após a exposição das células ao meio condicionado por 24, 48, 72 e 96 h, as células foram lavadas com tampão fosfato-salina (PBS), pH 7,4 e então adicionados 100 μ L de meio de cultura sem SFB contendo 0,5 mg/mL de sal de tetrazólio. Após 4 h de incubação em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ o meio foi cuidadosamente retirado e os cristais de formazam produzidos foram solubilizados em etanol. As placas foram agitadas por 15 minutos e a absorbância correspondente a cada poço determinada espectrofotometricamente a 570 nm em leitor de microplacas (ELx 800 BIO-TEK). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata.

Análise do perfil global de Metilação do DNA por citometria de fluxo: As células foram plaqueadas a uma densidade de 7×10^3 células (3 mL de suspensão celular) em placas de 6 poços e mantidas em cultura por 48 h como descrito anteriormente. Após o término do período de exposição ao meio condicionado, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. A seguir, 5×10^5 células foram coletadas e fixadas com paraformaldeído 2% em PBS a temperatura ambiente por 30 minutos.

Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com 0,2% de Triton X 100 por 1 h. Após o término da permeabilização, as células foram lavadas com PBS e então incubadas com anticorpo primários específicos contra 5-metil citosina (5-meC) diluído 1:1000 em PBS contendo BSA 1% por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e então incubadas por 1 h com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com PE a temperatura ambiente e protegidas da luz. Ao término da incubação, as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso do anticorpo secundário, ressuspensas em 300 μ L de PBS e analisadas (10.000 eventos por amostra) em citômetro de fluxo FACS Calibur (Beckton Dickinson) usando-se o *software* CellQuest 2.8 (BD). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata.

Análise da instabilidade genômica através do *status* de metilação da sequência LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Elements-1*)

COBRA - *CO*mbined *B*isulfite *R*estriction *A*nalysis – O padrão de metilação da região LINE-1 foi analisado pelo protocolo COBRA (do inglês *CO*mbined *B*isulfite *R*estriction *A*nalysis), que combina a modificação do DNA por bissulfito de sódio, amplificação da região em estudo por PCR e digestão por enzimas de restrição específicas.

Obtenção do DNA – As células HaCaT foram plaqueadas a uma densidade de 7×10^3 células (3 mL de suspensão celular) em placas de 6 poços e expostas aos diferentes meio condicionado e mantidas em cultura por 24, 48, 72 e 96 h como descrito anteriormente. Após a exposição, as células foram tripsinizadas, coletadas, lavadas com PBS e armazenadas em tampão de extração (10 mM Tris HCl pH 7,8, 5 mM EDTA, 0,5% SDS) a -20 °C. O DNA genômico (gDNA) foi extraído pela digestão com proteínase K (20 mg/mL), seguida pelo método de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Trevilato e Line, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio – As amostras de gDNA extraídos foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio. Aproximadamente 300 ng de gDNA foram tratado utilizando-se o *kit methyl/SEQr® Bisulfite Conversion* (Life, Applied Biosystems), seguindo as especificações do fabricante. O gDNA (300 ng)

transformado foi ressuspendido em 50 μ L de tampão TE (pH 7.6) e armazenados a 4°C.

Amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) – As reações da polimerase em cadeia foram realizadas em termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems, Life Technologies. Carlsbad, CA) com iniciadores específicos para amplificação de DNA transformados por bissulfito de sódio. As reações pré-otimizadas para amplificação da região LINE-1 foram realizadas com volume total de 25 μ L contendo, 1 μ L de cada iniciador a 50 pmoles/ μ L (*Forward*: 5'- CCG TAA GGG GTT AGG GAG TTT TT-3', e *Reverse*: 5' – RTA AAA CCC TCC RAA CCA AAT ATA AA-3'), 12,5 μ L de *Go Taq Green Master Mix* (Promega Corporations, Madison, WI, USA) e 2 μ L de gDNA transformado por bissulfito de sódio a aproximadamente 6 ng/ μ L e q.s.q de água Milli-Q *Rnase free*. Os parâmetros de ciclagem utilizados para amplificação das amostras foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão por 1 minuto a 72°C e extensão final de 7 minutos a 72°C.

Digestão enzimática – O *status* de metilação da região LINE-1 foi avaliado pela dupla digestão do produto da amplificação pela PCR pelas enzimas *TaqI* e *TasI* (Fermentas, Burlington, ON, Canada), as quais possuem diferentes sítios de restrição. No entanto, apenas a enzima *TaqI* é sensível à metilação cortando o *amplicon* de 160 pb em dois fragmentos de 80 pb, enquanto que a *TasI* corta o *amplicon* não metilado em dois fragmentos, sendo um de 63 e outro de 97 pb. As digestões foram realizadas em reações com volume final de 20 μ L, contendo 10 μ L do produto amplificado e 0,3 μ L de cada enzima (*TaqI* e *TasI*) em reação única com tampão específico para realização de dupla digestão: Tango Buffer (33 mM Tris-acetato, 10 mM Acetato de Magnésio, 66 mM Acetato de Potássio, BSA 0,1 mg/mL) a 65°C por 16 h. Após o término das digestões as enzimas foram inativadas por 20 minutos a 80°C e armazenadas a -20 °C. Para determinação da porcentagem de metilação, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e a intensidade das bandas determinadas pela análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image*.

Análises de Metilação da região LINE-1 – Para determinar a % de metilação a região LINE-1 foi classificada em 4 diferentes grupos, de acordo com o *status* de metilação dos 2 diferentes dinucleotídeo CpG passíveis de metilação localizado

nesta região: **1)** região LINE-1 contendo os 2 dinucleotídeo CpG não metilados ($^u C^u C$); **2)** região LINE-1 contendo os 2 dinucleotídeo CpG metilados ($^m C^m C$); **3)** região LINE-1 contendo dinucleotídeo CpG do sentido 5'-metilado e dinucleotídeo CpG do sentido 3'- não metilado ($^m C^u C$) e **4)** região LINE-1 contendo dinucleotídeo CpG do sentido 5'-não metilado e dinucleotídeo CpG do sentido 3'- metilado ($^u C^m C$). O valor da porcentagem total de metilação da região LINE-1 foi obtido a partir da fórmula: % de metilação da LINE-1 = $100 \times (C+A)/(C+A+A+B+D)$ e os valores das porcentagens referentes as demais classificações foram obtidos pelas fórmulas: parcialmente metilado ($\% ^m C^u C$) = $100 \times (A)/(((C-D+B)/2)+A+D)$ e ($\% ^u C^m C$) = $100 \times (D-B)/(((C-D+B)/2)+A+D)$; hipometilado ($\% ^u C^u C$) = $100 \times B/(((C-D+B)/2)+A+D)$ e hipermetilado ($\% ^m C^m C$) = $100 \times ((C-D+B)/2)/(((C-D+B)/2)+D+A)$ (Kitkumthorn et al., 2012; Patchsung et al., 2012). As análises foram expressas como mediana $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Análise do *status* de metilação da região promotora do Gene TP73

Amplificação por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) – As reações da polimerase em cadeia foram realizadas em termo-ciclador Veriti (Applied Biosystems, Life Technologies. Carlsbad, CA) com iniciadores específicos para amplificação de DNA transformados por bissulfito de sódio. As reações pré-otimizadas para amplificação da região promotora de gene TP73 foram realizadas com volume total de 25 μ L contendo, 1 μ L de cada iniciador a 50 pmoles/ μ L (*Forwad*: 5'- GGT ATY GTT ATT YGG GTT ATG TTT GTTT-3', e *Reverse*: 5'- CCC TCA CCT TCR TTA AAA TCC CTC-3'), 12,5 μ L de *Go Taq Green Master Mix* (Promega Corporations, Madison, Wi, USA) e 2 μ L de gDNA transformado por bissulfito de sódio a aproximadamente 6 ng/ μ L e q.s.q de água Milli-Q *Rnase free*. Os parâmetros de ciclagem utilizados para amplificação das amostras foram: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos de 37 ciclos a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto, extensão por 1 minuto a 72°C e extensão final de 7 minutos a 72°C, gerando *amplicons* de 110 pb (Cr1: 3.638.669 - 3.638.778).

Digestão enzimática – O *status* de metilação da região promotora do gene TP73 foi avaliado pela digestão do produto da amplificação pela PCR pela enzima *HpyCH4IV* (Fermentas, Burlington, ON, Canada). A enzima *HpyCH4IV* é sensível a metilação. Esta reconhece e cliva regiões ACGT de nucleotídeos do *amplicon* quando a

citocina desta região estiver metilado. As digestões foram realizadas em reações com volume final de 20 μ L, contendo 10 μ L do produto amplificado e 2,0 μ L (2U) da enzima *HpyCH4IV* em reação com tampão específico a 37°C por 4 h. Como controle foi realizado a incubação do mesmo volume do produto da PCR apenas com 2,0 μ L tampão e q.s.q de água Milli-Q, sem a presença da enzima. Para determinação da porcentagem de metilação, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% e a intensidade das bandas determinadas pela análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image*.

Análises do status de metilação da região promotora do gene *TP73* – Para determinar o status de metilação da região promotora do gene *TP73* (Figura 1A).

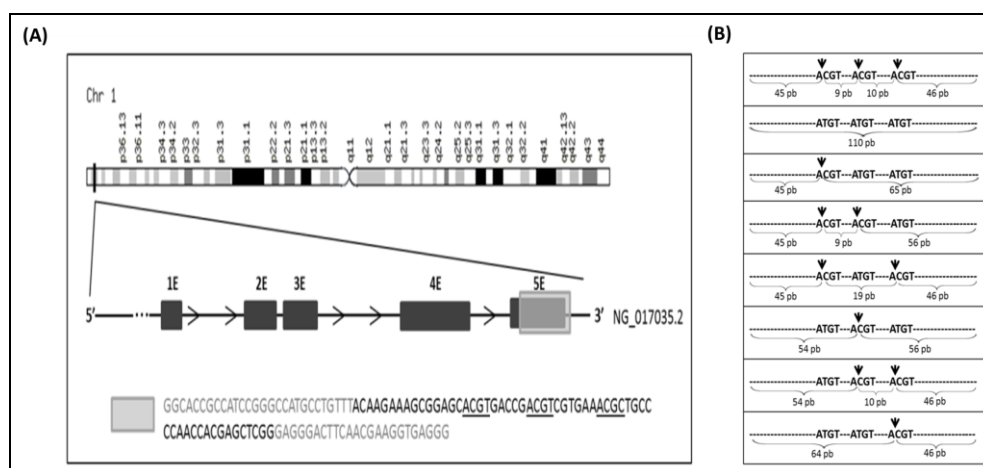


Figura 1: Representação gráfica da estrutura de gene *TP73*: (A) Retângulos cinza escuros representam os cinco exons (1E - 5E), o cinza claro representa a região de promotora estudada com a indicação da sequência amplificada (iniciadores definidos em cinza claro). As bases sublinhadas são indicativas região CpG, passíveis de reconhecimento pela enzima de restrição *HpyCH4IV*. (B) Prováveis de locais de reconhecimento de corte pela enzima *HpyCH4IV* após tratamento com bissulfito.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise da ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi realizada utilizando o programa *STATA Data Analysis and Statistical Software*

(Lakeway Drive College Station, Texas, USA). O teste de variância One-way ANOVA (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis (dados não paramétricos), foi utilizado para análise dos resultados nos grupos controle e experimental, com nível de significância de 5%. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

Exposição das células HaCaT aos mediadores químicos tumorais

Para avaliação do efeito da exposição de células normais ao meio condicionado por fatores químicos produzidos por células tumorais na viabilidade celular, células HaCaT foram expostas a diferentes concentrações de meio condicionado pela linhagem de Carcinoma bucal humano (KB) e mantidas em cultura por 24, 48, 72 e 96 h. Os resultados obtidos pela análise da viabilidade celular demonstraram significativa redução da viabilidade celular a partir das 48 h iniciais e somente nas concentrações superiores ou igual a 50% (1:1) quando comparado os resultados obtidos com o grupo que foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de SFB novo (DMEM 10% SFB). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular em nenhuma das concentrações e dos diferentes períodos estudados [24 (Fig. 1A), 48 (Fig. 1B), 72 (Fig. 1C) e 96 h (Fig. 1D)] quando comparado os resultados obtidos para as células HaCaT expostas ao meio condicionado pela célula tumoral aos resultados obtidos para exposição das células HaCaT ao seu próprio meio condicionado (Controle negativo) (Fig. 1A-D).

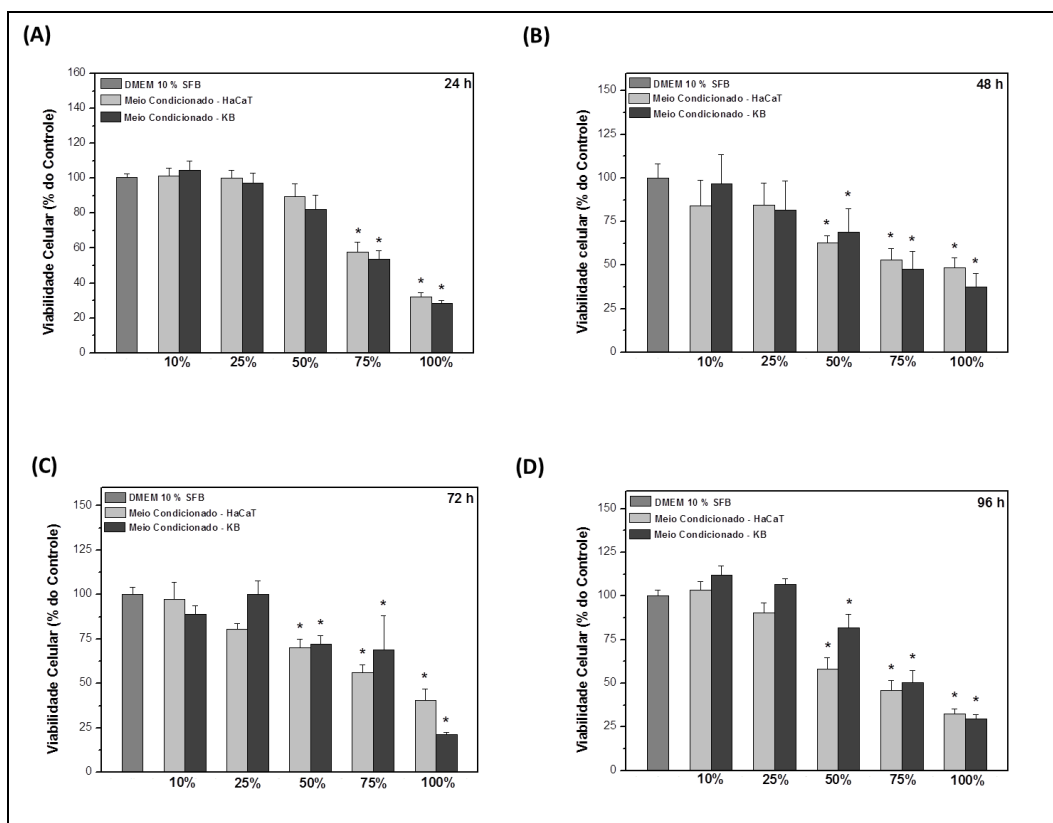


Figura 1. Efeito da exposição ao meio condicionado tumoral na viabilidade celular de queratinócitos humano normais (HaCaT): Para o teste de citotoxicidade, as células HaCaT foram plaqueadas a uma densidade de 7×10^3 células por poço em microplacas de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10 % SFB e diferentes concentrações de meio condicionado (10%, 25%, 50%, 75% e 100%) e incubadas por **(A)** 24, **(B)** 48, **(C)** 72 e **(D)** 96 h a 37°C e 5% de CO₂. Após os diferentes tempos de exposição ao meio condicionado, a viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do sal de tetrazólio (MTT). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle. Controle positivo meio DMEM novo (DMEM 10% SFB); Controle negativo meio condicionado pela própria célula (meio condicionado – HaCaT).

Comparação do *status* de metilação da região LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*) e o perfil de metilação global da DNA entre células epidérmicas normais e tumorais.

Alterações epigenéticas do padrão de metilação ocorrem em sequências repetidas do DNA, sendo estes eventos normalmente observados em estágios iniciais do processo carcinogênico. Neste contexto, o *retrotransposon* LINE-1 (GenBank: M80343). Uma característica importante desta região é que os níveis de hipometilação aumentam de acordo com a progressão tumoral, apresentando hipometilação gradativa nos estágios avançados do desenvolvimento da doença, quando comparados com estágios iniciais (Kitkumthorn et al., 2012). Frente a estas informações e associados ao fato de que a hipometilação desta região se trata de um importante marcador molecular para instabilidade genômica, utilizamos esse marcador para avaliar o efeito dos diferentes modelos de estresse padronizados frente ao nível de metilação desta região. Para isto, utilizamos a metodologia de restrição enzimática combinada com a transformação por bissulfito de sódio denominada COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*).

Inicialmente foi analisado a porcentagem total de metilação da região LINE-1, para as células HaCaT, KB, SCC4, SCC9, e SCC15. A representação gráfica da mediana dos valores revelou que as linhagens tumorais (KB, SCC4, SCC9, e

SCC15) apresentam-se hipometiladas em relação à linhagem normal (HaCaT) (Fig. 2).

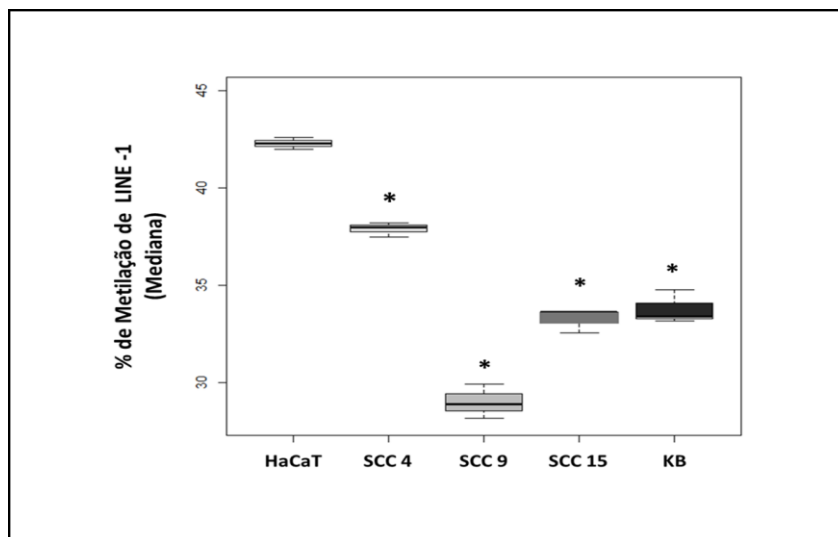


Figure 2: Determinação do *status* de metilação da região LINE-1 pelo método COBRA: Representação gráfica da distribuição das porcentagens de metilação de LINE-1 das diferentes linhagens celulares. Os valores das porcentagens foram obtidos após análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image* e cálculos descritos em material e métodos. Os resultados representam a mediana $\pm$ desvio padrão de análises de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Os estudos que correlacionam os níveis de metilação da região LINE-1 com o processo carcinogênico e progressão tumoral mostram que esta a região possui dois diferentes *locus* passíveis de metilação, sendo um deles localizado na extremidade 5' e o segundo na extremidade 3' do fragmento, estes estudos mostram ainda que os diferentes *locus* podem apresentar diferentes *status* de metilação (Kitkumthorn e Mutirangura, 2011). Desta forma, para avaliarmos o padrão de metilação destes diferentes *locus* das diferentes linhagens celulares, nos utilizamos a classificação proposta por (Kitkumthorn et al., 2011; Patchsung et al., 2012) que subdivide a região em quatro grupos, os quais foram classificados de acordo com o grau de metilação dos 2 diferentes dinucleotídeo CpG localizados respectivamente nas extremidades 5' e 3' da sequência: 1) *Locus* do LINE-1 contendo 2 CpGs não metilados ($^u C^u C$); 2) *Locus* do LINE-1 contendo 2 CpGs metilados ($^m C^m C$); 3) *Locus* do LINE-1 contendo 1 CpG metilado na 5' e 1 CpG não metilado na 3' ($^m C^u C$) e 4) *Locus* do LINE-1 contendo 1 CpG não metilado na 5' e 1 CpG metilado na 3' ($^u C^m C$).

Assim é possível classificar a metilação da região LINE-1 em 3 diferentes classes: hipometilada ($^u C^u C$), parcialmente metilada ($^u C^m C$ e $^m C^u C$) e hipermetilada ($^m C^m C$) (Kitkumthorn e Mutirangura, 2011).

Os resultados das análises dos *locus* de metilação referentes às diferentes linhagens celulares apresentados na Fig. 3 corroboram com os resultados apresentados das porcentagens de metilação total, onde foi observado redução significativa na porcentagem de metilação classe $^m C^m C$ (hipermetilada) (Fig. 3A) e aumento significativo para classe $^u C^u C$ (hipometilada) (Fig. 3B). No entanto, foi observado diminuição significativa na porcentagem de metilação para classe $^m C^u C$ nas linhagens SCC4 e SCC9 e aumento desta mesma classe para as linhagens SCC15 e KB (Fig. 3C). Ainda foi observado aumento significativo na porcentagem de metilação para classe $^u C^m C$ para as linhagens SCC4, SCC9 e SCC15, não sendo observado diferença significativa para esta classe para a linhagem KB (Fig. 3D) quando comparado com os valores obtidos para as células de linhagem normal (HaCaT).

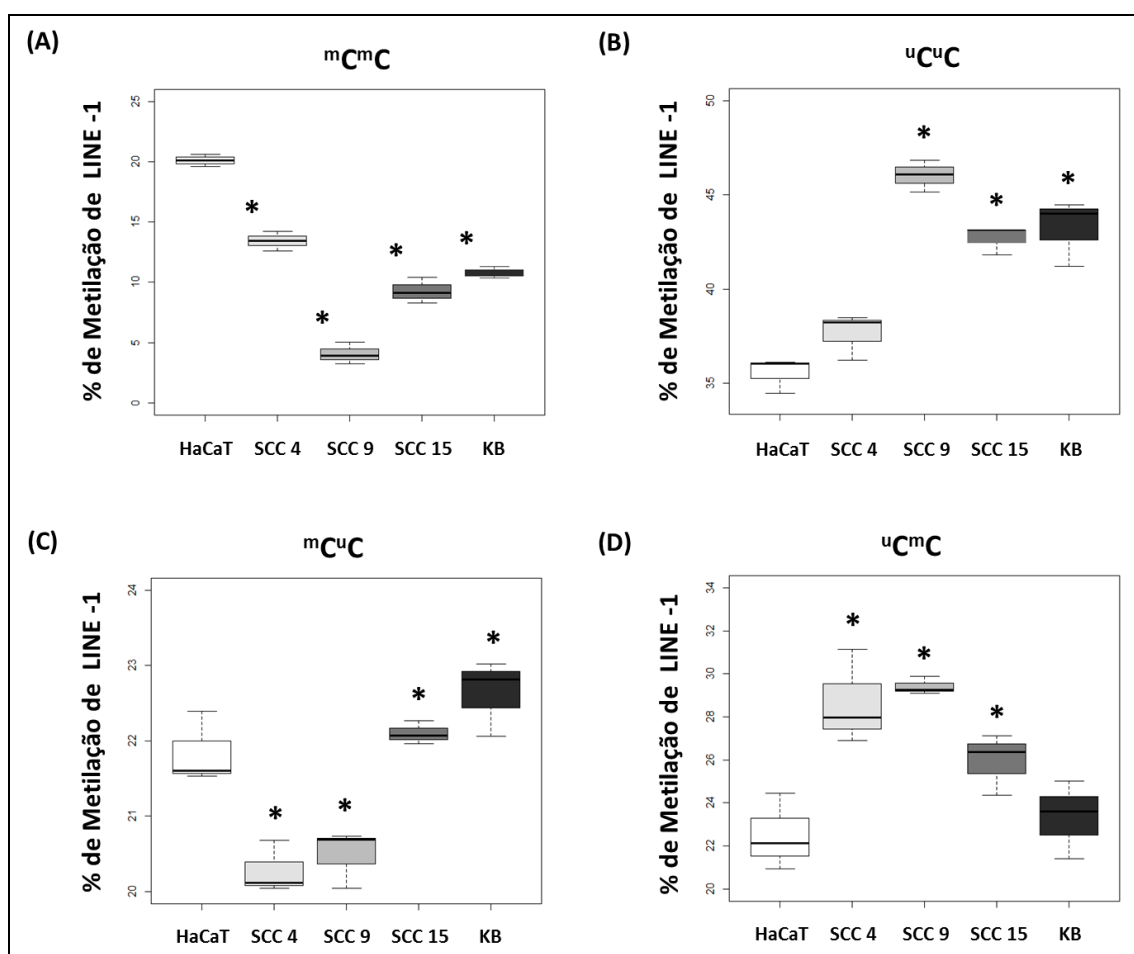


Figure 3: Distribuição percentual dos padrões de metilação dos 2 *locus* de dinucleotídeo-CpG da região LINE-1 das diferentes linhagens: Representação gráfica da distribuição dos valores das porcentagens de metilação dos dois diferentes *locus* dinucleotídeo-CpG localizados na sequência 5' UTR da região LINE-1. **(A)** ${}^mC^mC$ representa hipermetilação da região LINE-1. **(B)** uCuC representa hipometilação da região LINE-1 e **(C e D)** mCuC e ${}^uC^mC$ representam a metilação parcial da região LINE-1. Os valores das porcentagens foram obtidos após análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image* e cálculos descritos em material e métodos. Os resultados representam a mediana $\pm$ desvio padrão de análises de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Dentro os diferentes eventos epigenéticos existentes, as ocorrências de metilação no DNA vêm sendo amplamente estudada por estar relacionada a inúmeros processos biológicos. Neste estudo, a avaliação dos padrões de metilação global do DNA foi realizada pela marcação das células com anticorpo específico para citosina metilada, 5-metil citosina (5-meC) e posterior análise por citometria de fluxo. Os resultados obtidos entre a comparação do perfil de metilação do DNA global entre a linhagem normal com as diferentes linhagens tumorais selecionados para estudo apresentados na Fig. 4 corroboram com os dados da literatura em que mostra preferencialmente hipometilação global do genoma de células tumorais em relação ao padrão de metilação global do genoma das células normais. Nossos mostram que as linhagens tumorais SCC4, SCC9 e KB (Fig. 4A, 4B e 4D) são hipometiladas em relação à linhagem normal, HaCaT. Entretanto, os resultados obtidos para a linhagem tumoral SCC15 curiosamente revelaram que esta linhagem se encontra hipermetilada em relação à linhagem normal (HaCaT) (Fig. 4C).

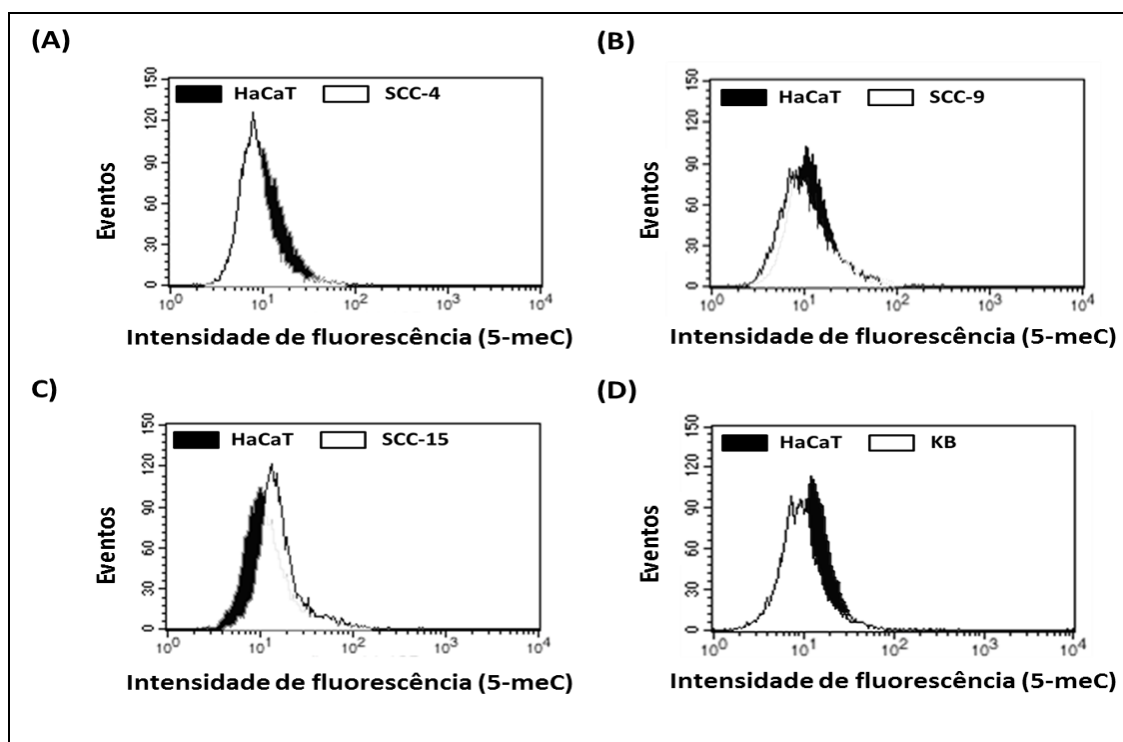


Figure 4: Comparação do padrão de metilação global do DNA: As células HaCaT, SCC4, SCC9, SCC15 e KB foram plaqueadas ($2,1 \times 10^5$ células/poço) em microplacas de 6 poços e incubadas por 48 h a 37°C e 5% de CO_2 . A seguir, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, fixadas em paraformaldeído 2%, incubadas com anticorpo primário anti-5-metil citosina (5-meC) e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Sobreposição entre a linhagem normal HaCaT/linhagem tumoral SCC4. **(B)** Sobreposição entre a linhagem normal HaCaT/linhagem tumoral SCC9. **(C)** Sobreposição entre a linhagem normal HaCaT/linhagem tumoral SCC15. **(D)** Sobreposição o entre a linhagem normal HaCaT/linhagem tumoral KB. Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Avaliação do efeito da exposição de queratinócitos normais (HaCaT) aos fatores químicos tumorais no status de metilação da região LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*) e no perfil de metilação global da DNA.

Os resultados apresentados nas Figs. 5 e 6 são referentes à porcentagem total de metilação da região LINE-1 (Fig. 5) e da porcentagem de seus diferentes *locus* passíveis de metilação (Fig. 6). Os resultados referentes à porcentagem total

de metilação de LINE-1 de células normais após a exposição ao meio condicionado pelas diferentes linhagens tumorais revelaram eventos significativos de hipermetilação após 72 h de exposição para os diferentes meios condicionados (SCC4, SCC9, SCC15 e KB) (Fig. 5C) e eventos hipometilação após 96 h de exposição, exceto para o meio condicionado pela linhagem KB, o qual não apresentou diferença significativa (Fig. 5D). No entanto, não foi possível observar diferenças significantes nos períodos de 24 h (Fig. 5A) e 48 h (Fig. 5B).

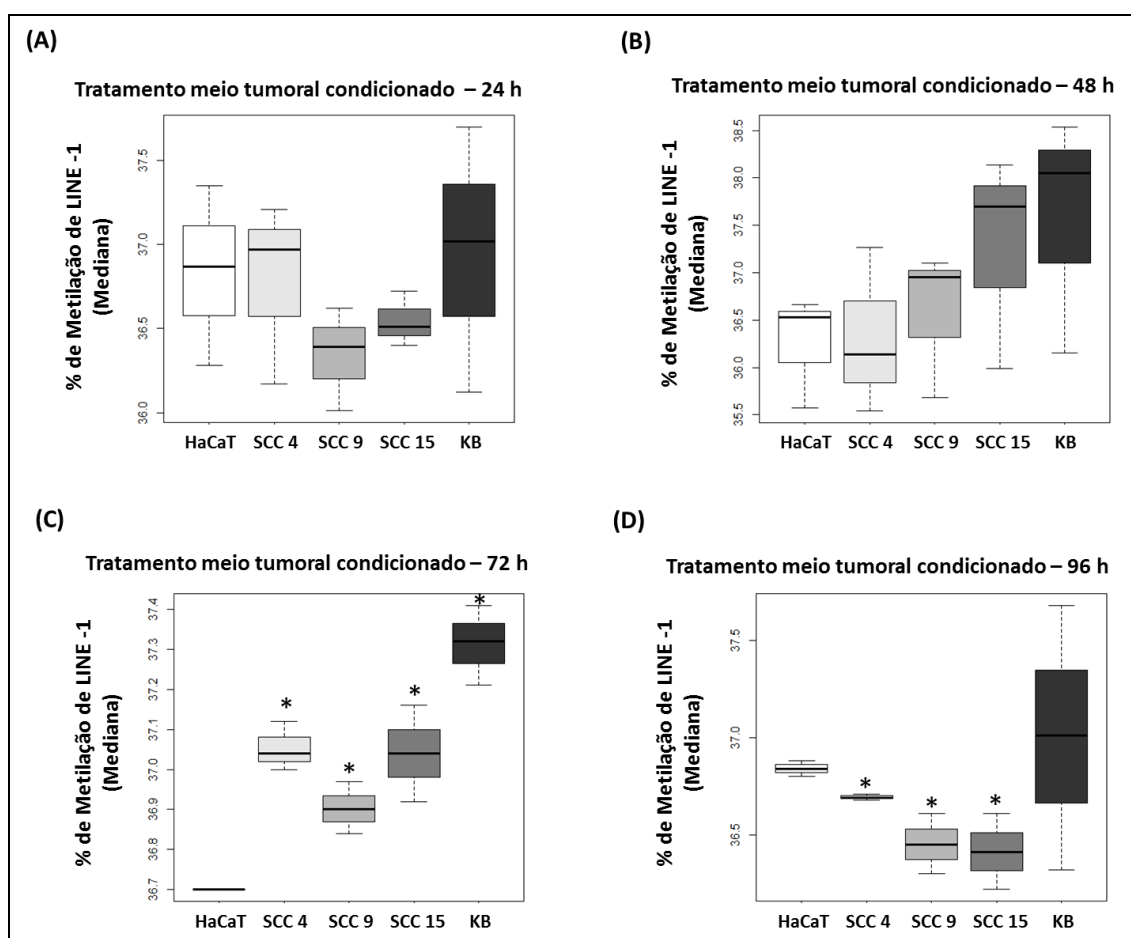


Figure 5: Determinação do *status* de metilação da região LINE-1 pelo método COBRA após exposição de células normais (HaCaT) aos diferentes meios condicionados: Representação gráfica da distribuição das porcentagens de metilação de LINE-1 das diferentes linhagem celulares após por **(A)** 24 , **(B)** 48, **(C)** 72h e **(D)** 96 h. Os valores das porcentagens foram obtidos após análise densitométrica utilizando-se o software *Scion Image* e cálculos descritos em material e métodos. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de análises de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

A Tabela a seguir apresenta os valores das medianas das porcentagens do *status* de metilação das diferentes classes apresentados a seguir, representam a distribuição percentual dos diferentes padrões de metilação da região LINE-1 de acordo com análises realizadas levando em consideração níveis de metilação dos diferentes dinucleotídeo CpG. As porcentagens foram calculadas a partir da análise das bandas com auxílio do programa para análise de imagem *Scion Image* (Scion Corporation, NIH, USA) obtidas pela separação por eletroforese dos produtos gerados pela digestão da região LINE-1 amplificada. Os resultados obtidos não evidenciaram diferenças significativas na distribuição das porcentagens do *status* de metilação para as diferentes classes. Exceto para os grupos das células normais expostas por 48 e 72 h ao meio condicionado pela linhagem tumoral KB (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição percentual do *status* de metilação dos diferentes dinucleotídeo CpG.

<i>locus</i>	Tempo	<i>HaCaT</i>	<i>SCC4</i>	<i>SCC9</i>	<i>SCC15</i>	<i>KB</i>
% ^m C ^m C	24h	13,59±1,49	13,08±1,59	13,18±1,50	13,82±1,05	14,33±1,75
	48h	13,60±1,71	14,53±2,11	14,48±2,10	14,01±2,29	14,29±1,88
	72h	16,14±0,68	16,41±1,04	15,53±1,38	15,03±1,76	14,79±0,82
	96h	15,20±1,20	14,81±1,57	13,39±1,10	13,62±1,43	13,62±2,25
% ^m C ^u C	24h	23,29±0,98	22,94±1,24	22,12±0,17	22,64±0,48	22,83±0,72
	48h	23,86±1,31	22,56±0,77	23,15±0,70	23,47±1,15	23,00±1,30
	72h	23,18±1,26	23,12±0,98	24,30±0,77	24,03±0,99	23,25±1,42
	96h	23,81±1,19	23,87±1,20	24,16±1,08	23,81±0,90	23,08±0,83
% ^u C ^m C	24h	23,2±2,95	24,47±3,57	24,19±2,83	22,81±2,25	22,41±2,91
	48h	21,46±4,05	21,02±4,19	21,04±4,04	23,06±3,64	23,60±2,69
	72h	17,93±2,62	18,16±3,15	18,46±3,65	19,99±4,31	21,81±2,90
	96h	19,47±3,65	19,90±4,37	21,98±3,03	21,78±3,44	23,70±4,21
% ^u C ^u C	24h	39,93±0,74	39,51±0,75	40,50±1,19	40,73±0,79	40,44±0,46
	48h	41,08±1,13	41,89±1,80	41,32±1,52	39,46±0,49	39,12±0,21 *
	72h	42,74±0,68	42,31±1,13	41,72±1,50	40,95±1,56	40,16±0,66 *
	96h	41,52±1,26	41,43±1,60	40,48±0,85	40,79±1,11	39,61±1,14

Os resultados representam a mediana ± desvio padrão de análises de 3 experimentos independentes. * p<0,05 em relação ao controle.

Estudos mostram que os eventos de hipometilação em elementos transponíveis do genoma, em especial LINE-1, estão diretamente correlacionado com importantes mudanças genéticas como; instabilidade genômica, hipermetilação, mutação de genes supressores tumorais e transcrição alternativa de oncogenes durante o desenvolvimento do processo carcinogênico (Lange et al., 2012). Com base nestas informações, analisamos o perfil de metilação global do DNA das células normais expostas aos diferentes tipos de meio condicionado pelas linhagens tumorais. O experimento realizado em triplicata, expôs o queratinócito humano não tumorigênico (HaCaT) ao meio condicionado pelas linhagens de células tumorais, sendo o perfil de metilação global do DNA avaliado após 24, 48, 72 e 96 h. Os resultados obtidos pela análise de citometria de fluxo para células normais expostas ao meio condicionado pela linhagem tumoral SCC4 apresentados na Fig. 6A revelam eventos significativos de hipometilação nas 48 h iniciais, tendendo a normalização em 72 e 96 h quando comparado ao controle (meio condicionado pela própria célula). Em contraste, as células expostas ao meio condicionado pela linhagem tumoral SCC9 apresentaram significativa hipometilação após 48 h e hipermetilação em 72 e 96 h, não demonstrando diferenças significativas após 24 h de exposição (Fig. 6B). Para as células expostas ao meio condicionado pelas linhagens SCC15, foi observado somente hipermetilação nos períodos de 48 e 72 h, não apresentando diferenças significativas nos demais tempo (Fig. 6C). Entretanto as células expostas ao meio condicionado pela linhagem tumoral KB apresentou eventos de hipermetilação de forma tempo-dependente, atingindo seu máximo em 72 h e evento significativo de hipometilação após 96 h (Fig. 6D).

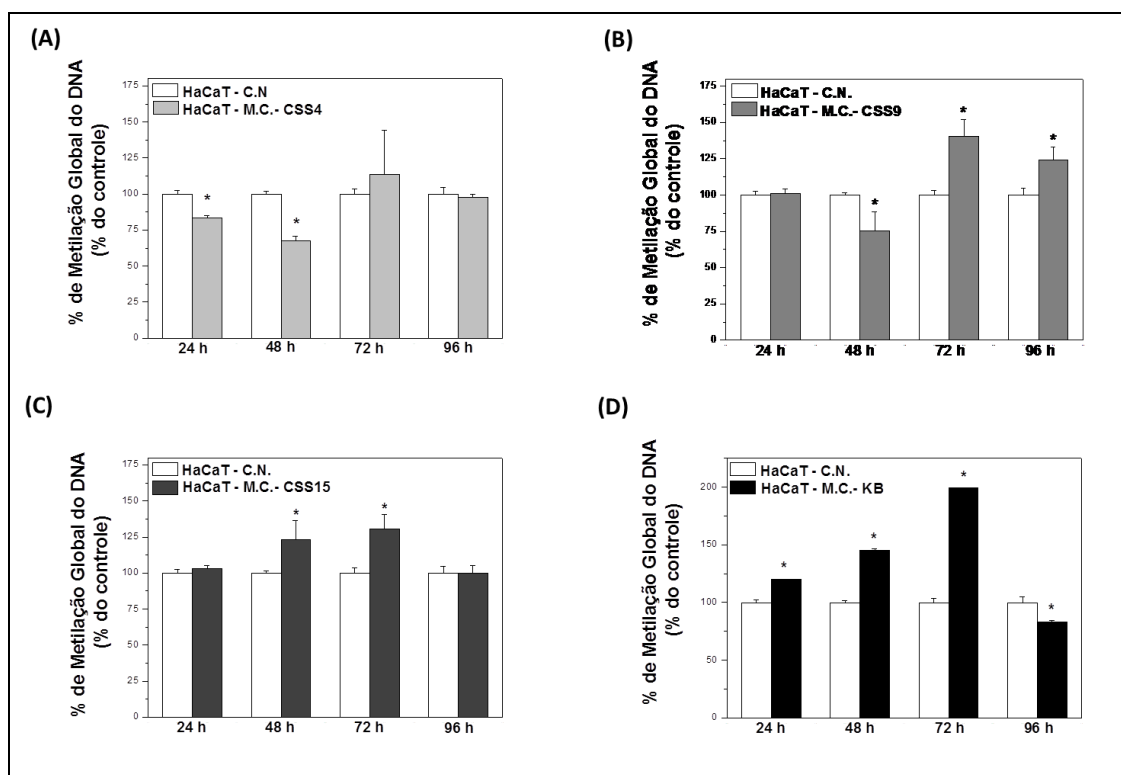


Figure 6: Efeito dos fatores químicos produzidos por células tumorais no padrão de metilação global do DNA de células normais: Células HaCaT foram plaqueadas ($2,1 \times 10^5$ células/poço) em microplacas de 6 poços e incubadas com meio condicionado por diferentes linhagens tumorais na proporção 1:1 e mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO₂ por 24, 48, 72 e 96 h. Após exposição ao meio condicionado pela linhagem tumoral **(A)** SCC4, **(B)** SCC9, **(C)** SCC15 e **(D)** KB, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, fixadas em paraformaldeído 2%, incubadas com anticorpo primário anti-5-metil citosina (5-meC) e posteriormente analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos em relação ao controle (100%) e representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Determinação do efeito da exposição de queratinócitos normais (HaCaT) aos fatores químicos tumorais no *status* de metilação da região promotora do gene *TP73*.

Durante a padronização das condições ideais de ciclagem da região promotora do gene *TP53* encontramos inúmeras dificuldades técnica. Acreditamos

que o fato das ilhas CPGs estarem localizadas principalmente em região rica em guanina impossibilitou a padronização em tempo hábil de uma região que não apresentasse bandas inespecíficas, impossibilitando desta forma a realização de digestão enzimática e obtenção de resultados confiáveis do status de metilação da região promotora do gene *TP53*, inicialmente selecionado para realização deste estudo. Frente a estas dificuldades e com a proximidade da data para envio do relatório final, vimos a necessidade de selecionarmos um novo gene candidato. Como critério principal para a escolha do novo gene candidato, tentamos não desviar dos objetivos centrais do projeto, selecionamos o gene *TP73* por ser gene ortólogo ao *TP53* e apresentar relação com o desenvolvimento do câncer bucal.

Inicialmente determinamos os padrões de metilação da região promotora do gene *TP73* pelo método COBRA. Os resultados apresentados na Fig. 7 revelaram diferenças significativas entre as linhagens tumorais quando comparadas a linhagem normal. No entanto, observamos hipermetilação da região promotora do gene *TP73* somente para a linhagem tumoral SCC4. Para as demais linhagens (SCC9, SCC15 e KB), foi observada significativa hipometilação da região promotora.

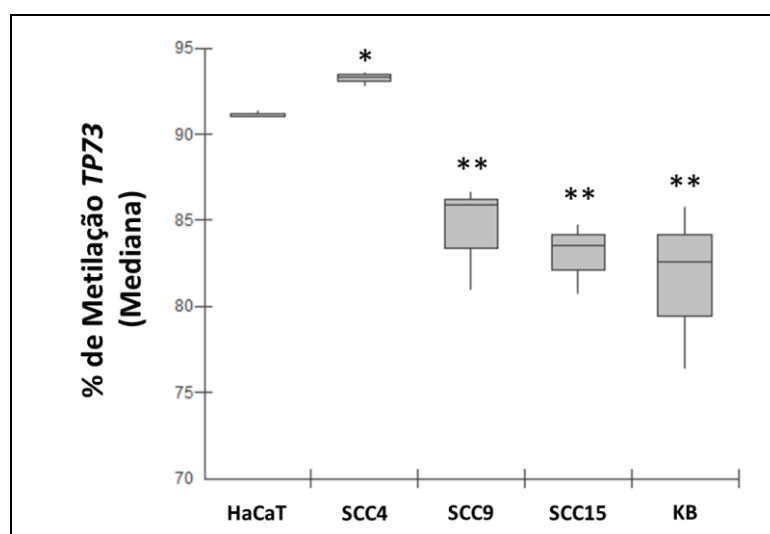


Figure 7: Determinação do status de metilação da região promotora do gene *TP73* pelo método COBRA em diferentes linhagens celulares: Representação gráfica da distribuição das porcentagens de metilação de gene *TP73* das diferentes linhagens celulares. Os valores referentes das porcentagens de metilação das linhagens foram obtidos após análise densitométrica utilizando-se o software Scion Image e cálculos descritos em material e métodos. Os resultados representam a mediana $\pm$ desvio padrão de análises de 3 experimentos independentes realizados

em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ das linhagens tumorais (SCC4, SCC9, SCC15 e KB) em relação ao controle (HaCaT).

Após a determinação do padrão de metilação do gene *TP73* das diferentes linhagens celulares, nos avaliamos o padrão de metilação da região promotora deste gene em células normais expostas aos fatores químicos produzidos pelas linhagens tumorais por diferentes períodos de tempo. Os resultados obtidos estão apresentados na Fig. 8 A-D e mostram que em 24 h os meios condicionados pelas diferentes linhagens apresentaram o mesmo padrão de resultados, promovendo significativa hipometilação ($p < 0,001$) da região promotora do gene *TP73* em relação ao padrão de metilação do grupo controle (Fig. 8A). Curiosamente após 48 h os resultados revelaram eventos de hipermetilação para as células normais expostas ao meio condicionado pela linhagem tumoral SCC4 e expressivo hipometilação das células expostas ao meio condicionado pela linhagem KB, não sendo observadas diferenças significativas na porcentagem de metilação para as células expostas ao meio das linhagens SCC9 e SCC15 (Fig. 8B). Entretanto, os resultados obtidos após 72 h se mostraram novamente diferentes dos padrões obtidos para 48 h, sendo observado hipometilação para as células expostas ao meio condicionado pelas linhagens tumorais SCC4 e KB e hipermetilação para a exposição ao meio condicionado pelas linhagens SCC9 e SCC15 (Fig. 8C). Após 96 h, o evento de hipometilação observado em 72 h para as células expostas ao meio condicionado pela linhagem tumoral SCC4 se manteve e as células expostas ao meio condicionado pelas linhagens SCC9 e SCC15 apresentaram eventos de hipermetilação, não sendo observada diferenças significativas para as células expostas ao meio condicionado pela KB (Fig. 8D).

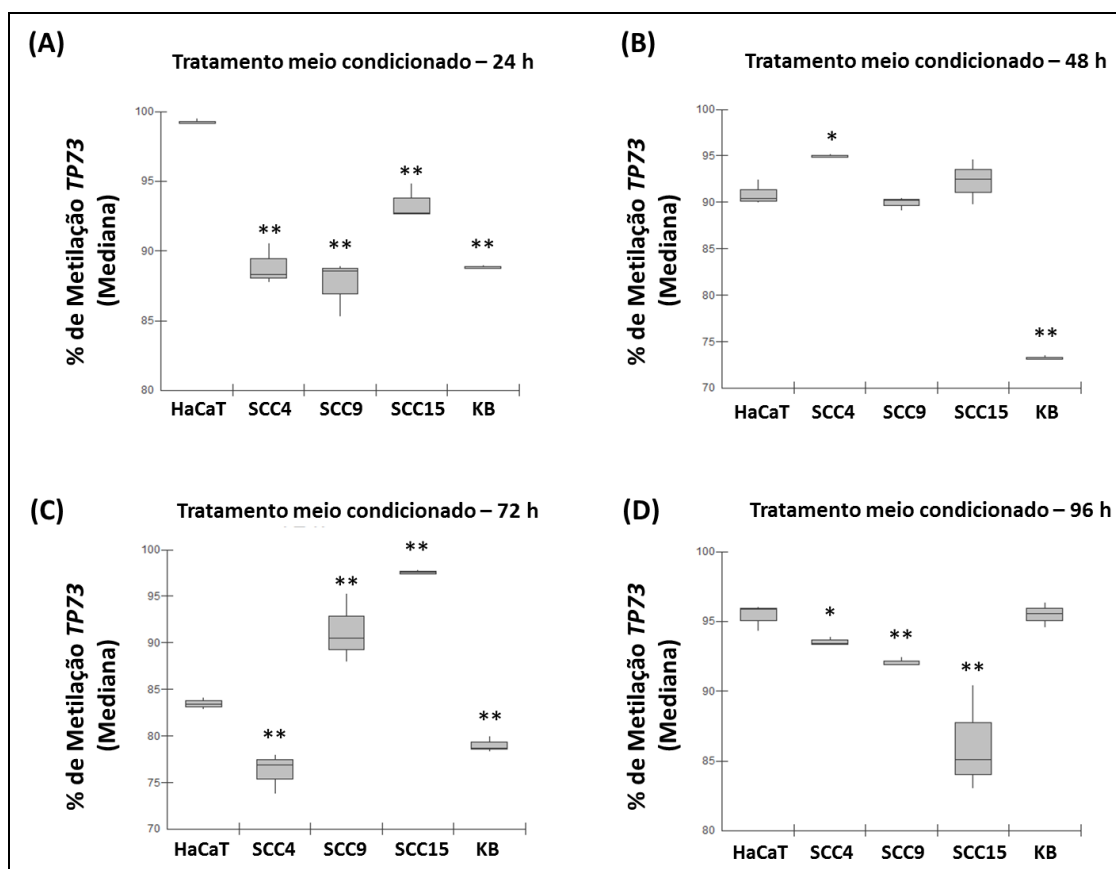


Figure 8: Efeito da exposição de células normais aos fatores químicos produzidos por linhagens tumorais no padrão de metilação da região promotora do gene *TP73*: Células HaCaT foram plaqueadas ($2,1 \times 10^5$ células/poço) em microplacas de 6 poços e incubadas com meio condicionado por diferentes linhagens tumorais na proporção 1:1 e mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO₂ por 24 **(A)**, 48 **(B)**, 72 **(C)** e 96 h **(D)**. Após exposição ao meio condicionado pelas linhagens tumorais, as células foram lavadas com PBS e tiveram seu DNA extraído. O *status* de metilação da região promotora do gene *TP73* foi determinado pelo método COBRA. Os resultados representam a mediana $\pm$ desvio padrão de análises de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ das linhagens tumorais (SCC4, SCC9, SCC15 e KB) em relação ao controle (HaCaT).

6. DISCUSSÃO

Na atualidade tem-se observado um crescente interesse na compreensão do envolvimento genômico ou epigenômico em diversos tipos de neoplasias, na tentativa de correlacionar estes padrões moleculares com as características clínicas dos pacientes. O carcinoma espinocelular de boca é o tumor maligno mais comum da cavidade bucal, acomete o epitélio estratificado que por sua vez é constantemente submetido a insultos genotóxicos ambientais, como principalmente o consumo do tabaco, álcool (Cotran et al., 1999). Por este motivo, neste tipo de epitélio em especial requer o perfeito funcionamento da maquinaria responsável pelo controle e reparo de danos genotóxicos e também pela ativação dos mecanismos responsáveis pela eliminação das células portadoras de alterações (Faridoni-Laurens et al., 2001). Tendo em vista que os genes pertencentes a família do gene *TP53* são ativados em resposta a danos celulares e que seu envolvimento, direto ou indireto, tem sido observado na etiopatogenia de praticamente todas as neoplasias humanas, incluindo as neoplasia de cabeça e pescoço (Fett-Conte e Salles, 2002). O processo da carcinogênese bucal é multi-fatorial, caracterizado por alterações genéticas, as quais estão de certa forma bem caracterizada. Entretanto, o envolvimento epigenético ainda não se encontra totalmente definido (Esteller, 2006a; 2006b; Mehrotra e Yadav, 2006). O que temos de concreto é que na maioria dos cânceres a ativação de importantes oncogêneses e vias de sinalização celular que atuam no favorecimento do crescimento celular, possibilitando assim as características de sobrevivência da célula são modulados por em grande parte pelos eventos epigenéticos (Akrish et al., 2004). Muitos estudos têm mostrado que a ativação de oncogêneses e a inativação de genes supressores tumorais são reguladas por mecanismos epigenéticos, os quais promovem importantes alterações na expressão gênica, podendo gerar assim hipoeexpressões proteicas ou até mesmo o total silenciamento genético (De Silva et al., 2000).

Dentre as modificações epigenéticas, a mais estudada é a metilação do DNA, devido ao fato de contribuir para a ativação ou silenciamento de importantes genes durante a carcinogênese (Jirtle e Skinner, 2007). Tem atribuído um importante papel para os eventos de hiper ou hipometilação observadas em regiões promotoras nos diferentes estágios do desenvolvimento tumoral. Além disso, diferentes tipos tumorais apresentam padrões característicos de metilação, os quais estão sendo

utilizado em exames clínicos para detecção precoce e/ou monitoramento da progressão da doença (Teodoridis et al., 2004). Outro importante ponto que vale a pena ser levantado é o fato da teoria do “campo de cancerização” afirmar que os epitélios agredidos por um mesmo agente carcinogênico responderem simultaneamente a agressão (Vrabec, 1979). Frente a todas estas informações, neste trabalho optamos por avaliar a indução de possíveis alterações moleculares em células normais pela exposição aos fatores químicos produzidos por linhagens de células tumorais, com o objetivo de estender a nossa compreensão da teoria do campo de cancerização. A partir da descoberta do DNA e do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o entendimento a respeito da teoria de campo de cancerização evoluiu, passando a incorporar além das alterações morfológicas, alterações moleculares. Evidências de estudos moleculares mostram que a transição do epitélio de mucosa normal para o câncer envolve uma sequência de alterações genéticas e epigenéticas. Estas alterações levam a desregulação de genes que controlam o ciclo celular, apoptose invasão e metástase. Neste contexto, segundo a teoria de campo de cancerização, alterações moleculares iniciais em células de reserva levariam a formação de um campo alterado (Braakhuis et al., 2004).

Com o objetivo de melhor compreender a nível molecular esta teoria, nos padronizamos um modelo experimental que pudesse nos fornecer importantes informações a respeito das alterações epigenéticas em células normais promovidas pela sua exposição aos fatores químicos tumorais produzidos pelas linhagens neoplásicas. Para isto, foram então realizados ensaios de viabilidade celular com o objetivo de determinar a proporção mais indicada de meio condicionado para a realização dos testes. Acreditamos que a redução na viabilidade celular observada após 48 h esteja relacionada a uma redução na proliferação celular e não a efeitos citotóxicos promovidos pelo meio condicionados. Diferentes estudos mostram que alterações epigenéticas em sequências repetidas do DNA são eventos normalmente observados em estágios iniciais do processo carcinogênico. Neste contexto, o *retrotransposon* LINE-1 é um, entre os diferentes tipos, de sequência repetitiva que está disperso ao longo de aproximadamente 17% de todo o genoma, consequentemente, seu estudo é amplamente considerado e utilizado para compor os estudos de metilação global do genoma (Kitkumthorn et al., 2012; Roman-Gomez et al., 2005; Mulero-Navarro e Esteller, 2008; Tost, 2010). Eventos de hipometilação

nestes elementos transponíveis do genoma estão diretamente associados a uma maior instabilidade genômica e alterações ou desregulamentação da expressão gênica. Assim, inúmeros estudos têm mostrado relação significativa entre a hipometilação desta região com importantes mudanças genéticas como; instabilidade genômica, hipermetilação do DNA, mutação de genes supressores tumorais e transcrição alternativa de oncogenes durante o processo carcinogênico (Lange et al., 2012). Nossos resultados corroboram com os dados da literatura, confirmando que além das células tumorais apresentarem hipometiladas em relação à linhagem normal, também observaram eventos de hipometilação da região LINE-1 em relação a normal. Os eventos de hipometilação foram observados tanto nas análises referentes à porcentagem total de metilação desta região, como para as análises referentes às porcentagens dos diferentes *locus* passíveis de metilação, comprovando assim a instabilidade cromossômica das linhagens tumorais.

Durante a carcinogênese, as células tumorais necessitam desenvolver certas características como evasão de apoptose, instabilidade genômica, insensibilidade a sinais de parada do ciclo celular e alto potencial de replicação. Juntamente com estas alterações, as células tumorais também precisam produzir mediadores químicos que possibilitem os processos de angiogênese e metástase. A perda dos mecanismos de controle por eventos epigenéticos pode resultar em instabilidade genômica, acúmulo de danos no DNA, proliferação celular descontrolada e eventualmente o desenvolvimento de tumor (Macaluso et al., 2003). Inúmeros trabalhos mostram que em tumores, a perda de metilação (hipometilação) do genoma é observada e sugere-se que a hipometilação inicia e propaga a carcinogênese por meio de indução de instabilidade cromossômica e ativação transcricional de oncogenes (Tost, 2010).

A partir da descoberta do DNA e do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o entendimento a respeito da teoria de campo de cancerização evoluiu, passando a incorporar além das alterações morfológicas, alterações moleculares. Evidências de estudos moleculares mostram que a transição do epitélio de mucosa normal para o câncer envolve uma sequência de alterações genéticas e epigenéticas que levariam a alterações na desregulação de genes que controlam o ciclo celular, apoptose invasão e metástase. Neste contexto, segundo a teoria de campo de cancerização, alterações moleculares iniciais em células de reserva levariam a formação de um campo alterado (Braakhuis et al., 2004). Nossos

resultados obtidos pelo método COBRA e citometria de fluxo revelaram que a exposição das células normais aos mediadores químicos tumorais promoveram alterações significativas tanto no *status* de metilação das sequências LINE-1 como no perfil de metilação global do DNA, resultados indicativos de instabilidade genômica. Eventos de hipometilação nesta região estão diretamente associados a uma maior instabilidade genômica e alterações ou desregulamentação da expressão gênica (Lange et al., 2012). Importante ressaltar, que alterações no *status* de metilação em elementos transponíveis do genoma, em especial LINE-1, além de contribuir para uma instabilidade genômica também está diretamente correlacionado com eventos de hipermetilação, mutação de genes supressores tumorais e transcrição alternativa de oncogenes durante o desenvolvimento do processo carcinogênico (Lange et al., 2012).

A determinação do perfil epigenético global e em especial em genes específicos durante o desenvolvimento tumoral nos possibilita uma melhor compreensão molecular da doença, possibilitando assim a longo prazo um diagnóstico preciso e personalizado, assim como o desenvolvimento de terapias moleculares mais eficazes. Neste sentido nossos resultados são promissores e contribuem com achados inéditos que com certeza irão contribuir para a melhor compreensão da teoria de campo de cancerização. Com a conclusão das análises referentes a metilação em gene específico, nossos resultados mostraram que além das alterações globais apresentadas anteriormente, a exposição aos fatores químicos tumorais promoveu importantes alterações no *status* de metilação da região promotora do gene *TP73*. Estudos anteriores já haviam demonstrado a existência de alterações genômicas em epitélios histologicamente normais adjacentes aos carcinomas orais, como mutações e ou deleções no gene *TP53* (Raimondi et al., 2005), no entanto alterações epigenéticas promovidas por fatores químicos tumorais a células normais em gene específico são inovadoras. Embora muito conhecimento tenha sido produzido acerca do envolvimento destas alterações genéticas no desenvolvimento do câncer bucal, o mecanismo de carcinogênese ela associado e a influencia de outros fatores genéticos não estão completamente elucidados e muitas lacunas ainda necessitam serem preenchidas. Assim, os resultados obtidos neste estudo nos levam a acreditar que os fatores químicos produzidos pelas células tumorais podem contribuir para as alterações moleculares observadas nas células adjacentes e talvez este seja um dos mecanismos

responsáveis pelo aparecimento de tumores em outras regiões, explicando pelo menos em parte fenômeno denominado “campo de cancerização”.

7. CONCLUSÕES

1. Os resultados obtidos pela padronização do modelo de exposição ao meio condicionado revelaram redução na viabilidade celular de forma tempo e concentração-dependentes quando comparado ao meio DMEM novo, no entanto os resultados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos meio condicionados tumorais versus meio condicionado pela própria célula;
2. A análise da comparação do *status* de metilação da região LINE-1 e do perfil de metilação global da DNA entre células normais e tumorais revelaram que as linhagens SCC4, SCC9 e KB apresentam hipometilação tanto da região LINE-1, apenas a linhagem SCC15 apresentou hipometilação para região LINE-1 e hipermetilação global quando comparadas as células normais;
3. Avaliação do perfil de metilação do marcador LINE-1 (*Long Interspersed Nucleotide Element 1*) pela metodologia COBRA revelou alterações significativas da porcentagem de metilação para os diferentes tipos de meio condicionado, no entanto as diferenças foram observadas somente após 72 e 96 h de exposição;
4. A avaliação do perfil de metilação global do DNA revelou alterações significativas no perfil de metilação global, sendo observados eventos de hipo- e hipermetilação nos diferentes períodos;
5. A avaliação do *status* de metilação da região promotora do gene *TP73* pela metodologia COBRA revelou alterações significativas no *status* de metilação da região promotora deste gene.

REFERÊNCIAS

- Akrish S, Buchner A, Dayan D (2004). Oral cancer: diagnostic options as an aid to histology in order to predict patients at high risk for malignant transformation. *Refuat. Hapeh. Vehashinayim*. 21: 6-15.
- Almeida VL, Leitão A, Reina LCB, Montanari CA, Donnici CL, Lopes MTP (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celulares não específicos que interagem como DNA: uma introdução. *Química Nova*. 28: 118-129.
- Blomberg M, Nielsen A, Munk C (2011). Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*. 129: 733-741.
- Bordini PJ, Grosso SFB, Costa SC (2007). Câncer Bucal, Lesões e Condições Cancerizáveis. In: Kignel S. *Estomatologia: bases do diagnóstico para o clínico geral*. São Paulo: Santos; p. 331-357.
- Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004). Genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J. Oral Pathol*. 33: 317-322.
- Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK. (2002). Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Hum Pathol*. 33: 158-164.
- Comb M, Goodman H M (1990). CpG Methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcriptional factor AP-2. *Nucleic Acids Res*. 18: 3975-3982.
- Costanzo A, Merlo P, Pediconi N, Fulco M, Sartorelli V, Cole PA, Fontemaggi G, Fanciulli M, Schiltz L, Blandino G, Balsano C, Levrero M. (2002). DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol. Cell*, 9: 175-186.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (2000). *Pathologic bases of disease*. 6 ed. Philadelphia: Saunders, p.1425.
- De Laurenzi V, Melino G. (2000). Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 926: 90-100.
- De Silva IU, Mchugh PJ, Clingen PH, Hartley JA (2000). Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Molec. Cell*. 20: 7980-7990.

- Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. (2004). Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 70: 35-40.
- Egger G, Liang G, Aparicio A et al. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 429: 457-463.
- Esteller M (2006a). Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br. J. Cancer.* 94: 179-183.
- Esteller M (2006b). The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 27: 1121-1125.
- Faridoni-Laurens L, Bosq J, Janot F, Vayssade M, Le Bihan ML, Kaghad M, Caput D, Bénard J, Ahomadegbe JC. (2001). P73 expression in basal layers of head and neck squamous epithelium: a role in differentiation and carcinogenesis in concert with p53 and p63? *Oncogene.* 20: 5302-5312.
- Gonzalez-Cano L, Hillje AL, Fuertes-Alvarez S, Marques MM, Blanch A, Ian RW, Irwin MS, Schwamborn JC, Marín MC. (2013). Regulatory feedback loop between TP73 and TRIM32. *Cell Death Dis.* 4: 704.
- Grabenbauer GG, Suckorada O, Niedobitek G, Rödel F, Iro H, Sauer R, Rödel C, Schultze-Mosgau S, Distel L (2003). Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Oncol.* 39: 459-469.
- Guerra MR, Moura Gallo CV, Silva Mendonça GA. (2005). Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 51: 227-234.
- Hong WK (1987). Multiple primary squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am. J. Clin. Oncol.* 10: 182-183.
- Jirtle RL, Skinner MK (2007). Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat. Rev. Genet.* 4: 253-262.
- Jones PA, Liang G. (2011). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 10: 805-811.
- Kitkumthorn N, Keelawat S, Rattanatanyong P, Mutirangura A (2012). LINE-1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 13: 4469-4475.

- Kitkumthorn N, Mutirangura A (2011). Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. Clin. Epigenetics. 2: 315-330.
- Lange NE, Sordillo J, Tarantini L, Bollati V, Sparrow D, Vokonas P, Zanobetti A, Schwartz J, Baccarelli A, Litonjua AA, Demeo DL (2012). Alu and LINE-1 methylation and lung function in the normative ageing study. BMJ Open. 2: e001231.
- Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL (2008). Câncer Bucal e Cuidados com o Paciente Oncológico. *In*: Manejo Odontológico do Paciente Clinicamente Comprometido. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier: 415-441.
- Ma L, Wagner J, Rice JJ, Hu W, Levine AJ, Stolovitzky GA. (2005). A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 14266-14271.
- Macaluso M, Paggi MG, Giordano A. (2003). Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. Oncogene. 22: 6472-6478.
- Mehrotra R, Yadav S (2006). Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. Indian J. Cancer 43: 60-66.
- Michelle Miranda Lopes Falcão MML, Técia Daltro Borges Aalves TDB, Freitas VS, Coelho TCB. (20014). Conhecimento dos cirurgiões-dentistas em relação ao câncer bucal. RGO. 58: 27-33.
- Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional De Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2010.
- Ministério da Saúde. Estimativa 2013: Incidência de câncer no Brasil. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional De Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2013.
- Moll UM, Petrenko O. (2003). The MDM2-p53 interaction. Mol Cancer Res. 1: 1001-1008.
- Mork J (1998). Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway – no goodnews. Anticancer Res. 18: 3705-3708.
- Mulero-Navarro S, Esteller M (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 68: 1-11.
- Mulero-Navarro S, Esteller M (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 68: 1-11.

- Nan X, Ng H H, Johnson C A, Laherty C D, Turner B M, Eisenman R N et al. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCp2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*. 393: 386-389.
- Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D (1996). Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 54: 949-954.
- Patchesung M, Boonla C, Amnattrakul P, Dissayabutra T, Mutirangura A, Tosukhowong P (2012). Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation and oxidative stress: correlation and bladder cancer diagnostic potential. *PLoS One*. 7: 37009.
- Raimondi A, Cabrini R, Itoiz ME (2005). Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J. Oral Pathol. Med.* 34: 227-231.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate L, Barrios M, Castillejo JA, Navarro G, Colomer D, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2005). Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 24: 7213-7223.
- Rothhammer T, Bosserhoff AK. (2007). Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* 20: 92-111.
- Rubin H (2011). Fields and field cancerization: the preneoplastic origins of cancer: asymptomatic hyperplastic fields are precursors of neoplasia, and their progression to tumors can be tracked by saturation density in culture. *Bioessays*. 33: 224-231.
- Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP (1997). Epithelial disorders. In: *Contemporary Oral and Maxillofacial Pathology*. 1.ed. St. Louis: Mosby, p.174-182.
- Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M (2005). DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J. Cell. Physiol.* 204: 21-35.
- Slaughter D, Southwick H, Smejkal W (1953). "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: Clinical Implications of Multicentric Origin. *Cancer* 6: 963-968.
- Tan LKS, Ogden GR (1997). p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncology*. 33: 177-181.
- Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R (2004). Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug. Resist. Updat.* 7: 267-278.

- Tost J (2010). DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol. Biotechnol.* 44: 71-81.
- Tsuchiya K, Shirato H, Nishioka T, Yamazaki A, Hashimoto S, Kagei K, Oomori K, Yasuda M, Shindo M, Miyasaka K (2001). Pretreatment apoptotic scores do not predict response to radiation therapy in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 37: 159-163.
- Venturi BRM, Cabral MG, Lourenço SQC (2004). Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 70: 385-392.
- Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. (2002). Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 99: 22-28.
- Wood NK, Goaz PW (1997). Differential diagnosis of oral and maxillofacial lesions. 5.ed. St. Louis: Mosby, p.656.
- Worsham MJ (2011). Identifying the risk factors for late-stage head and neck cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 11:13.
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F.(1998). P63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell.* 2: 305-316.
- Yang H, Lu X, Qian J, Xu F, Hu Y, Yu Y, Bast RC, Li J. (2010). Imprinted tumor suppressor gene ARHI induces apoptosis correlated with changes in DNA methylation in pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep.* 3: 581-587.



VISUALIZAÇÃO DE DESPACHO

Processo 2012/19008-9
Linha de Fomento Programas Regulares / Bolsas / No Reg / Iniciação Científica - Fluxo Continuo
Situação Encerrado
Vigência 01/08/2013 a 31/07/2014
Beneficiário Louyse Viotto Corralho
Responsável Rodrigo Augusto da Silva
Vínculo
Institucional do Processo Faculdade de Odontologia de Piracicaba/FOP/UNICAMP

Folha de Despacho

Datas do Despacho

Emitido em 18/09/2014

Objetos de análise

Objeto de análise	Data de Submissão	Resultado
Relatório Científico 2	18/08/2014	Aprovado

Observações / Transcrições / Frases

Observações ao Responsável

Comunicamos que o Relatório Científico relativo ao processo acima referido foi analisado pela assessoria científica da FAPESP.

A transcrição do parecer está sendo enviada exclusivamente ao orientador, sendo de sua responsabilidade compartilhar as partes que considerar relevantes com o bolsista, o qual receberá uma cópia desta mensagem.

Para visualizar o parecer, por favor, acesse o Sistema SAGe (www.fapesp.br/sage), clique no menu Processos/Meus Processos e em Mais Informações/Despachos.

Atenciosamente,

Carlos Henrique de Brito Cruz
Diretor Científico da FAPESP

Frases para o Responsável

Não há frases associadas.

Transcrição de Parecer para o Responsável

Parecer da Relatária Científica

Por favor, emita o parecer, comentários, críticas e sugestões.

O projeto possui resultados interessantes, foi bem conduzido. No entanto, para estudos futuros a linhagem KB não deverá ser utilizada. Essa linhagem possui contaminação cruzada com a linhagem HELA, e não existe nenhuma garantia que a mesma represente com fidelidade o carcinoma-epidermóide oral. Os autores devem consultar revisão de Marc Lacroix, intitulada "Persistent use of 'false' cell lines" publicada no Int. J. Cancer 122: 1-4, 2008, demonstrando o uso persistente de linhagens celulares com contaminação cruzada.

Avaliação

28/09/2018

SAGE - Sistema de Apoio à Gestão

Etapas cumpridas no relatório apresentado

- ☐ Ótimo
☒ Bom
☐ Regular
☐ Fraco

Em relação à proposta inicial os resultados obtidos estão:

- ☐ Acima das expectativas
☒ Dentro das expectativas
☐ Aquém das expectativas
☐ Muito aquém das expectativas

Frases para Termo de Outorga*Não há frases associadas.***Relatório Científico 2 (Aprovado)**

Compromisso	10/08/2014
Período Relacionado	10/01/2014 a 31/07/2014
Situação	Atendido