

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA, BIOQUÍMICA E  
MOLECULAR**

**Avaliação do nível de expressão de *MAGE A1* e  
*BORIS* e do perfil de metilação em carcinoma de  
células escamosas bucal**

**CLÁUDIA MARIA PEREIRA**

**Belo Horizonte**

**2011**

**Avaliação do nível de expressão de *MAGE A1* e  
*BORIS* e do perfil de metilação em carcinoma de  
células escamosas bucal**

**CLÁUDIA MARIA PEREIRA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas:  
Farmacologia, Bioquímica e Molecular da  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial para a obtenção do título de  
Doutora em Farmacologia, Bioquímica e  
Molecular**

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez**

**Belo Horizonte**

**Minas Gerais**

**2011**

P436a Pereira, Cláudia Maria.  
Avaliação do nível de expressão de MAGE A1 e BORIS e do perfil de metilação em carcinoma de células escamosas bucal [manuscrito]. / Cláudia Maria Pereira. -- Belo Horizonte: 2011.  
119f.: il.  
Orientador: Ricardo Santiago Gomez.  
Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Carcinoma de Células Escamosas/terapia. 2. Antígenos de Neoplasias. 3. Neoplasias Bucais. 4. Vacinas Anti-Cancer. 5. Imunoistoquímica. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WU 280

**“Cuidado com o que você pede e deseja;  
Você pode conseguir”**

*Autor Desconhecido*

## DEDICATÓRIA

Dedico a minha dissertação primeiramente a Deus e à Nossa Senhora, que estiveram sempre ao meu lado, me direcionando e protegendo durante toda esta jornada.

Dedico também aos meus pais Eure e Célia, pelo apoio, amor e carinho.

Dedico aos meus irmãos (Antônio, Fernando, Carlos, Roberto e Caio), aos meus sobrinhos (Ludmila, Angelina, Matheus, Mariana, Pedro, Marcos e Giovanna) e às minhas cunhadas (Carla, Inês, Mônica e Glaura), que mesmo distantes, estiveram sempre presentes me apoiando e me incentivando.

Dedico ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez por confiar e acreditar em mim durante estes anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Dr. Ricardo Santiago Gomez por ter me acompanhado desde o mestrado, por ter me dado a oportunidade de fazer parte de sua equipe em meu doutorado e por permitir meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço à Secretaria de pós-graduação do Curso de Medicina Molecular na pessoa do Prof. Luiz Armando e da Sra. Sônia, por estarem atentos às necessidades dos alunos, pela presteza e pelo incentivo.

Agradeço ao meu amigo João Artur por sua ajuda, por seu apoio, por seu carinho e pelas brincadeiras no laboratório.

Agradeço à amiga Ana Carolina pelo convívio, pela amizade, pela sua franqueza e pelas nossas conversas na hora do café.

Agradeço à amiga Profa. Vanessa pelos momentos que passamos juntos, trabalhando, nos divertindo e pela enorme ajuda na reta final de conclusão do trabalho.

Agradeço à amiga Marina pela troca de idéias, pelo seu auxílio e pela paciência para comigo nos experimentos de seqüenciamento.

Agradeço à amiga Clarice pela sua delicadeza, presteza, pela sua amizade e pela sua simpatia.

Agradeço ao colega Prof. Fabrício Rezende pela amizade, pelas brincadeiras e pelo companheirismo.

Agradeço à minha amiga Profa. Jeane por ter sido a primeira pessoa a me receber no laboratório com os braços abertos e com um sorriso no rosto. Por ter me ensinado a trilhar os caminhos da imunistoquímica. Por ter compartilhado comigo momentos de felicidades e tristeza.

Agradeço à minha linda amiga e “filha” Telma (mamãe tem muito orgulho!) por ter sido uma grande companheira de trabalho, de guerra (porque é brava a menina!) e de bandejão. Agradeço a bondade em dividir suas minúsculas gavetinhas comigo e pelo seu carinho!

Agradeço a minha amiga Renata, pelos momentos bons, pelos momentos difíceis e por ser um exemplo de trabalho e dedicação. E por ter me ensinado a fazer uma coisa que era contrária a minha religião: fazer um gel de poliacrilamida deitado!

Agradeço a minha amiga Elizete Maria Pereira, que pelo fato de ter o mesmo sobrenome que eu (do clã das “Maria Pereira”) acabou, se tornou a minha sombra. Pessoa amiga, companheira e de confiança. Presente ao meu lado no trabalho e no batuque. Sempre sorrindo com seus 42 dentes a todo o momento (estão incluídos os quatro molares que já desaparecerem durante a evolução da humanidade).

Agradeço à minha amiga Lucyana, garota boa e inocente ( que acreditou em tudo que eu disse para ela todos nesses anos) pela sua integridade, grande ajuda e amizade.

Agradeço à amiga Kelma, companheira nos momentos difíceis, sincera, educada, cabeça boa para seguir e excelente para bater papo.

Agradeço ao amigo Thiago, camarada doido, companheiro de bagunça, que me atazanou demais nestes últimos meses, mas me deu um enorme apoio na etapa final da pesquisa.

Agradeço à Profa. Paula Rocha que me recebeu com muito carinho no laboratório (apesar do pé atrás com ela no primeiro dia), que me ensinou novos protocolos de pesquisa, que foi minha companheira e amiga para as horas difíceis.

Agradeço à minha amiguinha “garota *overnight*” Florença por ter podido desfrutar de sua companhia nos muitos sábados e domingos que passamos trabalhando sozinhas no laboratório. Agradeço-lhe pela sua amizade, sinceridade e delicadeza.

Agradeço à Profa. Mônica Bucciarelli Rodriguez pelo seu enorme carinho, pelo seu valioso apoio durante a pesquisa, por ter me cedido seu laboratório e seu conhecimento ajudando-me a superar uma etapa difícil da minha pesquisa.

Agradeço ao Prof. Vagner Santos pelo carinho, pela sua gentileza e por permitir o desenvolvimento de parte dos experimentos em seus laboratórios.

Agradeço aos ICs do laboratório de Genética de Microorganismos Thiago, Alisson, Luiz, Talysson e Patrícia que me ajudaram muitíssimo na produção de bactérias competentes e pela amizade sincera.

Agradeço à IC Nayara pela sua imensa ajuda nos meus experimentos, pelo seu grande carinho, sua bondade, presteza e por ter me adotado como “mãe” apesar de já ter um “pai”.

Agradeço aos ICs do laboratório de Patologia Molecular Alessandra, Leonardo, Ígor, Paula Serelle e Marcela por terem abandonado seus respectivos “pais” e “mães” do laboratório e me ajudarem em minha pesquisa.



Agradeço à Profa. Carolina Cavaliere Gomes por ter me dedicado muitas horas de laboratório ajudando nos experimentos de imunistoquímica e sequenciamento, por ter tornado algumas (eu disse algumas) vezes os experimentos mais relaxantes com momentos de descontração, pela festa de aniversário e pelo carinho.

Agradeço aos colegas Fabiano Cardoso, Vladimir, Mariana, Augusto, Fred, Giovanna, Sílvia, Patrícia, Dani Cotta, Fabrício, Janine, Alfonso e Tálita pela amizade e pelas boas conversas na cantina.

Agradeço às funcionárias Daniele, Heloísa, Inês e Silvana por terem me ajudado todo esse tempo em que desenvolvi minha pesquisa, com contribuições imensuráveis e pelo carinho.

Agradeço ao Prof. Wagner Castro e ao Prof. Luis César da FOUFGM e ao Dr. Alvimar Afonso Barbosa do Hospital Luxemburgo por permitirem a coleta das amostras.

Agradeço à Faculdade de Odontologia da UFGM pela oportunidade de desenvolver a minha pesquisa e a toda sua equipe da pós-graduação, a citar as funcionárias Beth e Zuleica, pelo convívio diário e pela atenção dedicada a mim.

Agradeço a Profa. Tarcília por todas as oportunidades que me concedeu durante este período e por seu carinho a mim dedicado.

Agradeço às minhas amigas de república Jessica e a Camila por terem me acolhido de maneira tão carinhosa, no momento em que muito precisei, pelas nossas conversas, pelas nossas saídas e inúmeros pães de queijo.

Agradeço ao Dr. André Vettore da UNIFESP por ter cedido seu laboratório para meus experimentos e à sua aluna de doutorado Ana Carolina, pela sua amizade, carinho e dedicação.

Agradeço à minha afilhada Renata Lopes Gomes por sua ajuda mesmo de longe, pelo seu carinho e por sua enorme alegria.

Agradeço ao Prof. Leandro Napier de Souza que me incentivou a perseverar na carreira acadêmica.

Agradeço aos Profs. Jeane de Fátima Correia silva, Fabrício Rezende Amaral e Paula Rocha Moreira componentes da Banca de Qualificação pelo tempo atribuído à leitura da minha tese e pelas sugestões que ajudaram muitíssimo na finalização deste trabalho.

Agradeço aos membros da Banca Julgadora da Tese pelo tempo atribuído à leitura desta tese e pela gentileza ao aceitar o convite.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a FAPEMIG pela bolsa de estudos a mim concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço à Santíssima Trindade, à minha querida Mãe Maria e aos meus queridos Santinhos Antônio de Pádua, Frei Galvão, Rita e Terezinha por me apoiarem em todos os momentos e me socorrerem quando a saúde me faltou.

Agradeço aos meus pais, pois o que eu sou e o que eu tenho, devo exclusivamente aos dois: saúde para trabalhar, inteligência para estudar, honestidade e responsabilidade para com as minhas obrigações e amor e lealdade aos meus familiares e amigos.

Agradeço aos meus cinco irmãos e às suas respectivas famílias pelo amor, carinho e pelo apoio financeiro, sem o qual eu não conseguiria completar essa jornada e atingir novas fronteiras.

Agradeço à minha querida Tia Santinha por toda a sua humildade e bondade e por ter sofrido comigo nos momentos difíceis em que atravessei durante minha pesquisa.

Agradeço à minha querida de doutorado que deixou saudades Carla Renata (*in memorian*) pela sua preciosa ajuda, por sua alegria e pelo seu carinho.

Agradeço à D. Maria José e à D. Eni, por me proporcionarem saúde e proteção, me acolhendo como se fosse uma filha.

## RESUMO

Pereira CM. **Avaliação do nível de expressão de *MAGE A1* e *BORIS* e do perfil de metilação em carcinoma de células escamosas bucal.** Belo Horizonte; 2011. [Tese de Doutorado-Universidade Federal de Minas Gerais]

Apesar dos avanços no tratamento do carcinoma de células escamosas de boca (CCEB), não houve melhora significativa na taxa sobrevida de cinco anos, situada em torno dos 50%, nas últimas décadas. Diante destes dados, a busca por novas formas de terapia para o CCEB tem se tornado necessária. Antígenos Câncer-Testículo (CTAs) são antígenos cuja expressão está limitada às células germinativas e a vários tipos de câncer. Em virtude do seu potencial imunogênico, os CTAs são considerados moléculas-alvo promissoras para o desenvolvimento de vacinas contra o câncer. Abordagens imunoterapêuticas têm ganhado interesse no tratamento do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão de *MAGE A1* e *BORIS* em amostras de CCEB e investigar a associação da hipometilação com este evento. Os níveis de expressão de *MAGE A1* e *BORIS* foram investigados através de PCR em tempo real em 15 amostras de CCEB primários, comparados com 10 amostras normais. Os nossos dados mostram que estes genes estavam ausentes e/ou fracamente expressos nas amostras normais e tumorais avaliadas. Subsequentemente a expressão gênica foi avaliada através de PCR convencional em 20 amostras de CCEB e 10 amostras de mucosa normal. Semelhante aos resultados da PCR em tempo real esses genes apresentaram baixa e/ou ausência de expressão nas amostras avaliadas. O seqüenciamento pós-bissulfito revelou um nível de hipometilação presente na ilha CpG de *MAGE A1* (~23%) em amostras de CCEB, semelhante ao encontrado na mucosa normal. Na avaliação por imunistoquímica a proteína *MAGE A1* foi detectada em 80% das amostras

de CCEB avaliadas, mas não foi detectada nas amostras de mucosas normais; e a proteína *BORIS* foi detectada em 100% das amostras de CCEB e nas mucosas normais. Embora não se tenha detectado a presença de transcritos de *MAGE A1* e *BORIS* no CCEB, as proteínas destes genes foram detectadas nestas amostras. A presença de variantes *splice* de *MAGE A1* e *BORIS* pode explicar este achado.

## SUMMARY

Pereira CM. ***MAGE A1* and *BORIS* expression level and methylation profile evaluation in oral squamous cell carcinoma.** Belo Horizonte; 2011. [Tese de Doutorado-Universidade Federal de Minas Gerais]

Despite the advances in the treatment management of Oral squamous Cell Carcinoma (OSCC) there has not been a significant improvement in the 5 years survival rate, of which is about 50%, in the last decades. In the light of these data the search towards novel therapies for OSCC has become necessary. Cancer Testis Antigens (CTA's) are antigens whose expression is limited to germ cells and to several types of cancer. Due to their immunogenic potential, the CTA's are considered promising targets molecules for cancer vaccines development. Immunotherapeutic approaches have gained interest in the head and neck squamous cell carcinoma treatment. The aim of this project is to evaluate *MAGE A1* and *BORIS* expression in OSCC samples and to investigate the association of hypomethylation with this event. The expression levels of *MAGE A1* and *BORIS* were investigated by real time PCR in 15 primary OSCC patient samples compared to 10 normal samples. Our data show that these genes were absent and/or underexpressed in normal and tumor evaluated samples. Subsequently the gene expression was evaluated through conventional PCR in 20 primary OSCC samples and 10 normal mucosal samples. Similar to the real time PCR results, these genes were absent and/or underexpressed in all of the evaluated samples. Post Sodium bisulfite sequencing analysis showed a hypomethylation level present on the CpG island of *MAGE A1* (~23%) in CCEB samples similar to those found on normal mucosal samples. In the immunohistochemical evaluation was detected the presence of *MAGE A1* protein in 80% of OSCC samples, but not in normal mucosal samples. *BORIS* protein was detected in 100% of OSCC and normal mucosal samples. Although *MAGE A1* and *BORIS* transcripts have not been detected

in any OSCC samples, the proteins of these genes have been detected in these samples. The presence of splice variants of *MAGE A1* and *BORIS* are capable of explaining this finding.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Fluxograma da abordagem metodológica realizada neste estudo.	20
<b>Figura 2</b>	Gel de poliacrilamida a 15% mostrando a qualidade do RNA extraído.	27
<b>Figura 3</b>	Gel de poliacrilamida a 6,5 % com os produtos de amplificação do fragmento de 330 pb do gene <i>ACTB</i> .	28
<b>Figura 4</b>	<i>Primers</i> usados na reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para <i>BORIS</i> .	32
<b>Figura 5</b>	Avaliação do tratamento com bissulfito de sódio em amostras do grupo experimental.	35
<b>Figura 6</b>	Seqüência de DNA da região promotora do gene <i>MAGE A1</i> .	36
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática da região promotora de <i>MAGE A1</i> .	37
<b>Figura 8</b>	Clonagem de DNA contendo região da ilha CpG de <i>MAGE A1</i> amplificada, utilizando bactérias eletrocompetentes MC1061	40
<b>Figura 9</b>	Gel de poliacrilamida a 6,5% mostrando a amplificação dos DNAs plasmidiais extraídos.	41
<b>Figura 10</b>	Gráfico de amplificação do gene <i>RPLPO</i> em amostras	45



do grupo experimental e em amostras do grupo controle.

- Figura 11** Gráfico de amplificação do gene *MAGE A1* em amostras do grupo experimental e em amostras do grupo controle. 46
- Figura 12** Gráfico de amplificação do gene *BORIS* em amostras do grupo experimental e em amostras do grupo controle. 46
- Figura 13** Avaliação da expressão dos genes *MAGE A1* e *BORIS* em amostras do grupo controle. 48
- Figura 14** Avaliação da expressão dos genes *MAGE A1* e *BORIS* em amostras do grupo experimental. 49
- Figura 15** Avaliação da expressão do gene *MAGE A1* na amostra do grupo experimental 21 (CCE 21) em diferentes ciclos. 50
- Figura 16** Avaliação da expressão do gene *BORIS* em do grupo experimental. 51
- Figura 17** Perfil de metilação da região promotora do gene *MAGE A1* em amostras do grupo controle (16 CpGs no total) 53
- Figura 18** Perfil de metilação da região promotora do gene *MAGE A1* em amostras do grupo experimental (16 CpGs no total). 55
- Figura 19** Cromatograma demonstrando o perfil de metilação 57

encontrado no quinto dinucleotídeo CpG situado na posição -112 da região promotora de *MAGE A1* .

**Figura 20** Análise por imunistoquímica das proteínas MAGE A1 e BORIS em amostras do grupo experimental e do grupo controle

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Sites da <i>internet</i> utilizados na seleção dos genes candidatos.	22
<b>Tabela 2</b>	Informações sobre os CTAs selecionados para o estudo	23
<b>Tabela 3</b>	Informações demográficas sobre os grupos avaliados neste estudo.	25
<b>Tabela 4</b>	<i>Primers</i> utilizados para avaliação na reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional dos genes CTAs analisados neste estudo.	31
<b>Tabela 5</b>	Condições para as reações em cadeia da polimerase (PCR) convencional para cada um dos genes avaliados.	32
<b>Tabela 6</b>	Valores das quantificações dos RNAs das amostras do grupo controle (N) e do grupo experimental (CCE).	44
<b>Tabela 7</b>	Análises de expressão de <i>MAGE A1</i> e <i>BORIS</i>	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5-mC</b>	5-metilcitosina
<b>5-MCDG</b>	5-metilcitosina DNA glicosilase
<b>ACTB</b>	<i>Homo sapiens actin, beta</i>
<b>BSA</b>	Soro Albumina Bovina
<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CCEB</b>	Carcinoma de células escamosas bucal
<b>C</b>	Citosina
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CH<sub>3</sub></b>	radical metil
<b>- COOH</b>	domínio carboxi-terminal
<b>CpG</b>	bases citosina e guanina adjacentes
<b>Ct</b>	<i>threshold cycle</i>
<b>CTA</b>	antígeno câncer-testículo
<b>CTCF</b>	<i>fator de ligação CCCTC</i>
<b>DAB</b>	3-diamino-benzidina
<b>DEPC</b>	dietil pirocarbonato
<b>DTT</b>	<i>DL-Dithiothreitol</i>
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferase
<b>dNTPs</b>	deoxinucleotídeos fosfato
<b>Ets</b>	<i>E-twenty six</i>
<b>F</b>	<i>Foward</i>
<b>FAPEMIG</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

<b>FAM</b>	6-carboxifluoresceína
<b>G</b>	guanina
<b>HDCA</b>	histona deacetilase
<b>HLA</b>	sistema antígeno leucocitário humano
<b>HPV</b>	papiloma vírus humano
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>kV</b>	quilovolts
<b>L</b>	litro
<b>LTC</b>	linfócito T citotóxico
<b>M</b>	molar
<b>µg</b>	micrograma
<b>µM</b>	micromolar
<b>µL</b>	microlitro
<b>mg</b>	miligrama
<b>min</b>	minuto
<b>mL</b>	mililitro
<b>mM</b>	milimolar
<b>mm<sup>3</sup></b>	milímetros cúbicos
<b>MBD2</b>	<i>Methyl CpG binding protein domain 2</i>
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>MGB</b>	<i>minor groove binder</i>
<b>MHC</b>	complexo principal de histocompatibilidade
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>ng</b>	nanograma
<b>- NH3</b>	domínio amino-terminal

<b>NH<sub>4</sub> Ac</b>	acetato de amônio
<b>NM</b>	RefSeqs
<b>ObsCpG/ExpCpG</b>	Relação de CpGs observadas sobre CpGs esperadas
<b>OD</b>	Densidade óptica
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reação em cadeia da polimerase do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>R</b>	<i>Reverse</i>
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>RPLPO</b>	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>
<b>RT-PCR</b>	reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase do inglês <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>SAGE</b>	<i>serial analysis of gene expression</i>
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SAV</b>	<i>SAGE Anatomic Viewer</i>
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>Sp1</b>	<i>Specificity Protein 1</i>
<b>Tm</b>	<i>melting temperature</i>
<b>TBP</b>	<i>TATA box binding protein</i>
<b>TNM</b>	Tumor-Nódulo-Metástase (Sistema de classificação de tumores malignos)
<b>U</b>	Unidade
<b>UCSC</b>	<i>University of California Santa Cruz</i>

<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UNIFESP</b>	Universidade Federal de São Paulo
<b>USA</b>	United States of America

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Câncer Bucal	1
1.2	Hipometilação do DNA e o câncer humano	5
1.3	Antígenos Específicos de Câncer/testículo (CTAs)	9
1.3.1	Descrição dos CTAs	9
1.3.2	CTAs e imunoterapia	11
1.3.3	<i>MAGE A1</i>	12
1.3.4	<i>BORIS</i>	14
1.4	Relação dos CTAs com o Câncer da Região de Cabeça e Pescoço	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1	Fluxograma	20
3.2	Critérios utilizados para a seleção dos genes candidatos	21
3.3	Casuística	24
3.4	Extração de RNA	26
3.5	Síntese de cDNA	27
3.6	Quantificação da Expressão Gênica por Meio de PCR em Tempo Real	29
3.7	PCR convencional	30
3.8	Extração de DNA das amostras e tratamento com bissulfito de sódio	33
3.9	Identificação e desenho de <i>primers</i> para a Ilha CpG de <i>MAGE A1</i>	35



3.10	Clonagem e Sequenciamento	37
3.11	Imunoistoquímica	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>43</b>
4.1	Análise dos RNAs extraídos	43
4.2	Avaliação da expressão gênica	45
4.2.1	Quantificação dos níveis de expressão no grupo experimental e no grupo controle	45
4.2.2	PCR Convencional	47
4.3	Identificação dos CGs Metilados nas Ilhas CpGs na região promotora de <i>MAGE A1</i>	52
4.4	Avaliação da expressão dos genes <i>MAGE A1</i> e <i>BORIS</i> por Imunoistoquímica	58
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>72</b>

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Classificação clínica (TNM) para o câncer de cavidade oral baseada na extensão do tumor primário, na ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância
- Anexo 2** Grupamento de Estádios para o câncer de cavidade oral baseada na classificação clínica (TNM) - extensão do tumor primário, presença ou ausência de comprometimento de linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.

**Anexo 3** Lista de todos os CTAs

**Anexo 4** Ficha de Dados Clínicos – Faculdade de Odontologia (UFMG)

**Anexo 5** Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER BUCAL

O câncer bucal é o sexto tipo de câncer mais comum em todo mundo, com variações epidemiológicas entre as diferentes regiões geográficas (DAS e NAGPAL 2002). As neoplasias que incidem esta região são, em sua maioria, diagnosticadas em estádios avançados da doença, constituindo assim, um grande problema de saúde pública (MASSANO et al. 2006; PARKIN et al. 1993).

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o câncer bucal no ano de 2010, foi apontado como a quinta neoplasia mais comum entre homens no Brasil, contabilizando somente neste gênero cerca de 10.330 novos casos. Para o gênero feminino esta estimativa foi de 3.790 casos, tornando-se a sétima neoplasia mais freqüente entre as mulheres; perfazendo uma proporção homem/mulher de 2,7: 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2009). Cerca de 90% dos cânceres bucais são registrados em indivíduos com idade superior aos 45 anos (SILVERMAN S JR 2001). No entanto, nos últimos anos essa doença também vem sendo diagnosticada em adultos jovens e os fatores de risco relacionados com o aparecimento do câncer bucal nesse grupo de pacientes permanecem desconhecidos (FALAKI et al. 2010; LLEWELLYN et al. 2003; SCHANTZ e YU 2002).

O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico mais freqüente na cavidade bucal, chegando a compreender cerca de 90% de todas as neoplasias desta região (BARASCH et al. 1998).

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) afeta principalmente a língua e o assoalho bucal, podendo também ocorrer em outros sítios anatômicos (AKANUMA et al. 1999; SCULLY e PORTER 2000; SHAH e LYDIATT 1995). Estudo realizado mostrou uma tendência global de incremento na mortalidade por câncer de boca e orofaringe na cidade de São Paulo, sendo que o câncer de língua foi responsável por mais de um terço desses óbitos (BIAZEVIC et al. 2006).

Existe uma forte relação entre o estilo de vida e o CCEB. Os principais fatores de risco apontados são o uso crônico do tabaco e do álcool (SHAH e LYDIATT 1995). A combinação destes dois fatores está associada a cerca de 90% dos casos de CCE de cabeça e pescoço (AKANUMA et al. 1999; KOWALSKI et al. 2005). O uso concomitante de tabaco e álcool pode provocar um aumento de 38 vezes no risco de desenvolver cânceres na região da cabeça e pescoço (ZNAOR et al. 2003; ZYGOGIANNI et al. 2011). No Brasil, o fumo e a ingestão de álcool são citados como os principais agentes determinantes do CCEB, sendo que o risco desta neoplasia devido ao tabagismo é considerado bastante aumentado comparado a estudos similares em outros países (FRANCO et al. 1989).

A presença do papiloma vírus humano (HPV), particularmente o HPV 16 e o HPV18, vem sendo documentada também em CCEs de cabeça e pescoço (ALBERS et al. 2010). Apesar da relação entre o HPV e a etiologia

desta doença, não estar bem estabelecida, a taxa de detecção do HPV de 20-50% em CCEB tem motivado uma série de experimentos com a finalidade de elucidar o papel deste vírus na carcinogênese bucal (CHOCOLATEWALA e CHATURVEDI 2009).

Os cânceres de cabeça e pescoço nos estádios iniciais apresentam discretas manifestações clínicas e sintomatologia, ocasionando um atraso no diagnóstico e uma diminuição na sobrevida (CALIFANO et al. 1996). Alterações visíveis na mucosa podem preceder ao aparecimento do CCEB. Essas alterações podem se apresentar como manchas ou placas, com coloração branca ou avermelhada, denominadas como leucoplasia e eritroplasia, respectivamente (NEVILLE e DAY 2002). A prevenção e o diagnóstico precoce de lesões suspeitas têm o potencial de melhorar os índices de sobrevida de CCEB (NEVILLE e DAY 2002).

O tratamento do CCEB produz frequentemente disfunções e distorções na fala, na mastigação, na deglutição e na saúde dentária (FEDELE 2009). A escolha do tipo de tratamento para os cânceres da cavidade bucal dependerá de alguns fatores, como por exemplo, do estadiamento da doença realizado de acordo com o sistema TNM (Tumor-Nódulo-Metástase) (ANEXOS 1 e 2), do desejo e da tolerância do paciente ao tratamento (NEVILLE e DAY 2002). Atualmente, a modalidade de tratamento padrão-ouro para este tumor é a cirurgia, podendo estar combinada com outros tipos de tratamentos como a radioterapia e quimioterapia (JERJES et al. 2010).

Existe dentre os pacientes portadores de câncer da região da cabeça e pescoço, uma grande heterogeneidade em relação à resposta ao tratamento e ao desfecho desta doença, que pode ser verificada inclusive dentro de grupos classificados com o mesmo estadiamento clínico (LOTHAIRE et al. 2006). Esta realidade vem incentivando a realização de inúmeros trabalhos em pesquisa básica e no estudo do genoma; a fim de possibilitar o aumento do conhecimento em relação às bases biológicas envolvidas com o desenvolvimento e com a progressão do CCE de cabeça e pescoço.

A sobrevida de cinco anos para o CCEB varia de 81% para pacientes com doença localizada na cavidade oral, a 42% para aqueles com doença presente nos linfonodos regionais, caindo para 17% quando metástases à distância estão presentes. Geralmente menos de 50% dos pacientes portadores de câncer de boca e orofaringe sobrevivem por mais de cinco anos (FEDELE 2009). Diante desses dados, a busca por novas terapias para os cânceres que acometem esta região tornou-se necessária, o que vem provocando um grande avanço nos estudos relacionados à imunoterapia (RAPIDIS e WOLF 2009). Já foi demonstrada, por exemplo, uma resposta de reconhecimento às células de CCE de cabeça e pescoço por células-T naturalmente induzida (ALBERS et al. 2010).

De acordo com LOTHAIRE et al. (2006), a identificação de novos marcadores tumorais que possam contribuir para melhorar o prognóstico e a resposta a agentes terapêuticos em pacientes portadores de CCEB tornou-se extremamente necessária.

## 1.2 HIPOMETILAÇÃO DO DNA E O CÂNCER HUMANO

O câncer é um processo bastante complexo, onde verificamos o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que possibilitam a transformação de uma célula normal em uma célula invasiva ou metastática (RODENHISER e MANN 2006).

Dentre as pesquisas epigenéticas, uma importância muito grande vem sendo atribuída à detecção da presença da hipermetilação em diversos tipos de tumores (HERMAN e BAYLIN 2000), porém pouca atenção tem sido dada ao estudo da diminuição do nível de metilação, ou hipometilação, na carcinogênese (EHRlich 2002).

A metilação é um evento epigenético freqüente, que ocorre através da adição de um radical metil ( $-CH_3$ ) a uma citosina (C) situada na posição 5' de uma guanina (G) em dinucleotídeos CpGs, no DNA de células eucarióticas superiores (BAYLIN 2005; JONES e BAYLIN 2002). Existem no genoma humano as chamadas "ilhas CpGs", que são regiões ricas de dinucleotídeos CpGs. Estas podem abranger de 0,5 a 4 Kb e correspondem de 1% a 2% do genoma total (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987). Desde a embriogênese o padrão de metilação já é estabelecido, sendo estritamente controlado durante o desenvolvimento do organismo. É um processo biológico extremamente importante e sua presença está relacionada ao silenciamento genético (ATTWOOD et al. 2002).

Em células normais, a regulação da expressão de determinados genes é feita através da metilação, podendo ser exemplificada pela

inativação de um dos cromossomos X em células somáticas femininas e pelo *imprinting* genômico (o silenciamento de alelos cromossômicos herdados de um dos pais) (ATTWOOD et al. 2002). As enzimas responsáveis pela metilação da citosina pertencem à família de enzimas denominadas de DNA metiltransferases (DNMTs) e são denominadas DNMT1, DNMT2 e DNMT3 (JONES e BAYLIN 2002; SINGAL e GINDER 1999).

A metilação aberrante, também denominada de hipermetilação, tem como alvos mais freqüentes as ilhas CpGs que se encontram localizadas nas regiões promotoras dos genes (VISWANATHAN et al. 2003). A hipermetilação destas ilhas CpGs pode reprimir de forma eficiente a transcrição de um determinado gene. Entretanto, têm sido observadas perdas globais dos níveis de metilação em vários tipos de cânceres, evento esse que pode inclusive, levar à expressão de proto-oncogenes (CHALITCHAGORN et al. 2004).

A hipermetilação presente na região promotora de genes supressores tumorais, tem se mostrado como uma grande promessa na identificação de biomarcadores implicados na carcinogênese de cabeça e pescoço (SMITH et al. 2007). Uma investigação da presença de hipometilação global em CCE de cabeça e pescoço, utilizando o método de pirosequenciamento, conseguiu demonstrar em 67% das amostras tumorais analisadas, um grau de hipometilação global superior ao das amostras normais.



De acordo com GAMA-SOSA et al. (1983), a hipometilação do DNA em câncer afeta mais freqüentemente o genoma do que a hipermetilação, porém, a significância biológica deste mecanismo ainda é muito pouco compreendida (EHRlich 2002).

A hipometilação tem sido observada em uma grande variedade de neoplasias malignas humanas, como por exemplo: tumores de próstata, útero, fígado e ovário (BEDFORD e VAN HELDEN 1987; FOWLER et al. 1998; LIN et al. 2001; WOLOSZYNSKA-READ et al. 2007). Foi demonstrado que em determinados tipos de cânceres, existe uma relação entre a presença de hipometilação e o aumento progressivo no grau de malignidade (EHRlich 2002). A hipometilação pode contribuir com a carcinogênese através de diferentes mecanismos, como por exemplo: indução à instabilidade cromossômica, reativação de *transposons* e através da perda do *imprinting* (ESTELLER 2005).

Os mecanismos responsáveis pela desmetilação do genoma ainda não foram completamente estabelecidos (ATTWOOD et al. 2002; KISSELJOVA e KISSELJOV 2005). Para alguns autores, não somente um, mas vários mecanismos podem ser responsáveis por esta desmetilação do DNA (POGRIBNY e BELAND 2009).

Para KISSELJOVA e KISSELJOV (2005) a hipometilação pode se tratar de um processo passivo, resultado da falta de atividade da DNMT1 ou do doador de grupos metil a S-adenosilmetionina (SAM). A SAM é um doador metil utilizado em processos biológicos de metilação (CHOI et al. 1999). Outra proposta seria de que a hipometilação seria resultado de um

processo enzimático (BHATTACHARYA et al. 1999; JOST 1993; KISSELJOVA e KISSELJOV 2005; PATRA et al. 2008) onde a 5-metilcitosina DNA glicosilase (5-MCDG) seria capaz de remover dinucleotídeos CpGs metilados através do mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (JOST 1993). E por último, outra provável responsável pela desmetilação global do DNA seria a proteína 2 com domínio de ligação à metil-CpG (MBD2 - *Methyl-CpG-binding domain protein 2*) (KISSELJOVA e KISSELJOV 2005), cuja atividade está na capacidade de reconhecer os dinucleotídeos CpGs metilados e de catalisar a clivagem destes (BHATTACHARYA et al. 1999).

Fatores ambientais, químicos, nutricionais, bem como a utilização de tabaco e álcool estariam associados com uma inibição da expressão das DNMTs contribuindo para a desmetilação do DNA (DAS e SINGAL 2004; POGRIBNY e BELAND 2009), sendo essas alterações observadas em CCE de cabeça e pescoço (SMITH et al. 2007). A utilização do tabaco e do álcool afeta a via da vitamina B12 que é importante para a síntese da SAM (GABRIEL et al. 2006; SMITH et al. 2007). Outro fator, associado à diminuição da metilação genômica, seria a interrupção do metabolismo de folato, pelo fato deste estar envolvido na síntese de nucleotídeos e também na síntese da SAM (CHOI et al. 1999).

Diversos genes associados aos tumores e à proliferação celular têm sido descritos como hipometilados em cânceres humanos (EHRlich 2002). A citar, os antígenos específicos de câncer/testículo (CTAs), que são marcadores tumorais com expressão gênica relacionada às células

germinativas e a diversos tipos de cânceres. Estes genes incluem diversos membros, como as famílias *MAGE*, *LAGE* e *GAGE*, cujas expressões já foram estudadas em diversos tipos de tumores inclusive em CCE de cabeça e pescoço (EHRlich 2002; FIGUEIREDO et al. 2006; KIENSTRA et al. 2003).

### **1.3 ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE CÂNCER/TESTÍCULO (CTAS)**

#### **1.3.1 Descrição dos CTAs**

Os CTAs constituem uma grande família de genes expressos quase exclusivamente em linhagens germinativas normais humanas e em uma variedade de cânceres humanos (ANDRADE et al. 2008; DADABAYEV et al. 2005).

Os antígenos específicos de câncer/testículo são assim denominados, pelo fato de suas proteínas terem sido identificadas em células germinativas dos testículos (VAN et al. 1999). A expressão dos CTAs também foi identificada em células trofoblásticas da placenta. Exceto por essas duas localizações, os CTAs encontram-se freqüentemente silenciados em tecidos normais (VAN et al. 1999).

O reconhecimento destes antígenos pelo sistema imune se dá através da apresentação de peptídeos derivados dos CTAs presentes nas superfícies das células tumorais pelas moléculas pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade I (MHC I - *major histocompatibility complex I*) (FONSATTI et al. 2003) aos linfócitos CD8<sup>+</sup>. No câncer humano, a

subexpressão do MHCI é uma, dentre várias estratégias de evasão, adotadas para escapar dos mecanismos de detecção efetores do sistema imune (ALGARRA et al. 2004). Entretanto, a explicação da expressão destes genes no testículo e ausência de uma resposta imune contra estes deve-se ao fato da espermatogônia não ser capaz de apresentar peptídeos ao linfócito T citotóxico (LTC) (VAN et al. 1999). Além disso, alguns autores sugerem a presença de uma barreira sangue/testículo, que torna o testículo um sítio privilegiado do ponto de vista imunológico (GHAFOURI-FARD e MODARRESSI 2009).

Cerca de 140 CTAs já foram descritos até o presente momento, estando estes distribuídos em 70 famílias (STEVENSON et al. 2007) que podem conter vários membros e também variantes *splice* (SCANLAN et al. 2004). Alguns CTAs vêm se tornando objetos de constantes pesquisas em tumores, como o *MAGE* (antígeno específico de melanoma), *BAGE* (antígeno melanoma B); *LAGE* (antígeno L), *GAGE* (antígeno G), *PRAME* (antígeno expresso preferencialmente em melanoma); *NY-ESO-1* (carcinoma de células escamosas de esôfago de Nova Iorque), *CT7* (cancer/testículo 7); *Sp17* (proteína auto-antigênica 17 do espermatozóide) e *SSX* (sarcoma sinovial com pontos de quebra no cromossomo X) (SCANLAN et al. 2004).

O silenciamento da expressão dos CTAs em células normais é regulado principalmente pelo mecanismo epigenético da metilação. A transcrição destes genes é inibida pela adição de um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) em sítios específicos da região promotora (DE et al. 1996). A hipometilação do

DNA tem sido descrita como um dos mecanismos responsáveis pela expressão dos CTAs em células cancerígenas (AYYOUB et al. 2004; BEDFORD e VAN HELDEN 1987; DE et al. 1996; ROMAN-GOMEZ et al. 2007).

A função biológica destes genes em células germinativas e tumores ainda não é bem compreendida, entretanto alguns dos CTAs parecem desempenhar um papel crítico no processo de tumorigênese tais como: regulação da transcrição (*SSX* e *BORIS*), transdução de sinais (*LIP1* e *MAGE*), ligação célula-célula (*ADAM2*) e inibição da apoptose (*GAGE*) (CILENSEK et al. 2002; GHAFOURI-FARD e MODARRESSI 2009; LADURON et al. 2004; LOUKINOV et al. 2002; SCANLAN et al. 2002; TURECI et al. 1996).

### **1.3.2 CTAS e Imunoterapia**

As vacinas terapêuticas, utilizadas em cânceres, tem como base a resposta celular. Antígenos que seriam relevantes para a montagem da resposta podem não estar sendo reconhecidos pelo sistema imune do paciente com câncer, dadas as características da doença; gerando assim uma tolerância. Assim muitas abordagens de vacinação terapêutica visa a quebra de tolerância contra o antígeno, usado no processo de vacinação (CHAMMAS et al. 2009).

A expressão de CTAs em células neoplásicas combinada com outros elementos que compõem o complexo de reconhecimento tumoral (ex: antígenos MHC I e moléculas co-estimulatórias) são pré-requisitos

mandatórios para a implementação de estratégias terapêuticas humorais e baseadas em células T em pacientes com câncer (MAIO et al. 2003).

Os CTAs são apontados como bons candidatos à abordagem imunoterapêutica, devido a sua expressão em diversos tumores e pelo fato de sua expressão nas espermatogônias não representar estímulo ao sistema imunológico. Além disso, a resposta à vacina direcionada contra estes antígenos pode ser potencializada com a utilização de drogas moduladoras epigenéticas em células tumorais que apresentam baixa expressão de MHC I (KARPF 2006). Isto porque a hipermetilação é um dos mecanismos que contribui para a baixa expressão de moléculas MHC I em câncer (BUBENIK e VONKA 2003; MAIO et al. 2003).

A expressão dos CTAs nos tecidos, onde normalmente estes antígenos encontrar-se-iam silenciados, coloca estes genes em situação peculiar, de modo a serem considerados antígenos específicos tumorais que poderão ser reconhecidos pelos LTC. Além disso, os produtos destes genes podem ser alvos interessantes no diagnóstico precoce de metástases (DE et al. 1996; VAN et al. 1999).

### **1.3.3 *MAGE A1***

*MAGE A1* foi o primeiro CTA a ser identificado. Essa identificação deu-se através da descoberta de um paciente portador de melanoma que apresentava células T citotóxicas capazes de reconhecer células tumorais autólogas (DE et al. 1994). Um destes antígenos tumorais reconhecidos por estas células T foi nomeado de MZ2-E. Mais tarde, experimentos baseados

em transfecção gênica identificaram o gene que codificava tal antígeno, que passou a receber a denominação de *MAGE A1* (*melanoma associated antigen 1*) (DE et al. 1994; SIMPSON et al. 2005). *MAGE A1* é capaz de codificar um peptídeo capaz de se combinar com a molécula do complexo principal de histocompatibilidade HLA-A1 e formar o antígeno MZ2-E que por sua vez é reconhecido por células T CD8+ autólogas.

Doze genes constituem a família *MAGE A* e estes encontram-se localizados no cromossomo X na região q28. A evolução dos genes desta família é caracterizada por processos que incluem duplicações, mutações pontuais e pequenas deleções/inserções que possivelmente dão origem a uma grande diversidade de isoformas (ARTAMONOVA e GELFAND 2004). Todos os genes *MAGE A* possuem um exon codificante de proteína, precedido por vários exons não codificantes (ARTAMONOVA e GELFAND 2004)

A expressão de *MAGE A1* foi detectada em vários tipos de cânceres como melanomas, mama, CCE de cabeça e pescoço e esôfago; mas não foi identificada em tecidos normais, exceto testículo (FIGUEIREDO et al. 2006; SIMPSON et al. 2005; WEINERT et al. 2009).

Importantes regiões regulatórias estão presentes na região promotora de *MAGE A*, que são as regiões de ligação dos fatores de transcrição da família dos *Ets* e de fatores *Sp1*. Proteínas *Ets* pertencem a uma importante família de fatores de transcrição que controlam a expressão de genes envolvidos em importantes funções celulares (DE et al. 1996). A deleção das regiões *Ets* acarretaria numa diminuição considerável da atividade

promotora de *MAGE A1* (ZHANG et al. 2004), existindo uma forte correlação entre a expressão de *MAGE A1* e a desmetilação dos dinucleotídeos CpGs situados nestas regiões (DE et al. 1996). A presença de metilação nos sítios *Sp1* corresponde a um mecanismo de repressão gênica comum e fisiológico (CAO et al. 2000). Proteínas *Sp1* são fatores de transcrição capazes de ativar ou reprimir a transcrição de vários genes, inclusive os genes constitutivos (TAN e KHACHIGIAN 2009).

Embora não se saiba o real papel dos CTAs, *MAGE A1* já foi descrito como um potente repressor transcricional, pois é capaz de interagir com o fator *SKIP* (envolvido com várias vias de sinalização) através de recrutamento de complexos de histonas deacetilases (HDAC). A repressão transcricional de *SKIP* por *MAGE A1* pode influenciar na expressão gênica de vários promotores gênicos. Sendo assim, *MAGE A1* poderia então estar participando da regulação dos padrões de expressão gênica no crescimento tumoral ou na espermatogênese (LADURON et al. 2004).

#### **1.3.4. *BORIS***

O gene *BORIS* (*brother of regulator of imprinting sites*) apesar de não estar localizado no cromossomo X, foi classificado como um CTA baseado em seu padrão de expressão restrito a tecidos tumorais e espermátócitos no testículo (LOUKINOV et al. 2002; SIMPSON et al. 2005). *BORIS* está localizado na região cromossômica 20q13.2 que está frequentemente amplificada em muitos cânceres, como é o caso de certos genes presentes



nesta região que contribuem para um fenótipo mais agressivo em câncer de mama (TANNER et al. 1994).

Já foi descrito que o gene *BORIS* possui a capacidade de induzir a reprogramação epigenética (LOUKINOV et al. 2002) e também a capacidade de ativar a expressão de outros CTAs (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005). Foram caracterizados três diferentes promotores para o gene *BORIS*, que por sua vez, levavam à transcrição de diferentes tipos de RNAs mensageiros (RNAm). Nesta mesma análise, foi demonstrado que o gene *p53* era capaz de regular negativamente estes três promotores de *BORIS* (RENAUD et al. 2007). Pelo fato de *BORIS* poder induzir a expressão de *MAGE A1*, *-A2* e/ou *-A6*, talvez este gene possa também contribuir indiretamente para a supressão de *p53* (HONG et al. 2005) pelo fato de já ter sido demonstrado que *MAGE A2* é capaz de inibir o gene *p53* (MONTE et al. 2006).

*BORIS* é um parálogo do fator de transcrição *CTCF* (*fator de ligação CCCTC*), que é um regulador importante do *imprinting* genômico (WOLOSZYNSKA-READ et al. 2007). Estes dois genes apresentam uma homologia em relação aos domínios dedos-de-zinco que constituem as suas proteínas, possuindo 74% de identidade (JELINIC et al. 2006). Em virtude desta homologia, os polipetídeos gerados por estes dois genes ligam-se à mesma região do DNA. Entretanto, os seus domínios amino- (NH<sub>3</sub>-) e carboxi-terminais (-COOH) diferem entre si, sugerindo que as proteínas destes dois genes possuam papéis regulatórios opostos (LOUKINOV et al. 2002; RENAUD et al. 2007; VATOLIN et al. 2005).

Estudos têm demonstrado que *BORIS* é capaz de regular a transcrição de outros CTAs como é o caso de *MAGE A1* (VATOLIN et al. 2005) e *NY-ESO-1*(HONG et al. 2005). A expressão de *BORIS* em cânceres humanos pode levar a uma desregulação epigenética, possivelmente pelo fato de *BORIS* provocar uma desorganização dos limites dos protetores da metilação no genoma, que é normalmente imposto por *CTFC* (KLENOVA et al. 2002). Diante deste fato e de sua localização cromossômica, foi sugerido um papel de oncogene para *BORIS* (KLENOVA et al. 2002; WOLOSZYNSKA-READ et al. 2007).

#### **1.4 RELAÇÃO DOS CTAS COM O CÂNCER DA REGIÃO DE CABEÇA E PESCOÇO**

A literatura apresenta alguns estudos que relacionam a presença dos CTAs e o CCE da região de cabeça e pescoço (EURA et al. 1995; FIGUEIREDO et al. 2006; KIENSTRA et al. 2003). Com a finalidade de identificar alvos para a resposta imune neste tipo de câncer, (KIENSTRA et al. 2003) analisaram a presença de três CTAs: o *MAGE-A1*, o *MAGE-A3* e o *NY-ESO-1*. Das 45 amostras tumorais de CCE de cabeça e pescoço avaliadas por este grupo, 27 (60%) mostraram-se positivas através de experimentos de PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional para pelo menos um dos antígenos, indicando uma abordagem em potencial para a imunoterapia.

Outra análise por PCR convencional conseguiu demonstrar a expressão freqüente de CTAs em CCE de cabeça e pescoço, principalmente

naqueles casos de tumores avançados e que tiveram um pior prognóstico, após os pacientes terem sido submetidos a terapias convencionais disponíveis (FIGUEIREDO et al. 2006). De acordo com estes autores, os achados obtidos neste estudo, sugerem que essa população de pacientes poderia ser um alvo potencial para a imunoterapia através da utilização de “vacinas” ou anticorpos direcionados especificamente para essas células tumorais.

As expressões de *genes da família MAGE A* também já foram avaliadas em linhagens celulares de CCEB por imunocitoquímica e PCR em tempo real comparadas a uma linhagem de queratinócitos. Entre as cinco linhagens celulares de CCEB avaliadas, pelo menos uma expressou apenas um CTA, três linhagens expressaram três CTAs e uma expressou cerca de quatro CTAs. Para estes autores, essa simultânea expressão de antígenos *MAGE*, já descrita previamente em outros tipos de cânceres, faz com que seja necessário um conhecimento maior a respeito das funções destes genes, visando entender melhor o papel dos CTAs no curso desta doença e também em seu prognóstico (MULLER-RICHTER et al. 2009).

LEE et al. (1999) decidiram avaliar se a expressão destes genes estaria presente em outros tumores e lesões benignas da região de cabeça e pescoço (ex: displasia, adenoma pleomórfico, hiperplasias, papilomas, etc) por imunohistoquímica. Além disso, estes pesquisadores também investigaram se esta expressão estaria relacionada a algum evento que levasse à transformação destas lesões. Ficou demonstrado neste estudo que nenhum dos tumores benignos apresentava estes genes. Entretanto,

dentre quatro leucoplasias avaliadas, uma que apresentava o diagnóstico histológico de displasia leve, expressava os genes *MAGE A2*, *MAGE A3*, *MAGE A4* e *MAGE A6*. Este fato levou estes autores a concluírem que a expressão destes genes *MAGE A* poderia estar relacionada com o potencial de transformação maligna.

Atualmente, são poucos os estudos que avaliaram a expressão dos CTAs em CCE de cabeça e pescoço e de boca. Até o presente momento, não foi descrita nenhuma análise que relacione o perfil de expressão dos CTAs em amostras de CCEB com o padrão de metilação presente na região promotora dos mesmos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos genes CTAs em CCEB e as possíveis associações com o padrão de metilação.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O estudo proposto avaliou a expressão dos CTAs *MAGE A1* e *BORIS* em amostras de pacientes portadores de CCEB, investigando a possível associação da hipometilação com este evento.

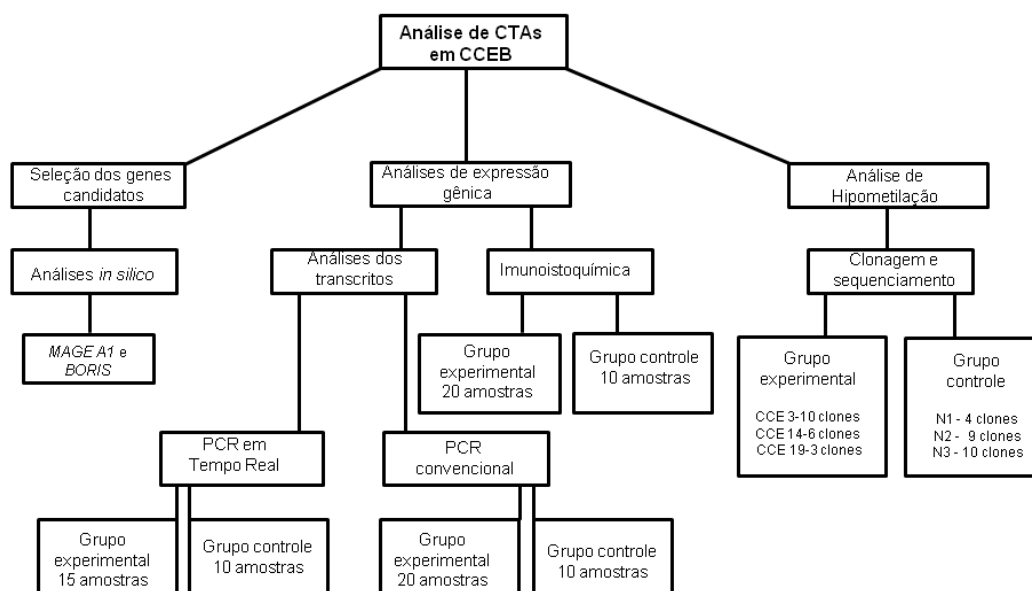
### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificação do nível de expressão de *MAGE A1* e *BORIS* em amostras de CCEB;
- Identificação do nível de hipometilação na região promotora de *MAGE A1* nas amostras de CCEB;
- Investigação da expressão das proteínas relacionadas aos genes selecionados para este estudo, através de imunohistoquímica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 FLUXOGRAMA

Nesta seção estão apresentadas as abordagens empregadas na investigação dos CTAs em CCEB. Na Figura 1, observa-se um esquema das investigações realizadas neste estudo, com a finalidade de atingir os objetivos.



**Figura 1** - Fluxograma da abordagem metodológica realizada neste estudo.

Este trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais recebendo aprovação (ETIC 356/08).

### 3.2 CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA A SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

A fim de selecionar os melhores candidatos para este estudo, foram levados em conta alguns critérios importantes:

- Só foram considerados os genes que já foram correlacionados com o processo de carcinogênese;
- Presença de Ilhas de CpG na região promotora - Utilizando as ferramentas de busca *on line* disponíveis, foram localizadas as ilhas CpGs presentes nas regiões promotoras de todos os genes selecionados obedecendo aos critérios 100pb, %GC >50%, ObsCpG/ExpCpG>0.6.
- Função – Foram analisados os processos biológicos em que as proteínas codificadas pelos genes selecionados estariam envolvidas, se havia descrição em trabalhos anteriores associando a função destes com a carcinogênese (adesão celular, ciclo celular, transdução, transcrição entre outros), informações sobre o nível de expressão destes genes em diversos tipos de cânceres ou uma possível atividade oncogênica.

Para esta análise e obedecendo aos critérios descritos acima, foram utilizadas diversas ferramentas *in silico* que se encontram dispostas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Sites da *internet* utilizados na seleção dos genes candidatos.

<b>Crítérios usados na seleção dos genes</b>	<b>Nome do <i>website</i></b>	<b>Endereço do <i>website</i></b>
<b>Presença de Ilha CpG na região promotora</b>	<i>NCBI Nucleotide</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&amp;cmd=search&amp;term=">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=nucleotide&amp;cmd=search&amp;term=</a>
	<i>UCSC Genome Bioinformatics</i>	<a href="http://www.genome.ucsc.edu">www.genome.ucsc.edu</a>
	<i>Methprimer</i>	<a href="http://www.urogene.org/methprimer/index1.html">http://www.urogene.org/methprimer/index1.html</a>
<b>Informações gerais (funções e processos biológicos)</b>	<i>NCBI GENE</i> <i>NCBI UNIGENE</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&amp;DB=gene</a>
	<i>Gene Ontology</i>	<a href="http://www.geneontology.org/">http://www.geneontology.org/</a>
	<i>Gene Cards</i>	<a href="http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.shtml">http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.shtml</a>
	<i>Source Search</i>	<a href="http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult">http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult</a>
	<i>CTDatabase</i>	<a href="http://www.cta.lncc.br/index.php">http://www.cta.lncc.br/index.php</a>
	<i>USCS Genomic Bioinformatics</i>	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>

Foram selecionados dois genes candidatos para o estudo: o gene *MAGE A1* e o gene *BORIS* (Tabela 2). A lista com todos os genes CTAs encontra-se disposta no Anexo 3.



**Tabela 2** – Informações sobre os CTAs selecionados para o estudo.

CTA	ID	Definição	Localização cromossômica	Ilha CpG (pb)	Expressão em câncer
MAGE A1	NM_004988	<i>Homo sapiens melanoma antigen family A, 1</i>	Xq28	158	melanoma(VAN DER BRUGGEN et al. 1991); pulmão (JANG et al. 2001); cólon, reto e estômago(KIM et al. 2006); cabeça e pescoço (EURA et al. 1995; FIGUEIREDO et al. 2006; LEE et al. 1999) esôfago (WEINERT et al. 2009) e fígado (XIAO et al. 2005).
BORIS	NM_080618	<i>Brother of the regulator of imprinting sites</i>	20q13.2	177	ovário (WOLOSZYNSKA-READ et al. 2007); mama (D'ARCY et al. 2008); esôfago(WEINERT et al. 2009).

CTA : Antígeno Câncer-Testículo; ID: identificação de acordo com o banco de dados RefSeq; pb – pares de base

### 3.3 CASUÍSTICA

O grupo experimental foi constituído por 25 amostras provenientes de pacientes portadores de CCEB primários, que não receberam radio ou quimioterapia prévia, coletadas no Hospital Luxemburgo no período de 2007 a 2009. O grupo controle foi composto por 10 amostras de mucosa bucal normal provenientes de pacientes que não apresentavam nenhuma alteração patológica prévia ou clinicamente diagnosticável e que foram submetidos à cirurgia de remoção de dentes inclusos na Faculdade de Odontologia da UFMG.

As amostras tanto do grupo experimental, quanto do grupo controle, foram colhidas a fresco no momento do ato cirúrgico. Estas amostras foram divididas em duas partes: uma parte destinada à extração de ácidos nucléicos que foi coletada em criotubos contendo RNA *later* e logo após armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e a outra parte coletada em formol a 10% tamponado, destinada à confecção de blocos de parafina para as análises de imunohistoquímica. O diagnóstico de todos os casos foi confirmado por um especialista em patologia bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Das 25 amostras tumorais, 20 amostras foram utilizadas nas análises de imunohistoquímica, 20 amostras nas análises de PCR convencional, 15 amostras nas análises de PCR em tempo real e 3 amostras nas análises por sequenciamento. Vale ressaltar que as amostras avaliadas nestas diferentes técnicas não foram necessariamente as mesmas. Isto porque algumas amostras foram perdidas devido a problemas rotineiros relacionados às

diferentes técnicas (ex: degradação de RNAm, perda do corte de tecido durante a recuperação antigênica, bactérias eletrocompetentes pouco eficientes, etc).

Na Tabela 3, encontram-se dispostas as informações demográficas do grupo experimental e do grupo controle.

**Tabela 3** – Informações demográficas sobre os grupos avaliados neste estudo.

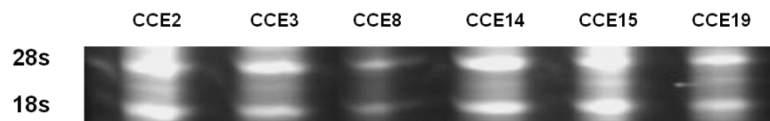
<b>VARIÁVEL</b>	<b>GRUPO EXPERIMENTAL</b>	<b>GRUPO CONTROLE</b>
<b>Número de amostras</b>	20	10
<b>Idade</b>	60,3	22,5
<b>Gênero</b>		
Masculino	70,4%	60%
Feminino	29,6%	40%
<b>Uso de tabaco</b>	81,25%	10%
<b>Uso de álcool</b>	68,7%	0%
<b>Sítio anatômico</b>		
Assoalho	40%	-
Língua	28%	-
Área retromolar	16%	30,76%
Gengiva	12%	30,76%
Palato	4%	7,69%
<b>Estadiamento TNM</b>		
Estadio I	7,7%	-
Estadio II	30,8%	-
Estadio III	23%	-
Estadio IV	38,5%	-

Os dados demográficos dos dois grupos foram levantados através da aplicação de questionários, sendo também obtidas as assinaturas de todos os pacientes em um termo de consentimento pós-informado para a utilização destas amostras (Anexos 4 e 5).

### 3.4 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração dos RNAs totais de 20 amostras do grupo experimental e de 10 amostras do grupo controle foi realizada com o uso do reagente *Tri-Phasis* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com o método do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) modificado. Cada amostra foi homogeneizada com 800µL de *Tri-Phasis* e 10µL de glicogênio (20µg/µL) e em seguida incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Após esta incubação foi adicionado 160µL de clorofórmio e, em seguida, realizada a centrifugação por 5 minutos para separar as fases. A fase superior foi transferida para um tubo, sendo adicionados 800µL de *Tri-Phasis* e 160µL de clorofórmio. Em seguida foi realizada nova centrifugação por 5 minutos para separar as fases. A fase superior foi transferida para um novo tubo e os RNAs foram precipitados pela adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado e incubação à -20°C, *overnight*. Após este período, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 4°C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500µl de etanol 70%. O *pellet* foi seco (10 minutos, temperatura ambiente) e dissolvido em 15µl de água livre de RNAase.

Após a extração, todos os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro Bio-Spec-mini (Shimadzu, Kyoto, Japan). Para avaliação da integridade 1 µg de RNA foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida 15% com 8M de uréia e corado com 0,5 mg/mL de brometo de etídeo (Figura 2).



**Legenda:** Amostras de carcinoma de células escamosas (CCE) bucal.

**Figura 2** - Gel de poliacrilamida a 15% mostrando a qualidade do RNA extraído.

### 3.5 SÍNTESE DE cDNA

Para a confecção das moléculas de cDNA por RT-PCR (reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase), 1,5 µg de RNA total foram tratados com 1U de DNase I a fim de evitar contaminação de DNA genômico. O RNA foi então submetido à ação da enzima *SuperScript II* utilizando o *First Strand Synthesis kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) conforme as condições indicadas pelo fabricante. Cerca de 1,5 µg de RNA total foi adicionado 1µL de *primer* Oligo dT (500µg/mL), 1µL de dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e água DEPC suficiente para 10 µL. Essa solução foi incubada a 65°C durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 2µL de 5X *First Strand Buffer*, 2µL de DTT (0,1M), 4 µl de Mg Cl<sub>2</sub>(25 mM) e 1µL de *RNase out* (40U/µL) seguido de incubação por 2min a 42°C. Logo após foi adicionado 1µL de da enzima *SuperScript II* (200 U/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) perfazendo um volume final de reação de 20µL. A reação foi incubada a 45°C por 50 min e adicionado 1µl de RNaseH a por 20min a 37°C e depois inativada através de incubação a 70°C por 15 minutos. Terminada a reação, o produto da síntese foi diluído 10X pela adição de 180µL de água livre de RNase.

Como controle de qualidade dos cDNAs foi amplificado um fragmento do gene *ACTB* (NM 001101), com a utilização dos *primers* *ACTB-F* (5'-GCTCGTCGTCGACAACGGCTC-3') e *ACTB-R* (5'-CAAACATGATCTGGGTCATCTTCTC-3'). Para isto foram utilizados 250ng de cDNA, 2,5 $\mu$ L de tampão de reação 10X; 1 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 5 $\mu$ L de dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 0,25  $\mu$ L de cada *primer* (20 $\mu$ M) e 1U de *Taq DNA Polymerase Platinum* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em um volume final de reação de 25 $\mu$ L. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de alongamento final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da amplificação da *ACTB* por PCR convencional foram avaliados em gel de poliacrilamida 6,5% e corados pela prata (Figura 3):



**Legenda:** Amostras de carcinoma de células escamosas bucal (CCEB). C+ testículo. C- controle negativo. pb – pares de base.

**Figura 3** - Gel de poliacrilamida a 6,5 % com os produtos de amplificação do fragmento de 330 pb do gene *ACTB*.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MEIO DE PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em Tempo Real para avaliação dos genes *MAGE A1* e *BORIS* utilizando 15 amostras do grupo experimental e 10 amostras do grupo controle foram realizadas no aparelho *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, USA). Os ensaios *inventoried* FAM/MGB TaqMan utilizados foram Hs00607097\_m1 para *MAGE A1* que amplificava as regiões dos exons 1 e 2 e Hs00540744\_m1 para *BORIS* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que amplificava as regiões dos exons 9 e 10. As reações foram realizadas em um volume total de 10  $\mu$ L contendo 120ng de cDNA, 3,5  $\mu$ L de água, 5 $\mu$ L de 2x PCR Master Mix ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 0,5  $\mu$ L de cada ensaio TaqMan.

As condições de amplificação utilizadas foram: 50°C por 2min, 95°C por 10 min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

Para o cálculo da quantificação relativa do nível de expressão foi utilizado o método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). O método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ou método comparativo de Ct é uma equação matemática onde as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras (normais) e as experimentais (tumorais), normalizadas por uma referência. Vale destacar que o valor inferido à  $\Delta Ct$  equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. Já o cálculo da fórmula  $\Delta\Delta Ct$  envolve a

subtração entre o valor de  $\Delta Ct$  para cada amostra experimental e o valor de  $\Delta Ct$  para as amostras calibradoras. Neste estudo as amostras do grupo controle foram usadas como amostras calibradoras.

Para a análise da expressão dos genes *MAGE A1* e *BORIS* foi utilizado o gene *RPLPO* (TaqMan-FAM/MGB) como normalizador. A escolha deste gene baseou-se num estudo desenvolvido por LESSA 2007, que teve como objetivo a escolha de um melhor normalizador para a cavidade oral.

Todas as reações foram realizadas em duplicatas, sempre com a presença de um controle positivo (cDNA de testículo - gentilmente cedido por Dr. André Vettore –UNIFESP - SP) e um controle negativo, reação onde foram adicionados todos os reagentes exceto os cDNAs.

### **3.7 PCR CONVENCIONAL**

Para análise da expressão dos genes selecionados em 20 amostras do grupo experimental e 10 amostras do grupo controle, foram utilizados *primers* descritos previamente na literatura para *MAGE A1* e *BORIS* (HINES et al. 2010; VAN et al. 1999) (Tabela 4).



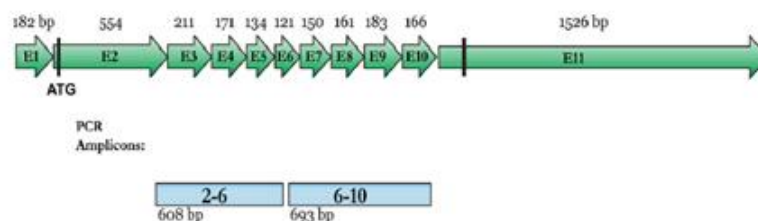
**Tabela 4** - *Primers* utilizados para avaliação na reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional dos genes CTAs analisados neste estudo.

Gene	Seqüências dos <i>primers</i>	Tamanho do fragmento
<i>MAGE A1</i>	F: 5'- CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG-3' R: 5'- GCTGGAACCCTCACTGGGTTGCC-3'	421 pb
<i>BORIS 2/6</i>	F: 5'- TGGTGGCCAGTGAAGACAGTAAGT - 3' R: 5'- GGATCGGACATGGCGCTTCAATTT -3'	608 pb
<i>BORIS 6/10</i>	F: 5'- CTTTCAGTGTTGCCAGTGCAGCTA - 3' R: 5' - TTCTGACCCTTTGTGGCTTCCTTC -3'	693 pb

F: *primer forward*; R; *primer reverse* e pb: pares de base

Os *primers* utilizados para *MAGE A1* além da isoforma principal permitiam a amplificação de outra variante já descrita.

Para conseguir detectar o maior número de transcritos possíveis através do uso de promotores alternativos do gene *BORIS* (RENAUD et al. 2007) foram utilizados dois pares de *primers* descritos por HINES et al. (2010), sendo que o primeiro par englobava do exon 2 ao exon 6 e o segundo par englobava do exon 6 ao exon 10 (Figura 4):



**Legenda:** Em verde estão os 11 exons de *BORIS* e seus respectivos tamanhos em bp (pares de bases). Em azul estão os produtos de PCR esperados (2-6 e 6-10). ATG: *start codon*. Adaptado de Hines et al. (2010).

**Figura 4 -** *Primers* usados na reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para *BORIS*.

As reações de PCR convencional foram padronizadas com a finalidade de garantir as melhores condições de amplificação, para isto, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de  $MgCl_2$  (Tabela 5):

**Tabela 5 -** Condições para as reações em cadeia da polimerase (PCR) convencional para cada um dos genes avaliados.

Gene	Temperatura de anelamento (°C)	$MgCl_2$ (mM)
<i>MAGE A1</i>	72	1
<i>BORIS 2/6</i>	62	1
<i>BORIS 6/10</i>	63	1

$MgCl_2$ : cloreto de magnésio

### 3.8 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS E TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

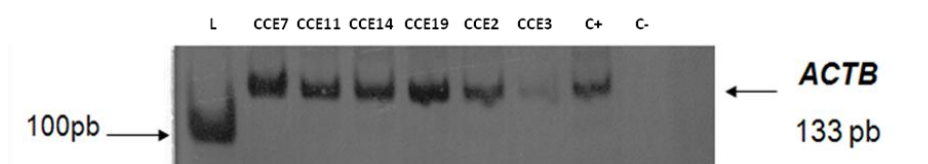
O DNA das amostras do grupo experimental e do grupo controle foi extraído utilizando o reagente Tri-Phasis Reagent (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e um tampão de extração composto por Tiocianato de Guanidina 4M, citrato de sódio 50mM e TRIS 1M pH 8,0. Após centrifugação, o precipitado de DNA foi lavado com isopropanol (100%) e etanol (70%), ressuspendido em 25  $\mu$ L de água e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A integridade do DNA foi avaliada através da amplificação do fragmento do gene  $\beta$ -globina utilizando os *primers* 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' e 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'. As condições de amplificação foram as seguintes:  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min seguido de 35 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}$  por 45s,  $56^{\circ}\text{C}$  por 30s,  $72^{\circ}\text{C}$  por 30s e extensão final por 7 min. Em seguida o DNA extraído foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, conforme descrito por JERONIMO et al. (2003) com algumas adaptações. Este tratamento promove a deaminação de citosinas não-metiladas, convertendo-as em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas

Na primeira etapa foi realizada a denaturação do DNA, utilizando 2  $\mu$ g do DNA, 1 $\mu$ L de *Salmon Sperm DNA* 1ug/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 2 $\mu$ L de NaOH 3M para um volume final de 20  $\mu$ L. As amostras foram então incubadas em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Em seguida foram adicionados às amostras 500 $\mu$ L de solução de bissulfito de sódio pH 5,0 (meta-bissulfito de sódio 2,5M, hidroquinona 125mM e NaOH 350mM). As amostras então foram incubadas no escuro a  $70^{\circ}\text{C}$  por 3 horas. O DNA foi

purificado com a utilização do kit *Wizard DNA Clean-up System* (Promega, Madison, Wisconsin, USA), posteriormente lavado com 2mL de isopropanol 80% por duas vezes, seguido pela centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm. O DNA tratado foi então diluído em 45µL de água a 80°C. A dessulfonação do DNA foi feita através da adição de 5µL de NaOH 3M e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. A precipitação do DNA foi realizada com a adição de 75µL de acetato de amônia 5M, 350µL de etanol 100% gelado e 1µL de glicogênio (20µg/mL) e incubação overnight a -20° C. Após centrifugação (30 min, 13.000 rpm, 4°C) e descarte do sobrenadante, foram adicionados 500µL de etanol 70% gelado e repetidos os passos de centrifugação e descarte do sobrenadante. Os *pellets* foram deixados à temperatura ambiente por 10 minutos para sua secagem e ressuspendidos em 25µL de água e armazenados a -80° C.

Como controle de qualidade do tratamento do DNA com o bissulfito, foi amplificado um fragmento do gene *ACTB* (NM 001101), com a utilização de *primers* desenhados para este gene pós-tratamento com bissulfito de sódio *ACTB-F* (5'-TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3') e *ACTB-R* (5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3'). Para isto foram utilizados 1µL de DNA diluído, 2,5µL de tampão de reação 10X; 1µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM); 0,5µL de dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1,0µL de cada *primer* (10µM) e 0,25µL de *Taq DNA Polymerase Platinum* (5 units/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) em um volume final de reação de 25µL. As seguintes condições de amplificação foram: desnaturação inicial por 2 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 45

segundos e 72°C por 45 segundos, com uma fase de alongamento final a 72°C por 7 minutos. As amostras que não apresentavam uma boa amplificação, como é o caso da amostra CCE3 disposta na Figura 5, eram submetidas a um novo tratamento com bissulfito de sódio.



**Legenda:** DNAs tratados com bissulfito de sódio submetidos à amplificação com *primers* de *ACTB* para a situação tratada.

**Figura 5** - Avaliação do tratamento com bissulfito de sódio em amostras do grupo experimental.

### 3.9 IDENTIFICAÇÃO E DESENHO DE *PRIMERS* PARA A ILHA CpG DE *MAGE A1*

Para a identificação da ilha CpG presente na região promotora do gene *MAGE A1* foram adotados os seguintes critérios: o tamanho da ilha CpG maior que 100pb, a porcentagem de G+C maior que 50% e a proporção entre CpG observada/esperada maior que 0,6. Para isto foram utilizados os sites já citados: *UCSC* e *Methprimer*.

Para verificar o padrão e a distribuição da metilação dessas regiões, o desenho dos *primers* específicos para o seqüenciamento foi realizado, utilizando as ferramentas *GeneRunner* e *Methprimer*. O *Methprimer* simula o tratamento com o reagente bissulfito de sódio na seqüência a ser estudada. Deste modo, pode-se visualizar as citosinas anteriores às guaninas, mantidas em suas posições e todas as demais citosinas

transformadas em timinas. Devemos ressaltar que estes *primers* não abrangeram nenhum dinucleotídeo CG. Assim durante a reação de PCR, tivemos a amplificação da mesma região em estudo, tanto em amostras altamente metiladas, quanto em amostras desmetiladas.

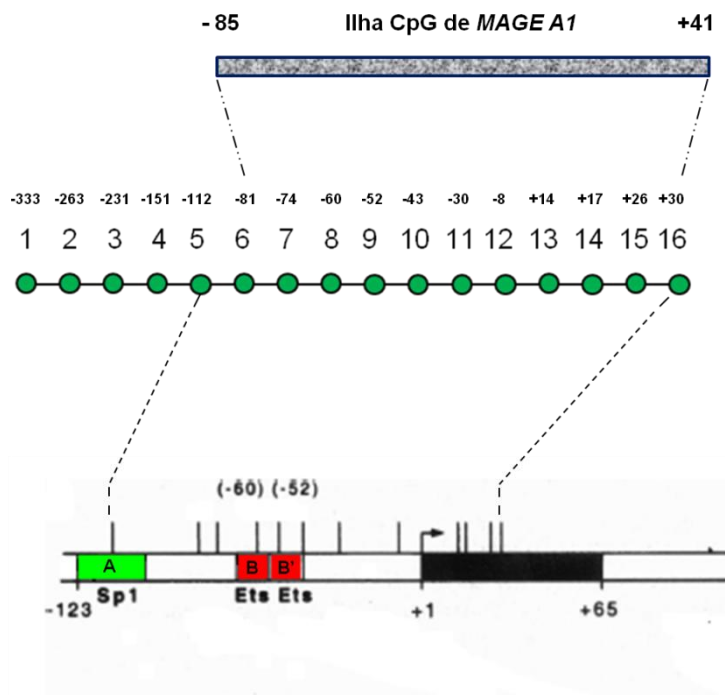
O fragmento correspondente à amplificação ilha CpG do gene *MAGE A1* abrangeu 446 pb, contendo 16 dinucleotídeos CGs (Figura 6):

```
tgtgatcag ggaagggctgcttaggagagggcagcg tccaggctctgccagacatca
tgctcaggattctcaaggagggctgaggggtccctaagaccccactcc cgtgacccaa
ccccactccaatgctcactcc cgtgacccaaaccccctcttcattgtcattccaacc
cccaccccacatccccaccccacccctcaaccctgatgcccatc cgcccagccatt
ccaccctcacccccacccccacc cccacgcccactcccacccccaccaggcaggat
cgggttcc cgccaggaaacatc cgggtgcc cggatgtga cgccactgacttg cgcat
tgtggggc GAGAGAAG CGAGGTTT CATTCTGAGGGAG CGGCGTAGAGTT CGGCCGA
AGGAACCTGACCCCAGGCTCTGTGAGGAGGCAAG gtgagaggctgagggaggactgag
gaccc cgccactccaatagagagccccaaatattccag cgccg
```

**Legenda:** Ilha CpG presente na região promotora do gene *MAGEA1* identificada pela ferramenta disponíveis *on line* no *UCSC Genome Bioinformatics* e *MethPrimer* (disposta na cor azul). Estão indicados em vermelho os dinucleotídeos CGs encontrados. Dispostos na cor verde estão as seqüências dos *primers* desenhados para a amplificação da ilha CpG sem a presença de dinucleotídeos CGs. As letras maiúsculas representam a região correspondente ao primeiro exon. Em amarelo e sublinhado está o nucleotídeo referente ao sítio inicial de transcrição (+1).

**Figura 6** – Seqüência de DNA da região promotora do gene *MAGE A1*.

Esta região amplificada abrangeu o sítio inicial de transcrição (Figura 12) e também as regiões de acoplamentos dos fatores de transcrição *Sp1* (região A) e *Ets* (regiões B e B`) importantes na regulação da expressão de *MAGE A1* (Figura 7).



**Legenda:** Extensão da Ilha CpG de *MAGE A1* (barra cinza) em relação ao sítio inicial de transcrição (acima). Os círculos verdes representam os 16 nucleotídeos CpGs presentes na região de 446 pb amplificada e que foram analisados neste estudo. Abaixo está a representação esquemática da região promotora de *MAGE A1*, onde as barras verticais representam CpGs, em verde temos a região correspondente ao sítio de ligação do fator de transcrição Sp1(A), em vermelho o sítios de ligação do fator de transcrição Ets (B e B') e a região em preto corresponde ao primeiro exon. Figura adaptada a partir de DE SMET et al (1996).

**Figura 7** - Representação esquemática da região promotora de *MAGE A1*.

Devido à complexidade envolvida no processo de transcrição do gene *BORIS*, ficou decidido que a avaliação do nível de hipometilação na região promotora deste gene seria efetuado em uma outra etapa.

### 3.10 CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO

Para o preparo de bactérias MC1061 eletrocompetentes foram realizados dois pré-inóculos e a seguir, utilizado o protocolo proposto por SAMBROOK E RUSSEL (2001). As células foram crescidas em 1L de meio LB sob agitação de 200 rpm e a 37°C até atingirem a OD600 (densidade

óptica de medida de amostra em um comprimento de onda de 600 nm) de 0,2. Logo depois foram efetuados múltiplos banhos de glicerol a 10% gelado e centrifugações por 15min a 10.000 rpm. Ao final, ao atingirem a OD-600 de 0,15, seguiu-se a diluição (quando necessária) e a distribuição de 40µL destas células em tubos individuais de poliestireno e estocagem a -80°C até sua utilização.

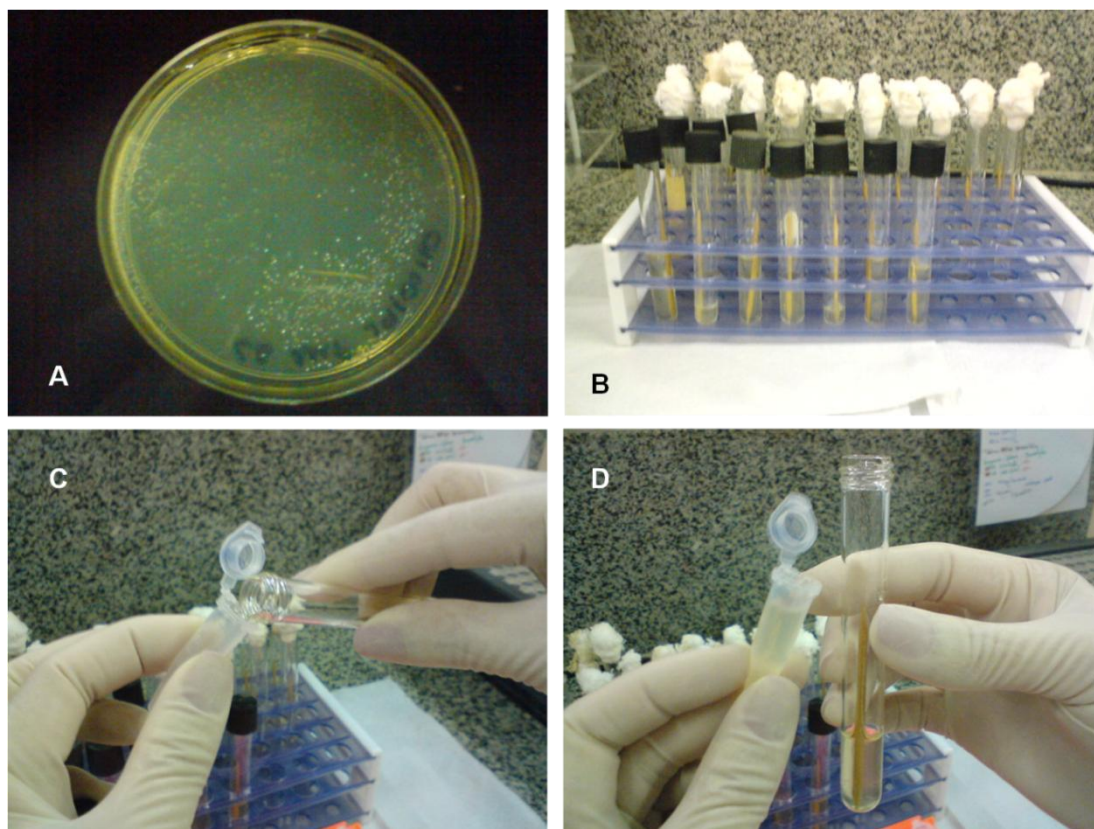
Para a amplificação da ilha CpG do gene *MAGE A1* foi realizada a PCR com as seguintes condições: 10µL de DNA; 2,5µL de tampão de reação 10X; 1µL MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 1,0µL de dNTPs (10mM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); 1,0µL de cada *primer* (10µM) e 2U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (5 units/µL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA ). As condições de amplificação utilizadas foram: 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 66°C por 45 segundos, 72°C por 1 min e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

Após a reação os produtos foram visualizados em gel de agarose 1,5%, extraídos e purificados com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Waukesha, Wiscosin, USA). Os fragmentos obtidos contendo a ilha de CpG de *MAGE A1* foram então introduzidos no plasmídeo *pCR4-TOPO®* utilizando o *TA Cloning Kit for Sequencing* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segundo instruções do fabricante. Após a ligação os plasmídeos recombinantes foram introduzidos em células de *E. coli* MC1061 por eletroporação utilizando o eletroporador *Electroporator 2510* (Eppendorf, Hamburg, Germany ) utilizando 2,5 kV.



Foram feitas as culturas em meio sólido com crescimento *overnight* a 37°C por 18 horas (Figura 8A), logo depois realizadas as culturas de cada clone individual em meio líquido com novo crescimento *overnight* a 37°C por 18 horas (Figura 8B).

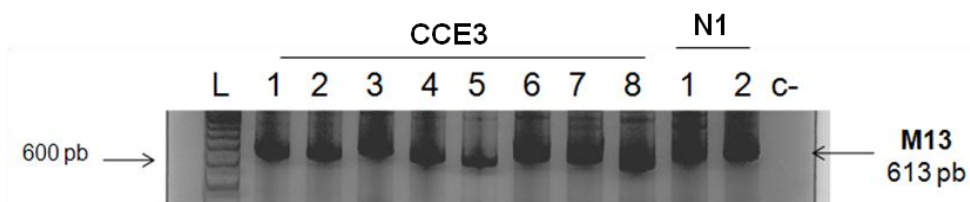
A seguir foi realizada a *miniprep* com o propósito de isolar o DNA clonado em cada bactéria (Figura 8C e 8D). Isto foi feito com auxílio de *kit* de extração proposto por SAMBROOK E RUSSEL (2001) contendo solução de lise I (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 e 10 mM EDTA pH 8.0), solução de lise II (0.2 M NaOH e SDS a 1%) e solução de lise III (8 M de acetato de amônio -NH<sub>4</sub>-Ac).



**Legenda:** (A) placa com meio LB ágar contendo clones de *E coli* MC1061 transformadas com o DNA de um determinado paciente; (B) Culturas em meio líquido contendo clones individuais de cada paciente; (C) e (D) Início da Miniprep – extração do DNAs de cada clone.

**Figura 8** - Clonagem de DNA contendo região da ilha CpG de *MAGE A1* amplificada, utilizando bactérias eletrocompetentes MC1061.

Os DNAs extraídos foram purificados novamente com o kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Waukesha, Wiscosin, USA) e amplificados utilizando os *primers* M13F 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3' e M13R 5'-TCACACAGGAAACAGCTATGAC-3' com a finalidade de identificar a presença de insertos corretos. Como resultados, esperávamos um fragmento de 199 pb, caso o plasmídeo estivesse vazio e fragmentos de 613 pb para os plasmídeos que apresentavam o fragmento de 446pb de *MAGE A1* (Figura 9):



**Legenda:** PCR para o gene M13 dos DNAs extraídos das colônias resultantes da clonagem da ilha CpG do gene *MAGE A1* em amostras do grupo experimental (CCE) e do grupo controle (N) (613pb). Na canaleta – foi adicionado o controle negativo (sem adição de DNA). pb - pares de base.

**Figura 9** – Gel de poliacrilamida a 6,5% mostrando a amplificação dos DNAs plasmidiais extraídos.

Logo depois foram feitas as reações de sequenciamento utilizando o kit *Big Dye terminator sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que foram por sua vez, analisadas no seqüenciador *ABI Prism® 310 Genetic Analyser*.

A análise do nível de hipometilação para cada amostra foi obtido somando-se todos os CpGs hipometilados encontrados em todos os clones, dividindo este número pelo total de CpGs avaliados e multiplicando por 100. No grupo experimental foram seqüenciados dez clones da amostra CCE 3, seis clones da amostra CCE14 e três clones da amostra CCE19. No grupo controle foram seqüenciados quatro clones da amostra N1, nove clones da amostra N2 e dez clones da amostra N3.

### 3.11 IMUNOISTOQUÍMICA

As análises de imunistoquímica foram realizadas usando 20 amostras do grupo experimental e 10 amostras do grupo controle montadas em lâminas (*Super-Frost Plus; Menzel, Braunschweig, Germany*), a partir dos blocos de parafina que foram confeccionados após coleta dessas amostras como citado no item 3.1. Estes cortes foram desparafinizados e rehidratados. Basicamente, após a desparafinização em xilol as lâminas foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol, submetidas à recuperação antigênica com EDTA pH 9,0, seguidas de incubação com por 1 hora sob agitação com os anticorpos policlonais de coelho (*Abcam, Cambridge, UK*): anti-*MAGE A1* (1:100) e anti-*BORIS* (1:200). Logo após foi realizada nova incubação por 1 hora com o sistema de detecção *Envision* (*Dako, Carpinteria, CA, USA*). A coloração foi finalizada com incubação com 3-diamino-benzidina (DAB). Foi realizada logo após, uma contra-coloração com hematoxilina de *Mayers* seguida de desidratação e montagem com lamínula de vidro. Em todas as lâminas havia a presença de um controle negativo que foi obtido por substituição do anticorpo primário específico com BSA e em cada análise foi utilizado um controle positivo (uma amostra de CCEB que não fazia parte do grupo experimental).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DOS RNAS EXTRAÍDOS

As quantidades de RNAs obtidas das amostras do grupo experimental variaram de 9,17 mg/ml a 0,30 mg/ml e das amostras do grupo controle variaram de 3,54 mg/ml a 0,14 mg/ml. Os valores de *ratio* (razão de absorvância entre os valores 260/280) para amostras do grupo experimental variaram de 1,703 a 2,247 e para as amostras do grupo controle estes valores foram de 1,553 a 1,849 (Tabela 6):

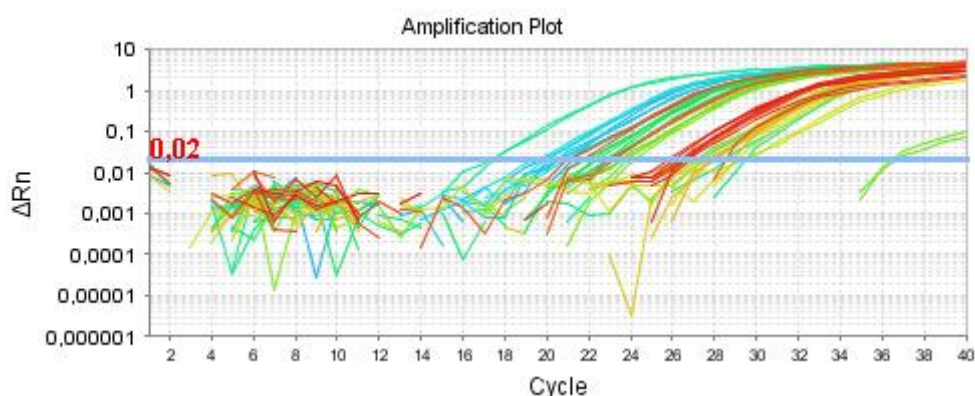
**Tabela 6** - Valores das quantificações dos RNAs das amostras do grupo controle (N) e do grupo experimental (CCE).

<b>Amostra</b>	<b>A1/A2</b>	<b>mg/mlTotais</b>
<b>Amostras do grupo controle</b>		
N1	1,618	1
N2	1,553	0,66
N3	1,653	0,48
N4	1,695	1,08
N5	1,365	0,14
N6	1,756	1,27
N7	1,849	0,63
N8	1,810	0,33
N9	1,966	1,02
N10	1,774	1,74
N11	1,861	1,61
N12	1,694	1,27
N13	1,71	0,25
<b>Amostras do grupo experimental</b>		
CCE 1	1,949	4,38
CCE 2	1,993	9,17
CCE 3	1,858	3,17
CCE 4	1,773	1,97
CCE 5	1,899	2,36
CCE 6	1,793	1,25
CCE 7	2,247	0,30
CCE 8	1,851	1,3
CCE 9	1,859	5,21
CCE 10	1,711	1,37
CCE 11	1,97	5,49
CCE 12	1,857	3,3
CCE 13	1,889	1,93
CCE 14	1,94	1,89
CCE 15	1,809	2,25
CCE 16	1,861	3,57
CCE 17	1,891	4,38
CCE 18	1,935	2,58
CCE 19	1,876	2,27
CCE 20	1,703	3,54
CCE 21	1,834	2,44
CCE 22	1,894	2,69
CCE 23	1,946	3,22
CCE 24	1,891	2,46
CCE 25	1,896	1,81

## 4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

### 4.2.1 Quantificação dos níveis de expressão no grupo experimental e no grupo controle

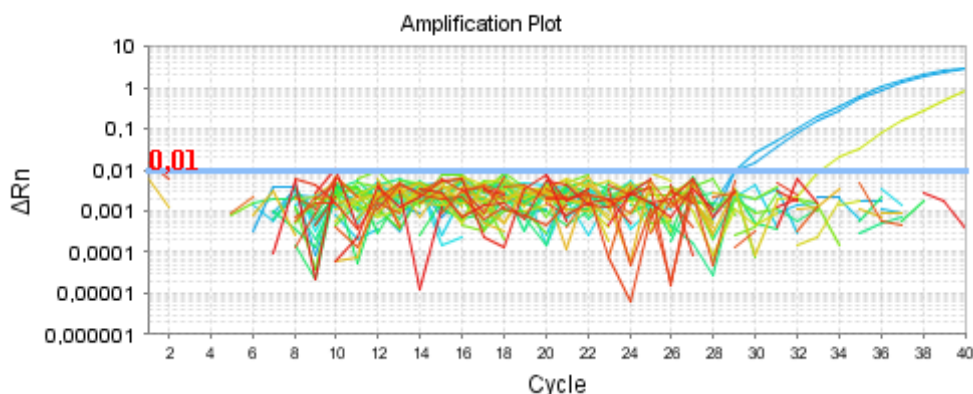
Os resultados das análises de expressão gênica por PCR em tempo real demonstraram que houve a amplificação do normalizador *RPLPO* nas amostras do grupo experimental e nas amostras do grupo controle, o que confirma a integridade do cDNA e o sucesso da transcrição reversa (Figura 10).



**Legenda:** As reações foram realizadas em duplicata. A linha azul representa o *threshold*. As curvas representam amplificação do gene constitutivo *RPLPO* em amostras do grupo experimental e do grupo controle.

**Figura 10** - Gráfico de amplificação do gene *RPLPO* em amostras do grupo experimental e em amostras do grupo controle.

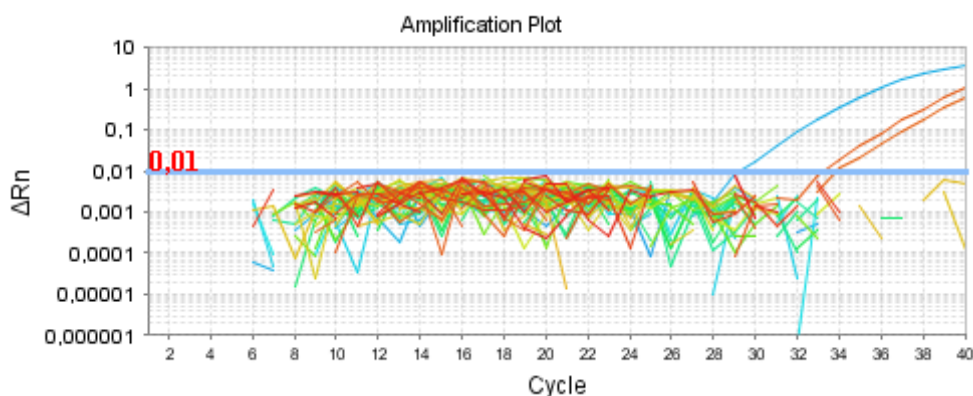
As análises da expressão do gene *MAGE A1* revelaram a amplificação tardia deste gene na amostra do grupo experimental CCE 21 e no controle positivo (testículo) como demonstra a Figura 11. Não foi verificada a amplificação de *MAGE A1* nas demais amostras avaliadas.



**Legenda:** As reações foram realizadas em duplicata. A linha azul horizontal representa o *threshold*. As curvas azuis representam amplificação do gene *MAGE A1* no controle positivo. A curva amarela representa amplificação da amostra experimental CCE 21.

**Figura 11** - Gráfico de amplificação do gene *MAGE A1* em amostras do grupo experimental e em amostras do grupo controle.

Na avaliação do gene *BORIS* foi verificada amplificação tardia deste gene na amostra do grupo experimental CCE 8 e no controle positivo (testículo) como demonstra a Figura 12. Não foi verificada a amplificação de *BORIS* nas demais amostras avaliadas.



**Legenda:** As reações foram realizadas em duplicata. A linha azul horizontal representa o *threshold*. A curva azul representa a amplificação do gene *BORIS* no controle positivo. As curvas vermelhas representam amplificação de *BORIS* na amostra experimental CCE 8.

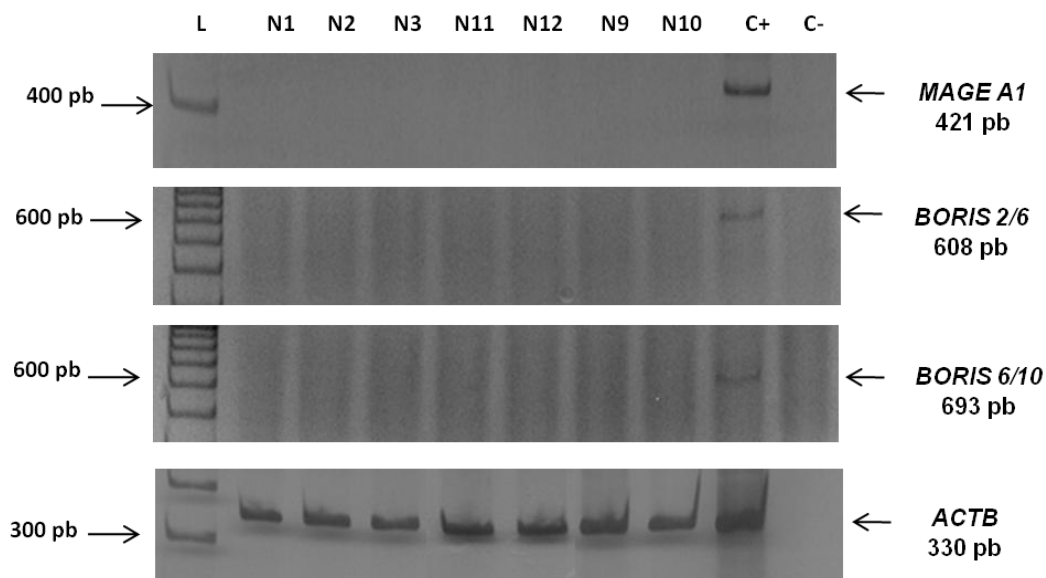
**Figura 12** - Gráfico de amplificação do gene *BORIS* em amostras do grupo experimental e em amostras do grupo controle.



O cálculo da expressão relativa destes genes não foi realizado neste ensaio, em virtude de não ter havido amplificação de *MAGE A1* e *BORIS* nas amostras do grupo controle; o que inviabilizou o cálculo da expressão relativa destes genes.

#### **4.2.2 PCR Convencional**

A avaliação do nível de expressão dos genes *MAGE A1* e *BORIS* pelo método da PCR convencional nas amostras do grupo controle, revelou a ausência da expressão destes genes neste grupo de amostras; sendo estas expressões detectadas somente no controle positivo (testículo) (Figura 13).

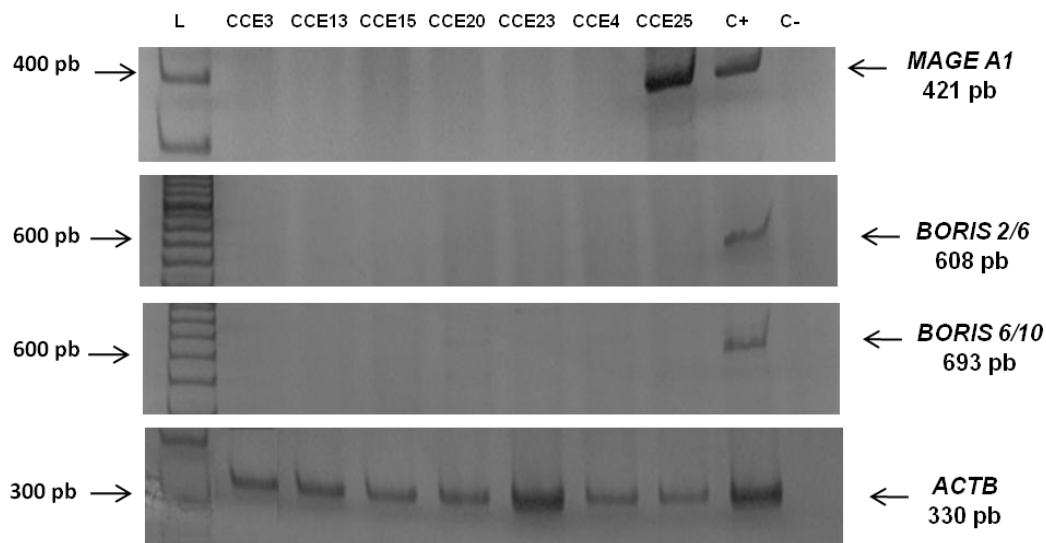


**Legenda:** O nível de expressão de *MAGE A1* em amostras do grupo controle (N) foi avaliado através de PCR convencional e eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, corado pela prata. O gene *ACTB* foi utilizado como controle da quantidade de cDNA adicionado em cada reação de PCR convencional. (L) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Carlsbad, CA, USA). Nas canaletas marcadas com + e - foram adicionados controles positivo (testículo) e negativo.

**Figura 13** – Avaliação da expressão dos genes *MAGE A1* e *BORIS* em amostras do grupo controle.

Esta mesma avaliação nas amostras do grupo experimental revelou que *MAGE A1* estava expresso em 10% (2/20) das amostras e *BORIS* estava expresso em 5% (1/20) das amostras.

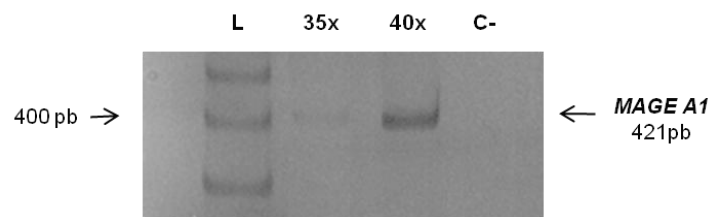
Foi observada uma forte expressão de *MAGE A1* na amostra CCE 25 e no controle positivo (testículo) (Figura 14). A expressão de *MAGE A1* na amostra CCE 25 foi confirmada por seqüenciamento. Nesta mesma amostra foi observada a presença de uma banda inespecífica entre 300 e 400 pb, que não foi observada no controle positivo. Apesar desse fragmento ter sido seqüenciado, não foi possível definir a natureza deste produto. *BORIS* apresentou-se ausente na maioria das amostras avaliadas (Figura 14).



**Legenda:** O nível de expressão foi avaliado através de PCR convencional e eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, corado pela prata. O gene *ACTB* foi utilizado como controle da quantidade de cDNA adicionado em cada reação de PCR convencional. (L) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Nas canaletas marcadas com + e - foram adicionados controles positivo (testículo) e negativo.

**Figura 14** – Avaliação da expressão dos genes *MAGE A1* e *BORIS* em amostras do grupo experimental.

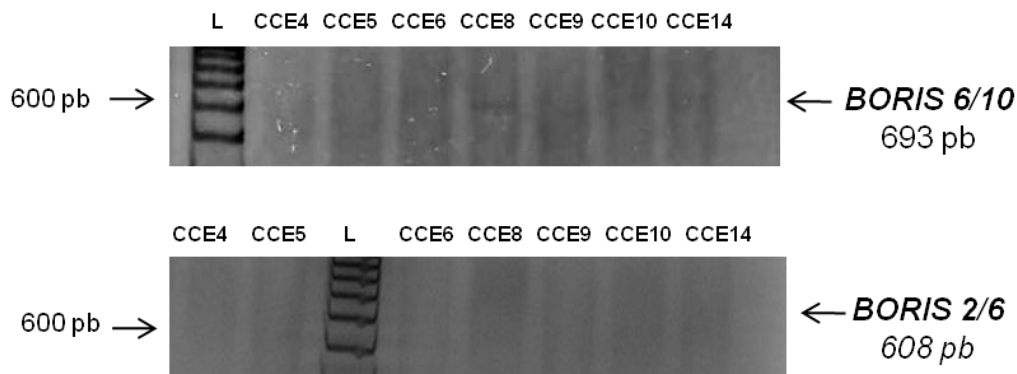
Além da expressão de *MAGE A1* na amostra CCE 25, foi encontrada também uma baixa expressão deste gene na amostra CCE 21. Esse resultado é semelhante ao encontrado na PCR em tempo real onde foi observado que *MAGE A1* apresentou uma amplificação tardia nesta amostra. A padronização deste gene para o ensaio da PCR convencional, foi obtida com a realização de 35 ciclos e na PCR em tempo real foram utilizados 40 ciclos (condição pré-estabelecida). Portanto, após o aumento do número de ciclos para 40, nesse ensaio de PCR convencional, foi observado também o aumento da expressão de *MAGE A1* nesta amostra, sem o aparecimento de produtos inespecíficos (Figura 15):



**Legenda:** Avaliação do nível de expressão da amostra CCE 21 por PCR convencional utilizando 35 ciclos (35x) e 40 ciclos (40x). Gel de poliacrilamida a 6,5%, corado pela prata. (L) *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA ). Na canaleta marcada com c- foi adicionado o controle negativo. pb- pares de base.

**Figura 15** – Avaliação da expressão do gene *MAGE A1* na amostra do grupo experimental 21 (CCE 21) em diferentes ciclos.

Foi observada a baixa expressão do gene *BORIS* na amostra do grupo experimental CCE 8 (Figura 16) utilizando os *primers* 6/10, estando esta expressão ausente com a utilização dos *primers* 2/6 (Figura 16). Este resultado está de acordo com o obtido na avaliação por PCR em tempo real em que o gene *BORIS* apresentou uma amplificação tardia nesta amostra. A região amplificada pelos *primers* *BORIS* 6/10 na PCR convencional abrange uma parte da região amplificada pelo ensaio *Taqman* Hs00540744\_m (exons 9/10) utilizado na avaliação de *BORIS* na PCR em tempo real. Isto pode sugerir que alguma isoforma de *BORIS*, pode estar sendo produzida em baixos níveis a partir dos exons 9 e 10.



**Legenda:** O nível de expressão foi avaliado através de PCR convencional e eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%, corado pela prata. Análise de expressão de *BORIS* usando primers exons 6 e 10 (*BORIS 6/10*) e exons 2 ao 6 (*BORIS 2/6*). (L) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

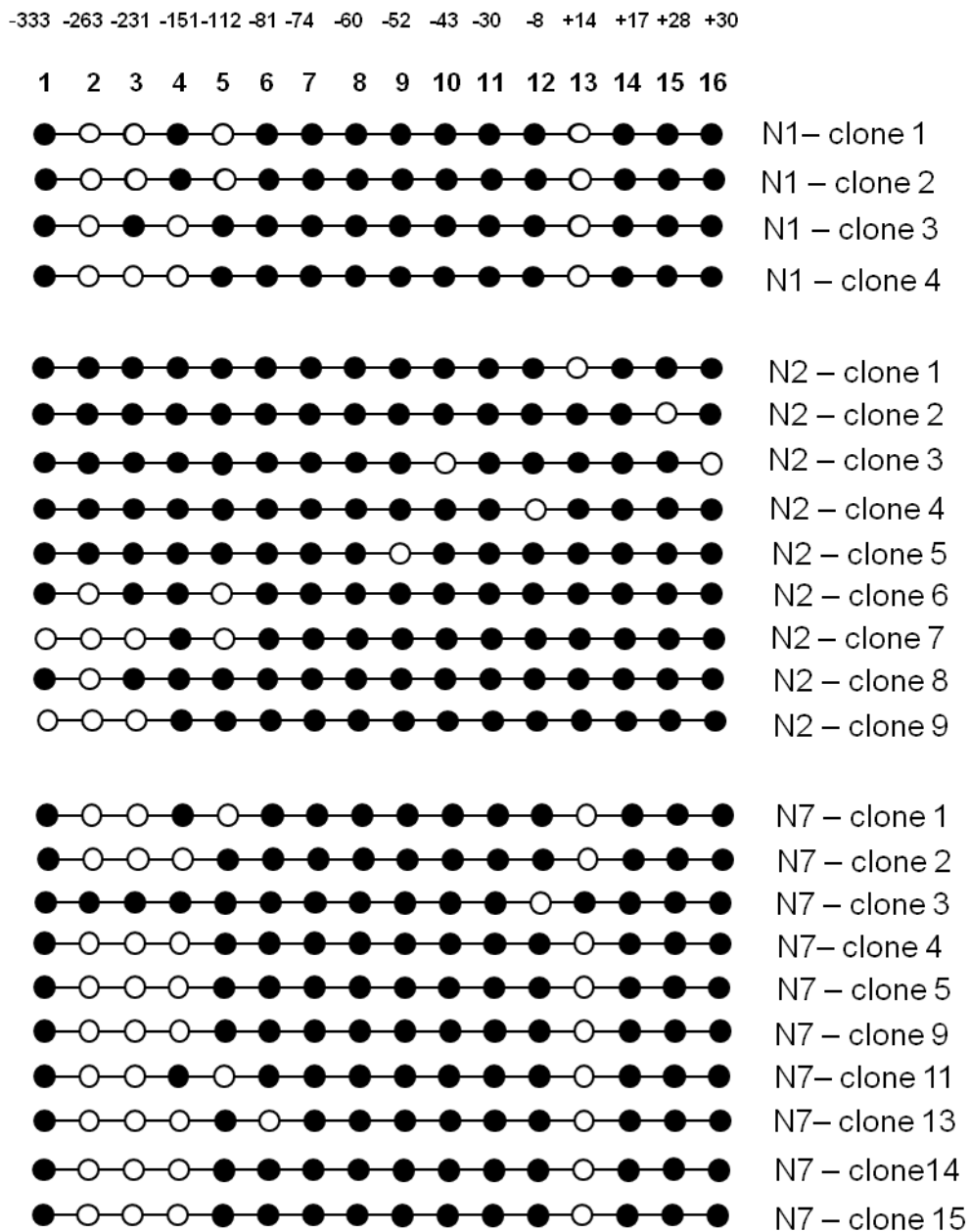
**Figura 16** – Avaliação da expressão do gene *BORIS* em amostras do grupo experimental.

Os resultados encontrados neste ensaio de PCR convencional que verificou a ausência da expressão de *MAGE A1* e de *BORIS* em amostras do grupo controle e a baixa expressão destes genes em duas amostras do grupo experimental, foram semelhantes aos resultados encontrados neste mesmo estudo, nos experimentos por PCR em tempo real. Exceto, pela amostra CCE25 cuja expressão de *MAGE A1* foi apenas detectada na PCR convencional, em virtude desta não ter participado dos ensaios de PCR em tempo real.

### **4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS CGS METILADOS NA ILHA CpG NA REGIÃO PROMOTORA DE *MAGE A1*.**

O seqüenciamento do DNA da região promotora do gene *MAGE A1* nas amostras do grupo controle, possibilitou a identificação da presença de determinados dinucleotídeos CpGs hipometilados nesta região (Figura 17).

Observou-se durante essas análises que a amostra N1 apresentou 23,4% (15/64) de CpGs hipometilados, a amostra N2 apresentou 11,1% (16/144) de CpGs hipometilados e a amostra N7 apresentou 23,75% (38/160) de CpGs hipometilados (Figura 17). As regiões -263, -231, -151 e +14 foram as que apresentaram um maior número de hipometilação neste grupo de amostras.

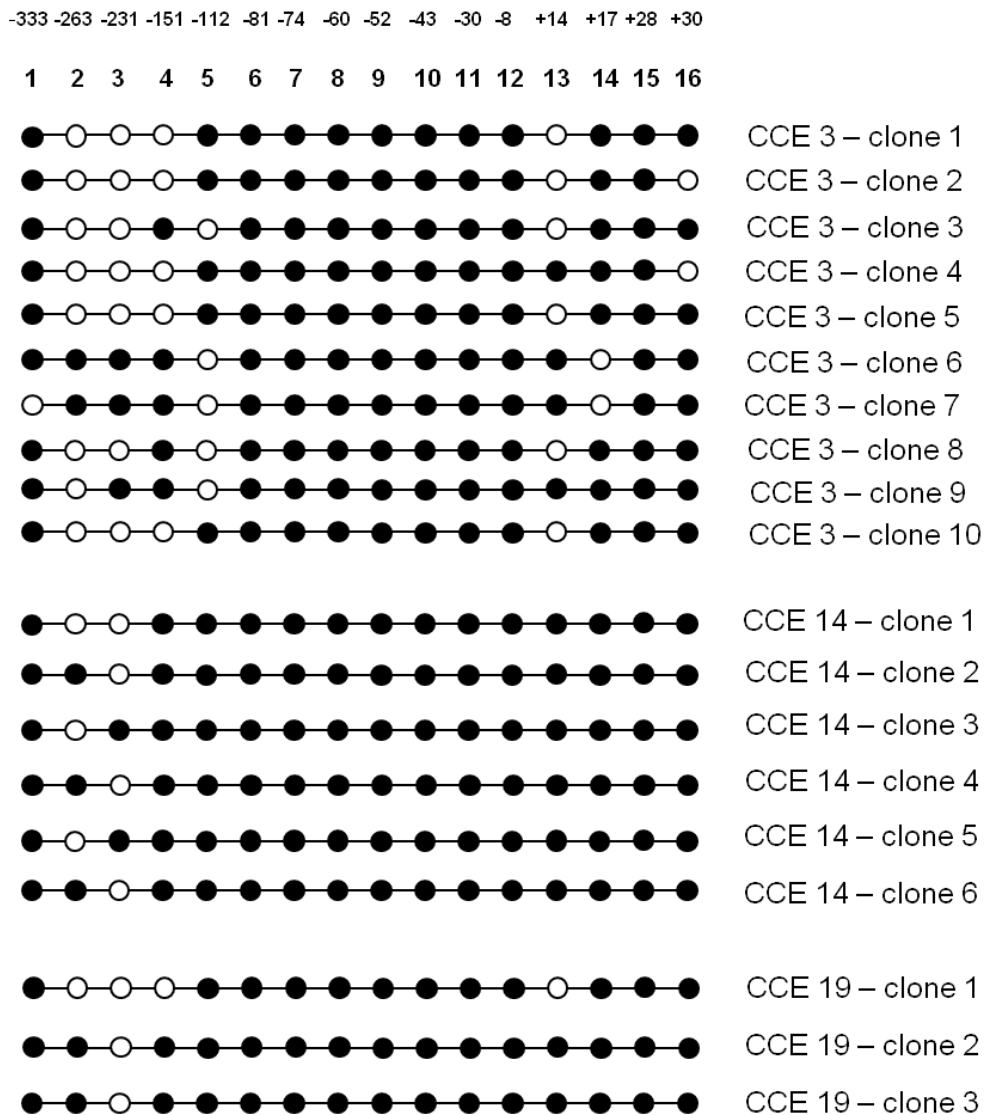


**Legenda:** Cada fileira de círculos representa um clone individual. Os círculos brancos representam os dinucleotídeos CpGs hipometilados e os círculos pretos representam os CpGs metilados. Acima estão descritas as posições em relação ao sítio inicial de transcrição de *MAGE A1* para cada dinucleotídeo CpG. Avaliação das amostras do grupo controle N1, N2 e N7.

**Figura 17** - Perfil de metilação da região promotora do gene *MAGE A1* em amostras do grupo controle (16 CpGs no total).

As análises por seqüenciamento da região promotora do gene *MAGE A1* nas amostras do grupo experimental, permitiu também a identificação da presença de alguns dinucleotídeos CpGs hipometilados (Figura 18). Foi possível observar que a amostra CCE3 apresentou 22,5% (36/160) de CpGs hipometilados, a amostra CCE 14 apresentou 7,3% (7/96) de CpGs hipometilados e a amostra CCE 19 apresentou 12,5% (6/48) de CpGs hipometilados. As regiões -263, -231, -112, -151 e +14 foram, novamente, as que apresentaram um maior índice de hipometilação neste grupo de amostras.





**Legenda:** Cada fileira de círculos representa um clone individual. Os círculos brancos representam os dinucleotídeos CpGs não-metilados e os círculos pretos representam os CpGs metilados. Acima estão descritas as posições em relação ao sítio inicial de transcrição de *MAGE A1* para cada dinucleotídeo CpG. Avaliação das amostras do grupo experimental CCE 3, CCE 14 e CCE19.

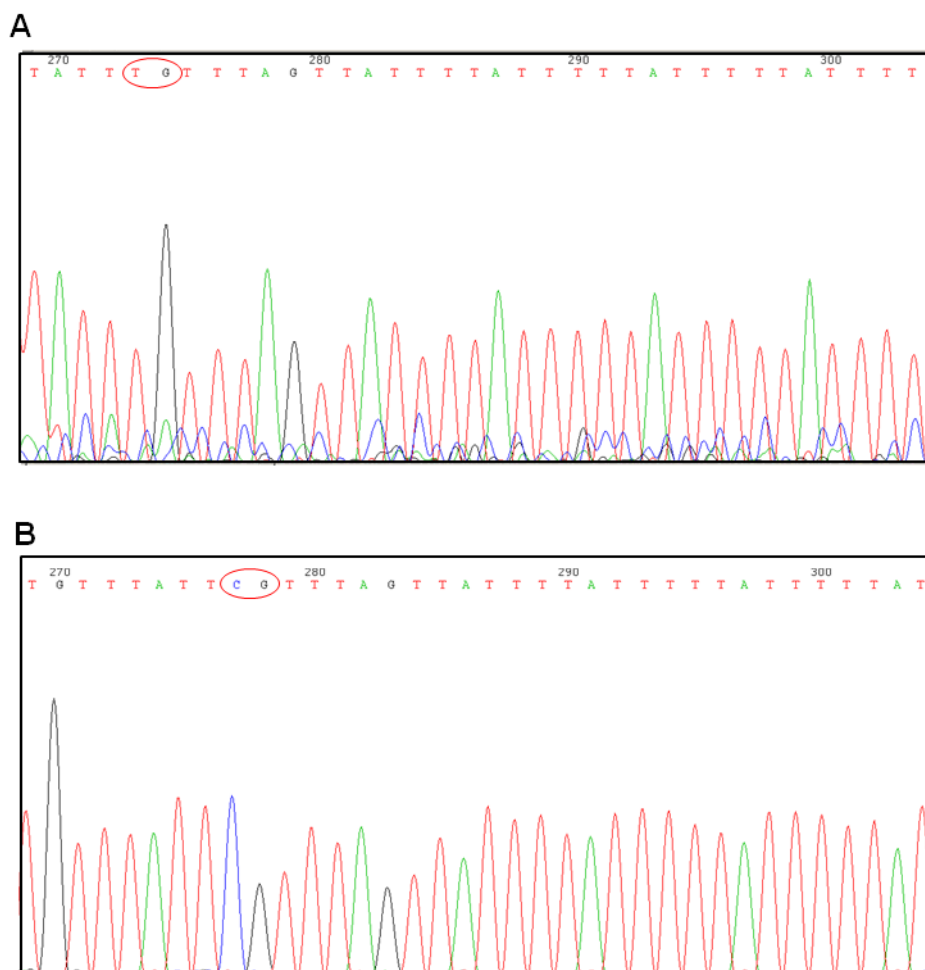
**Figura 18** - Perfil de metilação da região promotora do gene *MAGE A1* em amostras do grupo experimental (16 CpGs no total).

As amostras CCE 21 e CCE 25 que apresentaram *MAGE A1* expresso durante as análises por PCR convencional não foram avaliadas neste ensaio.

Não foi detectada a presença de hipometilação na região correspondente aos sítios de ligação dos fatores de transcrição *Ets* em nenhuma das amostras.

Em todas as amostras analisadas, a região correspondente à ilha CpG de *MAGE A1* (-85 a +41) apresentou-se fortemente metilada.

A amostra CCE 3 apresentou um número de CpGs hipometilados no quinto dinucleotídeo CpG, um pouco maior comparado com as demais amostras (Figura 18). Esta região equivale à posição -112 e corresponde ao sítio de ligação do fator de transcrição *Sp1*. A presença desta hipometilação no quinto nucleotídeo na amostra CCE3 pode ser melhor visualizada na Figura 19A, onde verificamos a presença do nucleotídeo timina (T), no lugar do nucleotídeo citosina (C) como é observado nesta mesma região na amostra do grupo controle 7N (Figura 19B).



**Legenda:** Análises por seqüenciamento após o tratamento com o bissulfito de sódio do DNA do clone 6 da amostra experimental CCE 3 (A) e do clone 2 da amostra do grupo controle 7N(B). A – Ausência de metilação no quinto CpG presente no clone 6 da amostra CC3 com a presença de timina (T) (circundado em vermelho) ; B – Presença de metilação no quinto CpG presente no segundo clone 2 da amostra N7 com a presença de citosina (C) (circundado em vermelho).

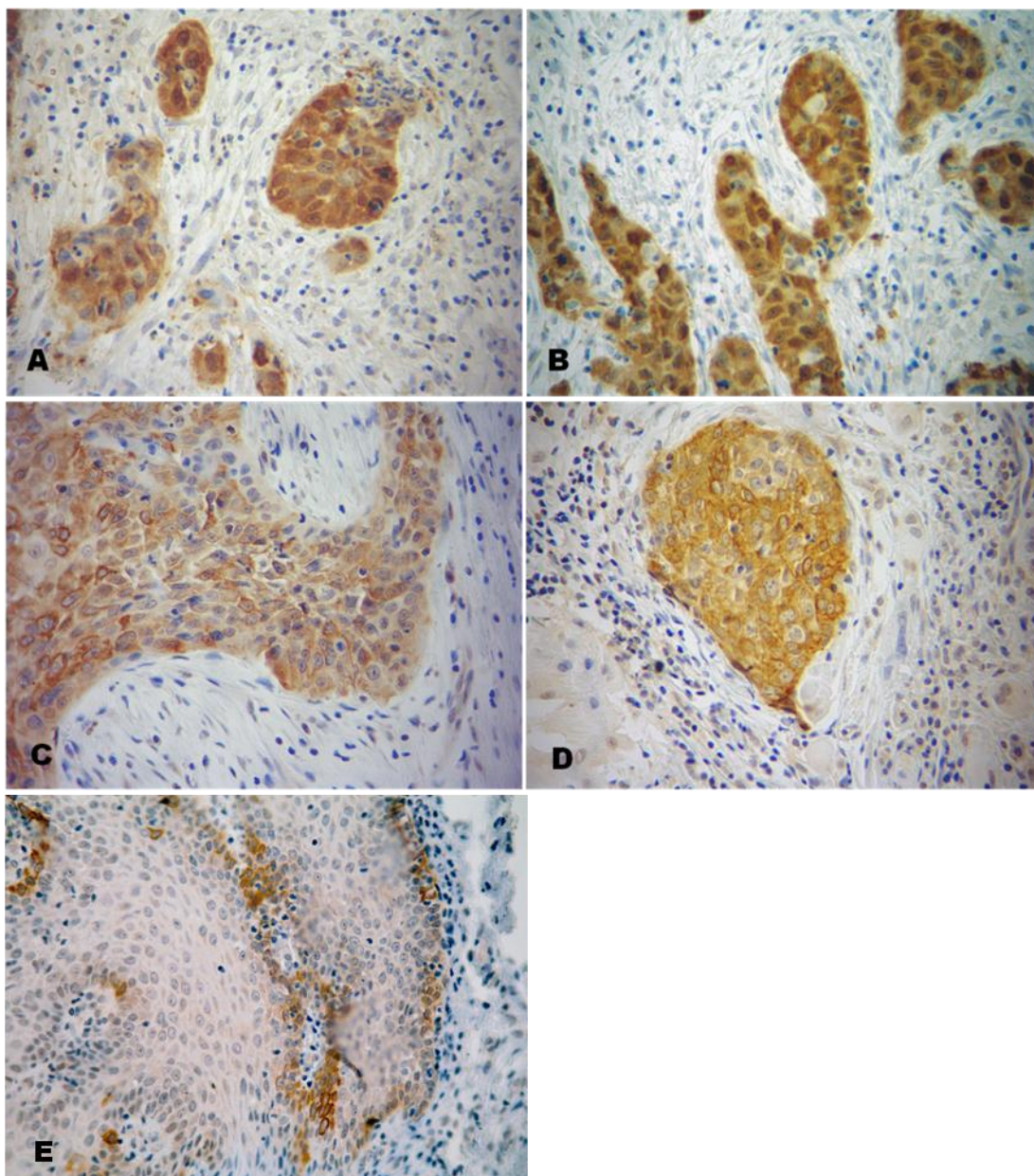
**Figura 19** – Cromatograma demonstrando o perfil de metilação encontrado no quinto dinucleotídeo CpG situado na posição -112 da região promotora de *MAGE A1*.

Em resumo, não foram encontradas diferenças entre o nível de hipometilação nas amostras do grupo controle e o nível de hipometilação nas amostras do grupo experimental.

#### **4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS *MAGE A1* E *BORIS* POR IMUNOISTOQUÍMICA**

Durante a avaliação por imunistoquímica, as amostras do grupo experimental apresentaram positividade para *MAGE A1* em 80% (16/20) dos casos, sendo observada uma marcação acastanhada no citoplasma das células tumorais (Figura 20A e 20B). Nenhuma das 10 amostras do grupo controle apresentou positividade para o anticorpo anti-*MAGE A1*.

A proteína *BORIS*, por sua vez, foi detectada em 100% (20/20) das amostras do grupo experimental. Foi observada, durante esta análise, marcação tanto citoplasmática, quanto nuclear (Figura 20C e 20D). A proteína *BORIS* também foi encontrada em 100% (10/10) das amostras do grupo controle. Esta positividade nas amostras do grupo controle, exclusivamente citoplasmática, foi observada distribuída entre as camadas basal e parabasal, com ocasionais células da camada intermediária apresentando marcação (Figura 20E).



**Legenda:** Análise da expressão da proteína MAGE A1 nas amostras CCE 22 (A) e CCE 31 (B); Análise da expressão da proteína BORIS nas amostras CCE 19 (C) e CCE 20 (D); Análise da expressão da proteína BORIS na amostra do grupo controle N10 (E).

**Figura 20** - Análise por imunistoquímica das proteínas MAGE A1 e BORIS em amostras do grupo experimental e do grupo controle.

Apesar da ausência dos transcritos de *MAGE A1* e *BORIS* na PCR convencional e na PCR em tempo real, as amostras do grupo experimental e

algumas amostras do grupo controle avaliadas neste estudo mostraram-se positivas para a presença destas proteínas na análise imunoistoquímica (Tabela 7).

**Tabela 7** - Análises de expressão de *MAGE A1* e *BORIS*

Amostra	<i>MAGE A1</i>			<i>BORIS</i>		
	IMUNO	PCR Tempo Real	PCR Convencional	IMUNO	PCR Tempo Real	PCR Convencional
<b>Grupo controle</b>						
N1	-	-	-	+	-	-
N2	-	-	-	+	-	-
N3	-	-	-	+	-	-
N4	-	-	-	+	-	-
N5	-	-	-	+	-	-
N6	-	-	-	+	-	-
N7	-	-	-	+	-	-
N8	-	-	-	+	-	-
N9	-	-	-	+	-	-
N10	-	-	-	+	-	-
<b>Grupo experimental</b>						
CCE1	+	n.r.	n.r.	+	n.r.	n.r.
CCE2	+	-	-	+	-	-
CCE3	+	-	-	+	-	-
CCE4	+	-	-	+	-	-
CCE5	+	-	-	+	-	-
CCE6	+	-	-	+	-	-
CCE7	-	-	n.r.	+	-	n.r.
CCE8	-	-	-	+	+	+
CCE9	-	-	-	+	-	-
CCE10	n.r.	-	-	n.r.	-	-
CCE11	n.r.	n.r.	-	n.r.	n.r.	-
CCE12	+	n.r.	-	+	n.r.	-
CCE13	+	n.r.	-	+	n.r.	-
CCE14	+	-	-	+	-	-
CCE15	+	n.r.	n.r.	+	n.r.	n.r.
CCE16	n.r.	n.r.	n.r.	+	n.r.	n.r.
CCE17	+	n.r.	-	-	n.r.	-
CCE18	+	-	-	+	-	-
CCE19	n.r.	-	-	n.r.	-	-
CCE20	+	-	-	+	-	-
CCE21	+	+	+	+	-	-
CCE22	+	-	n.r.	+	-	n.r.
CCE23	+	n.r.	-	+	n.r.	-
CCE24	-	n.r.	-	n.r.	n.r.	-
CCE25	n.r.	n.r.	+	n.r.	n.r.	-

**Legenda:** CCE - Carcinoma de células escamosas; N - amostra normal ; Imuno: imunoistoquímica; PCR reação em cadeia da polimerase; n.r. - experimento não realizado; (+) expressão positiva; (-) expressão negativa

## 5. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços nas pesquisas relacionadas às modalidades de tratamento do CCEB, nenhuma melhora foi observada nas duas últimas décadas, na taxa de sobrevivência de cinco anos desta doença, situada entre 45-50% (RIES et al. 2008). Isso talvez esteja relacionado com uma classificação inadequada do TNM ou com a inexistência de uma terapia mais eficaz (HOWALDT et al. 1999).

A imunoterapia vem a cada dia se tornando uma opção de tratamento atraente para o câncer de cabeça e pescoço (RAPIDIS e WOLF 2009). Entretanto, um antígeno adequado para a imunoterapia seria aquele cuja expressão fosse específica e estável na célula tumoral, que fosse crucial para a sobrevivência desta célula e que estivesse ausente nos tecidos normais (SIMPSON et al. 2005). Baseados nestas características, o descobrimento de proteínas denominadas CTAs impulsionaram ainda mais as pesquisas relacionadas à imunoterapia.

Neste estudo dois CTAs, *MAGE A1* e *BORIS*, foram selecionados para avaliação em amostras de CCEB. O gene *MAGE A1* foi selecionado em virtude de sua extensa descrição em diversos tipos de cânceres, presença de ilha CpG em sua região promotora e uma possível atividade de repressor transcricional. O gene *BORIS* foi selecionado em virtude de apresentar importante função de regulador transcricional, alterando padrões de *imprinting* pré-determinados, presença de ilha CpG em sua região promotora e a hipótese de ser um possível oncogene.

A avaliação do nível de RNAm destes genes por PCR em tempo real neste estudo, demonstrou ausência de *MAGE A1* e *BORIS* nas amostras do grupo controle e uma baixa expressão destes nas amostras experimentais. Em virtude das amostras do grupo controle não apresentarem expressão de nenhum destes dois genes analisados, o cálculo da expressão relativa pelo método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN 2001) ficou invalidado. Talvez o método de quantificação relativa proposto neste estudo não tenha sido adequado, sugerindo a busca por ferramentas mais específicas para efetuar esta análise.

MULLER-RICHTER et al. (2009) avaliaram as expressões de genes da família *MAGE A* em cinco linhagens de CCEB por PCR em tempo real. Esta expressão de *MAGE A*, em linhagens de CCEB, foi comparada com uma linhagem de queratinócitos adultos (NHEK). Para validar os valores obtidos, foram realizadas três medidas de cada gene e calculado o valor médio. As análises feitas por esses autores revelaram um aumento significativo da expressão destes genes nestas linhagens tumorais. Entretanto, alguns pontos no estudo de MULLER-RICHTER et al. (2009) devem ser levados em consideração: não foram utilizadas amostras tumorais, somente linhagens celulares; e a linhagem normal (NHEK) escolhida como referência apresentava expressão dos genes *MAGE A*. Isto pode explicar em parte os resultados divergentes dos que foram obtidos pelo ensaio de PCR em tempo real realizados neste presente estudo.

WEINERT et al. (2009) avaliaram quantitativamente a expressão de 74 CTAs em carcinoma de esôfago. Foram comparadas as expressões



relativas destes genes em 16 amostras tumorais em relação a oito amostras de tecido normal, utilizando o gene *GAPDH* como normalizador. Os resultados demonstraram que pelo menos cinco CTAs estavam expressos em 81% dos tumores. Entretanto, determinadas amostras normais também não apresentaram expressão de alguns CTAs, como foi o caso do gene *MAGE A1*. Nesses casos, os autores resolveram utilizar o valor de  $10^{-6}$  em relação à expressão do *GAPDH*. Eles estipularam este valor como sendo o valor limite para detecção e a partir dele, era determinado o cálculo da expressão. Este valor de corte  $10^{-6}$  foi escolhido por duas razões: foi o valor que mais se aproximava ao valor de expressão mínima que eles encontraram em seus experimentos e porque este foi o valor limite apresentado por estes genes (os que não foram detectados nos tecidos normais) durante experimentos de diluições.

Os resultados da avaliação por PCR convencional, neste presente estudo, demonstraram a ausência de transcritos de *MAGE A1* e *BORIS* no grupo controle e uma baixa expressão entre as amostras do grupo experimental.

A transcrição do gene *BORIS* inicia-se a partir de três diferentes promotores, o que pode sugerir que este gene provavelmente possua uma série de variantes *splice 5'* que não foram detectadas neste estudo.

Resultados semelhantes foram descritos por HINES et al. 2010 durante a avaliação da expressão de *BORIS* em linhagens e amostras de câncer de mama por PCR em tempo real e por PCR convencional. As análises por PCR em tempo real, realizadas por esses autores, detectaram a

amplificação tardia deste gene (próximo ao ciclo 40) em apenas uma amostra de linhagem tumoral e ausência dos transcritos deste gene nas demais linhagens e amostras tumorais. Já os ensaios por PCR convencional não detectaram a presença de *BORIS* em nenhuma das linhagens e amostras tumorais avaliadas.

Por outro lado, FIGUEIREDO et al. (2006) avaliando a presença dos transcritos da família *MAGEA* e de outros CTAs por PCR convencional, em pacientes portadores de CCE de cabeça e pescoço (15 casos localizados na cavidade bucal, 14 casos na laringe e quatro casos na faringe), encontraram *MAGE A1* expresso em 30,3% dos tumores. Entretanto, deve ser ressaltado que esta expressão observada pelos autores acima citados encontrava-se distribuída em diferentes sítios anatômicos da região da cabeça e pescoço, além da cavidade bucal.

Tem sido descrito que a hipometilação é o mecanismo responsável pela expressão destes dois genes avaliados, com a ativação de membros da família *MAGE* (DE et al. 1996; JANG et al. 2001; ROMAN-GOMEZ et al. 2007; WOLOSZYNSKA-READ et al. 2007) e com a regulação dos três promotores de *BORIS* (RENAUD et al. 2007).

A região delineada neste presente estudo como ilha CpG de *MAGE A1*, durante as análises de sequenciamento, mostrou-se bastante metilada nos dois grupos avaliados.

Importantes regiões regulatórias presentes na região promotora de *MAGE A1*, correspondentes aos sítios de ligação dos fatores de transcrição da família dos *Ets* e ao sítio de ligação de fatores *Sp1*, também foram

avaliadas neste presente estudo quanto à presença de hipometilação. No entanto, não foi observada a presença de hipometilação nos sítios de ligação dos fatores *Ets* em nenhuma amostra do grupo experimental, ou do grupo controle. E apesar de ter sido verificado um número maior de CpGs hipometilados na região do quinto dinucleotídeo CpG (sítio de ligação de *Sp1*) na amostra do grupo experimental CCE3, serão necessários seqüenciamento adicionais para a confirmação deste evento.

Os resultados de seqüenciamento da região promotora de *MAGE A1* no grupo experimental e no grupo controle revelaram, portanto, que os índices de hipometilação encontrados neste estudo parecem não explicar a expressão da proteína encontrada nos experimentos de imunistoquímica.

Diante da complexidade de efetuarmos o seqüenciamento de *BORIS*, este gene não entrou nesta análise. Isto porque a expressão de seus três diferentes promotores gênicos é específica para cada tipo de tecido. É necessário primeiramente, a realização de ensaios que avaliem qual dos promotores está sendo expresso nas amostras do grupo experimental e qual deles está sendo expresso nas amostras do grupo controle, antes de ser efetuado o seqüenciamento deste gene.

As análises por imunistoquímica para *MAGE A1*, realizadas neste estudo, demonstraram positividade em 80% nas amostras do grupo experimental e ausência desta proteína nas amostras do grupo controle.

Uma investigação de expressão de antígenos *MAGE A* por imunistoquímica em 47 amostras de CCEB primários realizada por MULLER-RICHTER et al. (2010) revelou que estes antígenos estavam

presentes em 55% das amostras avaliadas. Estes autores demonstraram que a presença da proteína MAGE A estava relacionada com um menor grau de diferenciação do tumor

Em outro estudo, a detecção da presença de proteínas de *MAGE A* também foi investigada em lesões benignas, cancerizáveis e malignas da mucosa bucal. As taxas de marcação para antígenos *MAGE-A* para lesões pré-cancerizáveis displásicas e lesões malignas variou de 33% a 65%. Segundo estes autores, os antígenos *MAGE A* provavelmente facilitariam a diferenciação de uma lesão pré-cancerizável à cancerizável na mucosa bucal (KRAUSS et al. 2010).

A avaliação por imunistoquímica de *BORIS*, realizada neste presente estudo, revelou a presença desta proteína em 100% das amostras do grupo experimental e também nas amostras do grupo controle.

Não existem muitos relatos da avaliação de *BORIS* por análises de imunistoquímica, no entanto, níveis de proteínas *BORIS* significativamente altos também foram encontrados em amostras de câncer de mama (D'ARCY et al. 2006). A marcação imunistoquímica demonstrou que 70,7% das amostras desse tipo de câncer foram positivas para esta proteína; que teve distribuição tanto citoplasmática quanto nuclear. Além disso, esses autores detectaram a presença dessa proteína em uma amostra de tecido normal periférico, que havia sido coletado durante a cirurgia de ressecção de tumor de um paciente.

O resultado encontrado neste estudo da presença da proteína BORIS em amostras do grupo controle requer investigações adicionais em um maior número de amostras para confirmação deste resultado.

Essa expressão-específica de CTAs em tecidos normais começa a ser discutida na literatura. SCANLAN et al. 2002 avaliaram a expressão de 44 genes CTAs por PCR semi-quantitativa em 16 tecidos normais. Os cDNAs resultantes para cada tecido eram quantificados em  $\mu\text{g}$ . Devido à sensibilidade do sistema, os valores de detecção estariam entre 0,01-2,0  $\mu\text{g}$  de cDNA. Os autores verificaram a expressão de *MAGE A1* em testículo (>2,0  $\mu\text{g}$  de cDNA) e pâncreas (0,02  $\mu\text{g}$ ). *BORIS* estava expresso no testículo (>2,0  $\mu\text{g}$ ), no pâncreas (0,03), na próstata (0,01), no timo (0,01) e no rim (0,02). Convém ressaltar que esses autores não avaliaram a cavidade oral.

HOFMANN et al. (2008) utilizando comparações de bibliotecas de cDNAs, avaliaram a expressão de 153 CTAs em tecidos tumorais e normais. Eles classificaram os CTAs em três grupos de acordo com sua expressão em tecidos normais: restritos ao testículo, restritos ao testículo/cérebro e testículo seletivos. O gene *MAGE A1* foi classificado pertencente ao grupo de CTAs restritos ao testículo e a nenhum outro tecido somático adulto (exceto placenta). O gene *BORIS* foi classificado como testículo-seletivo (razão entre a expressão deste gene em testículo e placenta em relação a outros tecidos somáticos). A expressão deste gene foi detectada em alguns tecidos somáticos. Novamente a cavidade oral não entrou nesta avaliação.

A co-expressão das proteínas de *MAGE A1* e *BORIS* encontrada neste estudo nas amostras do grupo experimental é um dado que também deve ser levado em consideração. Como já foi citado anteriormente, *BORIS* possui a capacidade de ativar outros CTAs, como por exemplo, o *MAGE A1* (VATOLIN et al. 2005). Promotores de CTAs que se encontravam metilados e reprimidos em células somáticas, tornam-se desmetilados e ativados em células de câncer, quando *BORIS* encontra-se expresso nestas células (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005). Essa co-expressão de *BORIS* com outros CTAs tem sido documentada em linhagens celulares de câncer e também em tumores primários de mama, próstata, colo-retal e pulmão (HONG et al. 2005; VATOLIN et al. 2005)

A co-expressão de CTAs já foi encontrada anteriormente em CCEB em um trabalho realizado por RIES et al. 2008 em que foram investigadas as presenças de *MAGE A1-A6* e *MAGE A12*. Não houve correlação entre esta co-expressão e os parâmetros clínico-patológicos, como por exemplo, classificação pelo TNM ou grau histológico. Entretanto, os autores desta pesquisa enfatizam a importância deste achado no auxílio à produção de vacinas polivalentes para CCEB (RIES et al. 2008).

A falta de correlação entre a presença das proteínas *MAGE A1* e *BORIS* e a ausência de transcritos nos experimentos de PCR convencional e em tempo real, realizados neste estudo, pode ser explicada pela presença de isoformas destes genes que não foram detectadas. Também precisamos ressaltar o fato de que os genes da família *MAGE* estão fortemente relacionados. O gene *MAGE A1* apresenta um percentual de homologia do

último exon (codificante) com aqueles presentes em outros genes *MAGE* de 64% a 85%. Assim proteínas *MAGE A2-A6* têm 57% de homologia com *MAGE A1* e *MAGE A8-MAGE A12* têm 77% de homologia com *MAGE A1*.

D'ARCY et al. (2008) investigando os níveis de expressão de *BORIS* em câncer de mama, também não encontraram associação entre a forte marcação imunohistoquímica e um nível baixo de RNAm observados em uma linhagem tumoral. Para estes autores, a natureza heterogênea dos tumores pode contribuir para essa falta de correlação entre os resultados de imunohistoquímica e os níveis de RNAm, pois partes diferentes de tecido são utilizadas para extração da proteína e do RNAm.

Para DHODAPKAR et al. (2003) existem discrepâncias entre os níveis de RNA e de proteínas durante as análises de expressão dos CTAs. Segundo ele, devido a uma grande homologia entre os vários CTAs, as reações-cruzadas de reagentes anti-CTAs não podem ser totalmente excluídas. Mas, até o momento, não foi encontrada nenhuma reação cruzada destes reagentes com nenhuma proteína que não pertencesse a essas famílias ou que não fosse um CTA.

Apesar de estar claro que a hipometilação é o mecanismo responsável pela expressão dos genes da família *MAGE A* em vários tipos de cânceres, os níveis de hipometilação que encontramos na região promotora de *MAGE A1* parecem não explicar a expressão deste gene em CCEB. A realização de novos seqüenciamentos com um maior número de amostras, talvez possa nos ajudar a compreender melhor este mecanismo. Embora os resultados encontrados durante a avaliação dos transcritos de

*MAGE A1* em CCEB não apontaram presença destes genes, os resultados que foram encontrados para este gene na imunoistoquímica reforça a necessidade de investigações adicionais, baseados em FIGUEIREDO et al. 2006 que cita a importância da identificação dessa população de pacientes, que poderá se tornar um alvo potencial para a imunoterapia. Como este antígeno não foi encontrado na mucosa normal, novos estudos são necessários para a sua validação como marcador tumoral. Além disso, é importante conhecer a relação entre a expressão deste antígeno com a transformação maligna encontrada em algumas lesões cancerizáveis da mucosa. A identificação da proteína *BORIS* em amostras normais coloca em xeque o papel deste CTA como um bom candidato à imunoterapia, mas por outro lado oferece uma nova perspectiva: a busca pelo conhecimento do real papel deste gene nos processos moleculares.



## 6. CONCLUSÕES

- A avaliação da expressão de *MAGE A1* e *BORIS* por PCR em Tempo Real, demonstrou expressão ausente e/ou baixa destes genes nas amostras de CCEB;
- Na avaliação por PCR convencional foi verificada também uma expressão ausente e/ou baixa de *BORIS* e de *MAGE A1* nas amostras de CCEB;
- Apesar de termos identificado a presença de alguns dinucleotídeos CGs hipometilados na região promotora de *MAGE A1* em amostras de CCEB, este nível de hipometilação foi também observado nas amostras de mucosa normal;
- Na avaliação por imunistoquímica, a proteína *MAGE A1* estava presente na maioria das amostras de CCEB e ausente nas amostras de mucosa normal, enquanto a proteína *BORIS* foi identificada tanto nas amostras de CCEB quanto nas amostras de mucosa normal.

## 7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akanuma D, Uzawa N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol** 1999; 35:476-83.
2. Albers AE, Strauss L, Liao T, Hoffmann TK, Kaufmann AM. T cell-tumor interaction directs the development of immunotherapies in head and neck cancer. **Clin Dev Immunol** 2010; 2010:236378.
3. Algarra I, Garcia-Lora A, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. **Cancer Immunol Immunother** 2004; 53:904-10.
4. Andrade VC, Vettore AL, Felix RS, Almeida MS, Carvalho F, Oliveira JS, Chauffaille ML, Andriolo A, Caballero OL, Zago MA, Colleoni GW. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. **Cancer Immun** 2008; 8:2.
5. Artamonova II e Gelfand MS. Evolution of the exon-intron structure and alternative splicing of the MAGE-A family of cancer/testis antigens. **J Mol Evol** 2004; 59:620-31.
6. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci** 2002; 59:241-57.
7. Ayyoub M, Taub RN, Keohan ML, Hesdorffer M, Mettetz G, Memeo L, Mansukhani M, Hibshoosh H, Hesdorffer CS, Valmori D. The frequent expression of cancer/testis antigens provides opportunities for immunotherapeutic targeting of sarcoma. **Cancer Immun** 2004; 4:7.
8. Barasch A, Safford M, Eisenberg E. Oral cancer and oral effects of anticancer therapy. **Mt Sinai J Med** 1998; 65:370-7.
9. Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. **Nat Clin Pract Oncol** 2005; 2 Suppl 1:S4-11.
10. Bedford MT e van Helden PD. Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. **Cancer Res** 1987; 47:5274-6.

11. Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. **Nature** 1999; 397:579-83.
12. Biazevic MG, Castellanos RA, Antunes JL, Michel-Crosato E. [Trends in oral cancer mortality in the city of Sao Paulo, Brazil, 1980-2002]. **Cad Saude Publica** 2006; 22:2105-14.
13. Bubenik J e Vonka V. MHC class I status of tumours and design of immunotherapeutic strategies. **Immunol Lett** 2003; 90:177-8.
14. Califano J, van der RP, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res** 1996; 56:2488-92.
15. Cao YX, Jean JC, Williams MC. Cytosine methylation of an Sp1 site contributes to organ-specific and cell-specific regulation of expression of the lung epithelial gene t1alpha. **Biochem J** 2000; 350 Pt 3:883-90.
16. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, Voravud N, Sriuranpong V, Mutirangura A. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. **Oncogene** 2004; 23:8841-6.
17. Chammas R, Silva DCP, Wainstein AJA, Abdallah KA. Imunologia Clínica das Neoplasias. In: J.C. Voltarelli; E.A. Donadi; I.F. de Carvalho; L. K. Arruda; P. Louzada Jr.; W. Sarti.. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p.447-60.
18. Chocolatewala NM e Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. **J Cancer Res Ther** 2009; 5:71-7.
19. Choi SW, Stickel F, Baik HW, Kim YI, Seitz HK, Mason JB. Chronic alcohol consumption induces genomic but not p53-specific DNA hypomethylation in rat colon. **J Nutr** 1999; 129:1945-50.
20. Cilensek ZM, Yehiely F, Kular RK, Deiss LP. A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers

- resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. **Cancer Biol Ther** 2002; 1:380-7.
21. D'Arcy V, Abdullaev ZK, Pore N, Docquier F, Torrano V, Chernukhin I, Smart M, Farrar D, Metodiev M, Fernandez N, Richard C, Delgado MD, Lobanenkov V, Klenova E. The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5978-86.
  22. D'Arcy V, Pore N, Docquier F, Abdullaev ZK, Chernukhin I, Kita GX, Rai S, Smart M, Farrar D, Pack S, Lobanenkov V, Klenova E. BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. **Br J Cancer** 2008; 98:571-9.
  23. Dadabayev AR, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Robinson WR, Lim SH. Cancer immunotherapy targeting Sp17: when should the laboratory findings be translated to the clinics? **Am J Hematol** 2005; 80:6-11.
  24. Das BR e Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. **Med Sci Monit** 2002; 8:RA258-RA267.
  25. Das PM e Singal R. DNA methylation and cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22:4632-42.
  26. De PE, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De SC, Bresseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, . Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. **Immunogenetics** 1994; 40:360-9.
  27. De SC, De BO, Faraoni I, Lurquin C, Bresseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:7149-53.
  28. Dhodapkar MV, Osman K, Teruya-Feldstein J, Filippa D, Hedvat CV, Iversen K, Kolb D, Geller MD, Hassoun H, Kewalramani T, Comenzo RL, Coplan K, Chen YT, Jungbluth AA. Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. **Cancer Immun** 2003; 3:9.

29. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene** 2002; 21:5400-13.
30. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** 2005; 45:629-56.
31. Eura M, Ogi K, Chikamatsu K, Lee KD, Nakano K, Masuyama K, Itoh K, Ishikawa T. Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. **Int J Cancer** 1995; 64:304-8.
32. Falaki F, Dalirsani Z, Pakfetrat A, Falaki A, Saghravanian N, Nosratzahi T, Pazouki M. Clinical and histopathological analysis of oral Squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2010.
33. Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. **Head Neck Oncol** 2009; 1:5.
34. Figueiredo DL, Mamede RC, Proto-Siqueira R, Neder L, Silva WA, Jr., Zago MA. Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas. **Head Neck** 2006; 28:614-9.
35. Fonsatti E, Sigalotti L, Coral S, Colizzi F, Altomonte M, Maio M. Methylation-regulated expression of HLA class I antigens in melanoma. **Int J Cancer** 2003; 105:430-1.
36. Fowler BM, Giuliano AR, Piyathilake C, Nour M, Hatch K. Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1998; 7:901-6.
37. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer** 1989; 43:992-1000.
38. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, Dallal GE, Choi SW, Keyes MK, Jang H, Liu Z, Nadeau M, Johnston A, Mager D, Mason JB. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. **Am J Clin Nutr** 2006; 83:835-41.

39. Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. **Nucleic Acids Res** 1983; 11:6883-94.
40. Gardiner-Garden M e Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.
41. Ghafouri-Fard S e Modarressi MH. Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy. **Arch Iran Med** 2009; 12:395-404.
42. Herman JG e Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. **Curr Top Microbiol Immunol** 2000; 249:35-54.
43. Hines WC, Bazarov AV, Mukhopadhyay R, Yaswen P. BORIS (CTCF) is not expressed in most human breast cell lines and high grade breast carcinomas. **PLoS One** 2010; 5:e9738.
44. Hofmann O, Caballero OL, Stevenson BJ, Chen YT, Cohen T, Chua R, Maher CA, Panji S, Schaefer U, Kruger A, Lehvaslaiho M, Carninci P, Hayashizaki Y, Jongeneel CV, Simpson AJ, Old LJ, Hide W. Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:20422-7.
45. Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR, Adnani MT, Loukinov DI, Vatolin S, Risinger JI, Custer M, Chen GA, Zhao M, Nguyen DM, Barrett JC, Lobanenko VV, Schrupp DS. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. **Cancer Res** 2005; 65:7763-74.
46. Howaldt HP, Kainz M, Euler B, Vorast H. Proposal for modification of the TNM staging classification for cancer of the oral cavity. DOSAK. **J Craniomaxillofac Surg** 1999; 27:275-88.
47. Jang SJ, Soria JC, Wang L, Hassan KA, Morice RC, Walsh GL, Hong WK, Mao L. Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis. **Cancer Res** 2001; 61:7959-63.

48. Jelinic P, Stehle JC, Shaw P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. **PLoS Biol** 2006; 4:e355.
49. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, Karavidas K, Jay A, Sandison A, Thomas GJ, Kalavrezos N, Hopper C. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. **Head Neck Oncol** 2010; 2:9.
50. Jeronimo C, Costa I, Martins MC, Monteiro P, Lisboa S, Palmeira C, Henrique R, Teixeira MR, Lopes C. Detection of gene promoter hypermethylation in fine needle washings from breast lesions. **Clin Cancer Res** 2003; 9:3413-7.
51. Jones PA e Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 3:415-28.
52. Jost JP. Nuclear extracts of chicken embryos promote an active demethylation of DNA by excision repair of 5-methyldeoxycytidine. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1993; 90:4684-8.
53. Karpf AR. A potential role for epigenetic modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy. **Epigenetics** 2006; 1:116-20.
54. Kienstra MA, Neel HB, Strome SE, Roche P. Identification of NY-ESO-1, MAGE-1, and MAGE-3 in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2003; 25:457-63.
55. Kim KH, Choi JS, Kim IJ, Ku JL, Park JG. Promoter hypomethylation and reactivation of MAGE-A1 and MAGE-A3 genes in colorectal cancer cell lines and cancer tissues. **World J Gastroenterol** 2006; 12:5651-7.
56. Kisseljova NP e Kisseljov FL. DNA demethylation and carcinogenesis. **Biochemistry (Mosc )** 2005; 70:743-52.
57. Klenova EM, Morse HC, III, Ohlsson R, Lobanenko VV. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. **Semin Cancer Biol** 2002; 12:399-414.

58. Kowalski LP, Carvalho AL, Martins Priante AV, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2005; 41:534-41.
59. Krauss E, Rauthe S, Gattenlohner S, Reuther T, Kochel M, Kriegebaum U, Kubler AC, Muller-Richter UD. MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa. **Clin Oral Investig** 2010.
60. Laduron S, Deplus R, Zhou S, Kholmanskikh O, Godelaine D, De SC, Hayward SD, Fuks F, Boon T, De PE. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. **Nucleic Acids Res** 2004; 32:4340-50.
61. Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC, Yu TH. Expression of the MAGE 3 gene product in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Anticancer Res** 1999; 19:5037-42.
62. Lessa RC. Identificação de genes hiperexpressos em carcinomas epidermóides de cavidade oral. 2007. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 119p.
63. Lin CH, Hsieh SY, Sheen IS, Lee WC, Chen TC, Shyu WC, Liaw YF. Genome-wide hypomethylation in hepatocellular carcinogenesis. **Cancer Res** 2001; 61:4238-43.
64. Livak KJ e Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. **Methods** 2001; 25:402-8.
65. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. **Oral Oncol** 2003; 39:106-14.
66. Lothaire P, de AE, Dequanter D, Lalami Y, Sotiriou C, Andry G, Castro G, Jr., Awada A. Molecular markers of head and neck squamous cell carcinoma: promising signs in need of prospective evaluation. **Head Neck** 2006; 28:256-69.



67. Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I, Mannan P, Larsson E, Kanduri C, Vostrov AA, Cui H, Niemitz EL, Rasko JE, Docquier FM, Kistler M, Breen JJ, Zhuang Z, Quitschke WW, Renkawitz R, Klenova EM, Feinberg AP, Ohlsson R, Morse HC, III, Lobanenkov VV. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:6806-11.
68. Maio M, Coral S, Fratta E, Altomonte M, Sigalotti L. Epigenetic targets for immune intervention in human malignancies. **Oncogene** 2003; 22:6484-8.
69. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006; 102:67-76.
70. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. 2009. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCA);
71. Monte M, Simonatto M, Peche LY, Bublik DR, Gobessi S, Pierotti MA, Rodolfo M, Schneider C. MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2006; 103:11160-5.
72. Muller-Richter UD, Dowejko A, Peters S, Rauthe S, Reuther T, Gattenlohner S, Reichert TE, Driemel O, Kubler AC. MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma. **Clin Oral Investig** 2010; 14:291-6.
73. Muller-Richter UD, Dowejko A, Reuther T, Kleinheinz J, Reichert TE, Driemel O. Analysis of expression profiles of MAGE-A antigens in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Head Face Med** 2009; 5:10.
74. Neville BW e Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin** 2002; 52:195-215.

75. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. **Int J Cancer** 1993; 54:594-606.
76. Patra SK, Patra A, Rizzi F, Ghosh TC, Bettuzzi S. Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. **Cancer Metastasis Rev** 2008; 27:315-34.
77. Pogribny IP e Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. **Cell Mol Life Sci** 2009; 66:2249-61.
78. Rapidis AD e Wolf GT. Immunotherapy of head and neck cancer: current and future considerations. **J Oncol** 2009; 2009:346345.
79. Renaud S, Pugacheva EM, Delgado MD, Braunschweig R, Abdullaev Z, Loukinov D, Benhattar J, Lobanenko V. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. **Nucleic Acids Res** 2007; 35:7372-88.
80. Ries J, Vairaktaris E, Mollaoglu N, Wiltfang J, Neukam FW, Nkenke E. Expression of melanoma-associated antigens in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2008; 37:88-93.
81. Rodenhiser D e Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ** 2006; 174:341-8.
82. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, San Jose-Eneriz E, Garate L, Cordeu L, Cervantes F, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Epigenetic regulation of human cancer/testis antigen gene, HAGE, in chronic myeloid leukemia. **Haematologica** 2007; 92:153-62.
83. Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In: Sambrook J, Russel D. editors. Third Edition ed. Cold Spring Harbor, New York: 2001. p.
84. Scanlan MJ, Gordon CM, Williamson B, Lee SY, Chen YT, Stockert E, Jungbluth A, Ritter G, Jager D, Jager E, Knuth A, Old LJ. Identification

- of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis. **Int J Cancer** 2002; 98:485-92.
85. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. **Cancer Immun** 2004; 4:1.
  86. Schantz SP e Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002; 128:268-74.
  87. Scully C e Porter S. ABC of oral health. Oral cancer. **BMJ** 2000; 321:97-100.
  88. Shah JP e Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. **CA Cancer J Clin** 1995; 45:352-68.
  89. Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. **J Am Dent Assoc** 2001; 132 Suppl:7S-11S.
  90. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:615-25.
  91. Singal R e Ginder GD. DNA methylation. **Blood** 1999; 93:4059-70.
  92. Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. **Int J Cancer** 2007; 121:1724-8.
  93. Stevenson BJ, Iseli C, Panji S, Zahn-Zabal M, Hide W, Old LJ, Simpson AJ, Jongeneel CV. Rapid evolution of cancer/testis genes on the X chromosome. **BMC Genomics** 2007; 8:129.
  94. Tan NY e Khachigian LM. Sp1 phosphorylation and its regulation of gene transcription. **Mol Cell Biol** 2009; 29:2483-8.
  95. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D, Shadravan F, Hintz M, Kuo WL, . Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. **Cancer Res** 1994; 54:4257-60.

96. Tureci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Scmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Rammensee HG, Pfreundschuh M. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. **Cancer Res** 1996; 56:4766-72.
97. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De PE, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. **Science** 1991; 254:1643-7.
98. van BN, Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, Andre M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli GC, Bakkus M, Thielemans K, Boon T. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. **Blood** 1999; 94:1156-64.
99. Vatolin S, Abdullaev Z, Pack SD, Flanagan PT, Custer M, Loukinov DI, Pugacheva E, Hong JA, Morse H, III, Schrupp DS, Risinger JI, Barrett JC, Lobanenko VV. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. **Cancer Res** 2005; 65:7751-62.
100. Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2003; 105:41-6.
101. Weinert BT, Krishnadath KK, Milano F, Pedersen AW, Claesson MH, Zocca MB. Real-time PCR analysis of genes encoding tumor antigens in esophageal tumors and a cancer vaccine. **Cancer Immun** 2009; 9:9.
102. Woloszynska-Read A, James SR, Link PA, Yu J, Odunsi K, Karpf AR. DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCF expression in ovarian cancer. **Cancer Immun** 2007; 7:21.
103. Xiao J, Chen HS, Fei R, Cong X, Wang LP, Wang Y, Jiang D, Wei L, Wang Y. Expression of MAGE-A1 mRNA is associated with gene

- hypomethylation in hepatocarcinoma cell lines. **J Gastroenterol** 2005; 40:716-21.
104. Zhang J, Yu J, Gu J, Gao BM, Zhao YJ, Wang P, Zhang HY, De ZJ. A novel protein-DNA interaction involved with the CpG dinucleotide at -30 upstream is linked to the DNA methylation mediated transcription silencing of the MAGE-A1 gene. **Cell Res** 2004; 14:283-94.
  105. Znaor A, Brennan P, Gajalakshmi V, Mathew A, Shanta V, Varghese C, Boffetta P. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. **Int J Cancer** 2003; 105:681-6.
  106. Zygogianni AG, Kyrgias G, Karakitsos P, Psyrris A, Kouvaris J, Kelekis N, Kouloulis V. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. **Head Neck Oncol** 2011; 3:2.

***ANEXOS***

---

**Anexo 1** - Classificação clínica (TNM) para o câncer de cavidade oral baseada na extensão do tumor primário, na ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.

Extensão do Tumor Primário		Linfonodos Regionais		Metástase à Distância	
T	Tumor Primário	N	Linfonodos Regionais	M	Metástase à Distância
TX	O tumor primário não pode ser avaliado	NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados	MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
T0	Não há evidência de tumor primário	N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais	M0	Ausência de metástase à distância
Tis	Carcinoma in situ	N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão	M1	Metástase à distância
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão	N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão		
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão	N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão,		
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão	N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão		
T4a	(Cavidade oral) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face	N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão		
T4b	(Lábio e cavidade oral): Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna	N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão		

**Anexo 2** - Grupamento de Estádios para o câncer de cavidade oral baseada na classificação clínica (TNM) - extensão do tumor primário, presença ou ausência de comprometimento de linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.

Grupamento por Estádios	
Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T Qualquer N M1



### Anexo 3 - Lista de todos os CTAs

<b>Gene family</b>	<b>Family member</b>	<b>Chromosomal localization</b>	<b>CT identifier</b>
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA1</i>	Xq28	CT1.1
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA2</i>	Xq28	CT1.2
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA2B</i>	Xq28	
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA3</i>	Xq28	CT1.3
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA4</i>	Xq28	CT1.4
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA5</i>	Xq28	CT1.5
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA6</i>	Xq28	CT1.6
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA8</i>	Xq28	CT1.8
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA9</i>	Xq28	CT1.9
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA9B/LOC728269</i>	Xq28	
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA10</i>	Xq28	CT1.10
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA11</i>	Xq28	CT1.11
<i>MAGEA</i>	<i>MAGEA12</i>	Xq28	CT1.12
<i>BAGE</i>	<i>BAGE</i>	21p11.1	CT2.1
<i>BAGE</i>	<i>BAGE2</i>	21p11.1	CT2.2
<i>BAGE</i>	<i>BAGE3</i>	21p11.1	CT2.3
<i>BAGE</i>	<i>BAGE4</i>	21p11.1	CT2.4
<i>BAGE</i>	<i>BAGE5</i>	21p11.1	CT2.5
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB1</i>	Xp21.3	CT3.1
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB2</i>	Xp21.3	CT3.2
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB3</i>	Xp21.3	CT3.5
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB4</i>	Xp21.3	CT3.6
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB5</i>	Xp21.3	CT3.3
<i>MAGEB</i>	<i>MAGEB6</i>	Xp21.3	CT3.4
<i>GAGE</i>	<i>GAGE1</i>	Xp11.4-p11.2	CT4.1
<i>GAGE</i>	<i>GAGE2A</i>	Xp11.23	CT4.2
<i>GAGE</i>	<i>GAGE3</i>	Xp11.23	CT4.3
<i>GAGE</i>	<i>GAGE4</i>	Xp11.4-p11.2	CT4.4
<i>GAGE</i>	<i>GAGE5</i>	Xp11.4-p11.2	CT4.5
<i>GAGE</i>	<i>GAGE6</i>	Xp11.4-p11.2	CT4.6
<i>GAGE</i>	<i>GAGE7</i>	Xp11.4-p11.2	CT4.7
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12I</i>	Xp11.4-p11.2	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE8</i>	Xp11.23	CT4.8
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12J</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE13</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12B</i>	Xp11.23	

<i>GAGE</i>	<i>GAGE12C</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12D</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12E</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12F</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12G</i>	Xp11.23	
<i>GAGE</i>	<i>GAGE12H</i>	Xp11.23	
<i>SSX</i>	<i>SSX1</i>	Xp11.23-p11.22	CT5.1
<i>SSX</i>	<i>SSX2</i>	Xp11.22	CT5.2a
<i>SSX</i>	<i>SSX2b</i>	Xp11.22	CT5.2b
<i>SSX</i>	<i>SSX3</i>	Xp11.23	CT5.3
<i>SSX</i>	<i>SSX4</i>	Xp11.23	CT5.4
<i>SSX</i>	<i>SSX4B</i>	Xp11.23	
<i>SSX</i>	<i>SSX5</i>	Xp11.23	
<i>SSX</i>	<i>SSX6</i>	Xp11.2	
<i>SSX</i>	<i>SSX7</i>	Xp11.23	
<i>SSX</i>	<i>SSX9</i>	Xp11.23	
<i>NY-ESO-1</i>	<i>CTAG1B</i>	Xq28	CT6.1
<i>NY-ESO-1</i>	<i>CTAG1A</i>	Xq28	
<i>NY-ESO-1</i>	<i>CTAG2</i>	Xq28	CT6.2a
<i>NY-ESO-1</i>	<i>LAGE-1b</i>	Xq28	CT6.2b
<i>MAGEC1</i>	<i>MAGEC1</i>	Xq26	CT7.1
<i>MAGEC1</i>	<i>MAGEC3</i>	Xq27.2	CT7.2
<i>ATAD2</i>	<i>ATAD2</i>	8q24.13	137
<i>SYCP1</i>	<i>SYCP1</i>	1p13-p12	CT8
<i>ZNF645</i>	<i>ZNF645</i>	Xp22.11	138
<i>BRDT</i>	<i>BRDT</i>	1p22.1	CT9
<i>MAGEC2</i>	<i>MAGEC2</i>	Xq27	CT10
<i>SPANX</i>	<i>SPANXA1</i>	Xq27.1	CT11.1
<i>SPANX</i>	<i>SPANXA2</i>	Xq27.1	
<i>SPANX</i>	<i>SPANXB1</i>	Xq27.1	CT11.2
<i>SPANX</i>	<i>SPANXB2</i>	Xq27.1	
<i>SPANX</i>	<i>SPANXC</i>	Xq27.1	CT11.3
<i>SPANX</i>	<i>SPANXD</i>	Xq27.1	CT11.4
<i>SPANX</i>	<i>SPANXE</i>	Xq27.2	
<i>SPANX</i>	<i>SPANXN1</i>	Xq27	CT11.6
<i>SPANX</i>	<i>SPANXN2</i>	Xq27.3	CT11.7
<i>SPANX</i>	<i>SPANXN3</i>	Xq27.3	CT11.8
<i>SPANX</i>	<i>SPANXN4</i>	Xq27.3	CT11.9
<i>SPANX</i>	<i>SPANXN5</i>	Xp11.22	CT11.10
<i>XAGE</i>	<i>XAGE1</i>	Xp11.22	CT12.1a
<i>XAGE</i>	<i>XAGE1B</i>	Xp11.22	CT12.1b

<i>XAGE</i>	<i>XAGE1C</i>	Xp11.22	CT12.1c
<i>XAGE</i>	<i>XAGE1D</i>	Xp11.22	CT12.1d
<i>XAGE</i>	<i>XAGE1E</i>	Xp11.22	
<i>XAGE</i>	<i>XAGE2</i>	Xp11.22	CT12.2
<i>XAGE</i>	<i>XAGE2B/CTD-2267G17.3</i>	Xp11.22	
<i>XAGE</i>	<i>XAGE3</i>	Xp11.22-p11.21	CT12.3a
<i>XAGE</i>	<i>XAGE-3b</i>	Xp11.22	CT12.3b
<i>XAGE</i>	<i>XAGE-4/RP11-167P23.2</i>	Xp11.21	CT12.4
<i>XAGE</i>	<i>XAGE5</i>	Xp11.22	CT12.5
<i>HAGE</i>	<i>DDX43</i>	6q12-q13	CT13
<i>SAGE</i>	<i>SAGE1</i>	Xq26	CT14
<i>ADAM2</i>	<i>ADAM2</i>	8p11.2	CT15
<i>PAGE-5</i>	<i>PAGE5</i>	Xp11.21	CT16.1
<i>PAGE-5</i>	<i>CT16.2</i>	X911.21	CT16.2
<i>PAGE-5</i>	<i>PAGE1</i>	Xp11.23	CT16.3
<i>PAGE-5</i>	<i>PAGE2</i>	Xp11.21	CT16.4
<i>PAGE-5</i>	<i>PAGE2B</i>	Xp11.21	CT16.5
<i>PAGE-5</i>	<i>PAGE3</i>	Xp11.21	CT16.6
<i>PAGE-5</i>	<i>PAGE4</i>	Xp11.23	CT16.7
<i>LIPI</i>	<i>LIPI</i>	21q11.2	CT17
<i>NA88A pseudogene</i>	<i>VENTXP1</i>	Xp21.3	CT18
<i>IL13RA</i>	<i>IL13RA2</i>	Xq13.1-q28	CT19
<i>TSP50</i>	<i>TSP50</i>	3p14-p12	CT20
<i>CTAGE-1</i>	<i>CTAGE1</i>	18p11.2	CT21.1
<i>CTAGE-1</i>	<i>CTAGE-2</i>	18p11.2	CT21.2
<i>CTAGE-1</i>	<i>CTAGE5</i>	14q13.3	CT21.3
<i>SPA17</i>	<i>SPA17</i>	11q24.2	CT22
<i>ACRBP</i>	<i>ACRBP</i>	12p13.31	CT23
<i>CSAGE</i>	<i>CSAG1</i>	Xq28	CT24.1
<i>CSAGE</i>	<i>CSAG2</i>	Xq28	CT24.2
<i>CSAGE</i>	<i>CSAG3B</i>	Xq28	
<i>MMA1</i>	<i>DSCR8</i>	21q22.2	CT25.1a
<i>MMA1</i>	<i>MMA1b</i>	21q22.2	CT25.1b
<i>CAGE</i>	<i>DDX53</i>	Xp22.11	CT26
<i>BORIS</i>	<i>CTCFL</i>	20q13.31	CT27
<i>HOM-TES-85</i>	<i>LUZP4</i>	Xq23	CT28
<i>AF15q14</i>	<i>CASC5</i>	15q14	CT29
<i>HCA661</i>	<i>TFDP3</i>	Xq26.2	CT30
<i>JARID1B</i>	<i>JARID1B</i>	1q32.1	CT31
<i>LDHC</i>	<i>LDHC</i>	11p15.5-p15.3	CT32
<i>MORC</i>	<i>MORC1</i>	3q13	CT33

<i>SGY-1</i>	<i>DKKL1</i>	19q13.33	CT34
<i>SPO11</i>	<i>SPO11</i>	20q13.2-q13.3	CT35
<i>TPX1</i>	<i>CRISP2</i>	6p21-qter	CT36
<i>NY-SAR-35</i>	<i>FMR1NB</i>	Xq27.3-q28	CT37
<i>FTHL17</i>	<i>FTHL17</i>	Xp21	CT38
<i>NXF2</i>	<i>NXF2</i>	Xq22.1	CT39
<i>NXF2</i>	<i>NXF2B</i>	Xq22.1	
<i>TAF7L</i>	<i>TAF7L</i>	Xq22.1	CT40
<i>TDRD1</i>	<i>TDRD1</i>	10q25.3	CT41.1
<i>TDRD1</i>	<i>TDRD6</i>	6p12.3	CT41.2
<i>TEX15</i>	<i>TEX15</i>	8p12	CT42
<i>FATE</i>	<i>FATE1</i>	Xq28	CT43
<i>TPTE</i>	<i>TPTE</i>	21p11	CT44
<i>CT45</i>	<i>CT45A1</i>	Xq26.3	CT45.1
<i>CT45</i>	<i>CT45A2</i>	Xq26.3	CT45.2
<i>CT45</i>	<i>CT45A3</i>	Xq26.3	CT45.3
<i>CT45</i>	<i>CT45A4</i>	Xq26.3	CT45.4
<i>CT45</i>	<i>CT45A5</i>	Xq26.3	CT45.5
<i>CT45</i>	<i>CT45A6</i>	Xq26.3	CT45.6
<i>HORMAD1</i>	<i>HORMAD1</i>	1q21.2	CT46
<i>CT47</i>	<i>CT47A1</i>	Xq24	CT47.1
<i>CT47</i>	<i>CT47A2</i>	Xq24	CT47.2
<i>CT47</i>	<i>CT47A3</i>	Xq24	CT47.3
<i>CT47</i>	<i>CT47A4</i>	Xq24	CT47.4
<i>CT47</i>	<i>CT47A5</i>	Xq24	CT47.5
<i>CT47</i>	<i>CT47A6</i>	Xq24	CT47.6
<i>CT47</i>	<i>CT47A7</i>	Xq24	CT47.7
<i>CT47</i>	<i>CT47A8</i>	Xq24	CT47.8
<i>CT47</i>	<i>CT47A9</i>	Xq24	CT47.9
<i>CT47</i>	<i>CT47A10</i>	Xq24	CT47.10
<i>CT47</i>	<i>CT47A11</i>	Xq24	CT47.11
<i>CT47</i>	<i>CT47B1</i>	Xq24	CT47.13
<i>SLCO6A1</i>	<i>SLCO6A1</i>	5q21.1	CT48
<i>TAG</i>	<i>TAG</i>	5p15.2	CT49
<i>LEMD1</i>	<i>LEMD1</i>	1q32.1	CT50
<i>HSPB9</i>	<i>HSPB9</i>	17q21.2	CT51
<i>CCDC110</i>	<i>CCDC110</i>	4q35.1	CT52
<i>ZNF165</i>	<i>ZNF165</i>	6p21.3	CT53
<i>SPACA3</i>	<i>SPACA3</i>	17q11.2	CT54
<i>CXorf48</i>	<i>CXorf48</i>	Xq26.3	CT55
<i>THEG</i>	<i>THEG</i>	19pter-p13	CT56

<i>ACTL8</i>	<i>ACTL8</i>	1p36.2-p35	CT57
<i>NLRP4</i>	<i>NLRP4</i>	19q13.42	CT58
<i>COX6B2</i>	<i>COX6B2</i>	19q13.42	CT59
<i>LOC348120</i>	<i>LOC348120</i>	15q11.2	CT60
<i>CCDC33</i>	<i>CCDC33</i>	15q24.1	CT61
<i>LOC196993</i>	<i>LOC196993</i>	15q23	CT62
<i>PASD1</i>	<i>PASD1</i>	Xq28	CT63
<i>LOC647107</i>	<i>LOC647107</i>	3q26.1	CT64
<i>TULP2</i>	<i>TULP2</i>	19q13.1	CT65
<i>CT66</i>	<i>CT66/AA884595</i>	7q11.22	CT66
<i>PRSS54</i>	<i>PRSS54</i>	16q21	CT67
<i>RBM46</i>	<i>RBM46</i>	4q32.1	CT68
<i>CT69</i>	<i>CT69/BC040308</i>	6q23.2	CT69
<i>CT70</i>	<i>CT70/BI818097</i>	Unknown	CT70
<i>SPINLW1</i>	<i>SPINLW1</i>	20q12-q13.2	CT71
<i>TSSK6</i>	<i>TSSK6</i>	19p13.11	CT72
<i>ADAM29</i>	<i>ADAM29</i>	4q34	CT73
<i>CCDC36</i>	<i>CCDC36</i>	3p21.31	CT74
<i>LOC440934</i>	<i>LOC440934</i>	2q36.1	CT75
<i>SYCE1</i>	<i>SYCE1</i>	10q26.3	CT76
<i>CPXCR1</i>	<i>CPXCR1</i>	Xq21.3	CT77
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY3</i>	Yp11.2	CT78
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY2</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>LOC728137</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY1D</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY1E</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY1F</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY1G</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY1H</i>	Yp11.2	
<i>TSPY1</i>	<i>TSPY1I</i>	Yp11.2	
<i>TSGA10</i>	<i>TSGA10</i>	2q11.2	CT79
<i>PIWIL2</i>	<i>PIWIL2</i>	8p21.3	CT80
<i>ARMC3</i>	<i>ARMC3</i>	10p12.31	CT81
<i>AKAP3</i>	<i>AKAP3</i>	12p13.3	CT82
<i>Cxorf61</i>	<i>Cxorf61</i>	Xq23	CT83
<i>PBK</i>	<i>PBK</i>	8p21.2	CT84
<i>C21orf99</i>	<i>C21orf99</i>	21q11.2	CT85
<i>OIP5</i>	<i>OIP5</i>	15q15.1	CT86
<i>CEP290</i>	<i>CEP290</i>	12q21.32	CT87
<i>CABYR</i>	<i>CABYR</i>	18q11.2	CT88
<i>SPAG9</i>	<i>SPAG9</i>	17q21.33	CT89

<i>MPHOSPH1</i>	<i>MPHOSPH1</i>	10q23.31	CT90
<i>ROPN1</i>	<i>ROPN1</i>	3q21.1	CT91
<i>PLAC1</i>	<i>PLAC1</i>	Xq26	CT92
<i>CALR3</i>	<i>CALR3</i>	19p13.11	CT93
<i>PRM</i>	<i>PRM2</i>	16p13.2	CT94.2
<i>PRM</i>	<i>PRM1</i>	16p13.2	CT94.1
<i>CAGE1</i>	<i>CAGE1</i>	6p24.3	CT95
<i>CT96</i>	<i>TTK</i>	6q13-q21	CT96
<i>LY6K</i>	<i>LY6K</i>	8q24.3	CT97
<i>IMP-3</i>	<i>IMP-3</i>	7p11	CT98
<i>AKAP4</i>	<i>AKAP4</i>	Xp11.2	CT99
<i>DPPA2</i>	<i>DPPA2</i>	3q13.13	CT100
<i>KIAA0100/MLAA-22</i>	<i>KIAA0100</i>	17q11.2	CT 101
<i>DCAF12</i>	<i>DCAF12</i>	9p13.3	CT102
<i>SEMG1</i>	<i>SEMG1</i>	20q12-q13.2	CT103
<i>POTE</i>	<i>POTED</i>	21q11.2	CT104.1
<i>POTE</i>	<i>POTEE</i>	2q21.1	CT104.2
<i>POTE</i>	<i>POTEA</i>	8p11.1	CT104.3
<i>POTE</i>	<i>POTEB</i>	15q11.2	CT104.5
<i>POTE</i>	<i>POTEG</i>	14q11.1	CT104.4
<i>POTE</i>	<i>POTEC</i>	18p11.21	CT104.6
<i>POTE</i>	<i>POTEH</i>	22q11.1	CT104.7
<i>GOLGAGL2 FA</i>	<i>GOLGAGL2 FA</i>	15q11.2	CT105
<i>NUF2/CDCA1</i>	<i>CDCA1</i>	1q23.3	CT106
<i>RHOXF2/PEPP2</i>	<i>PEPP2</i>	Xq24	CT107
<i>OTOA</i>	<i>OTOA</i>	16p12.2	CT108
<i>CCDC62</i>	<i>CCDC62</i>	12q24.31	CT 109
<i>GPATCH2</i>	<i>GPATCH2</i>	1q41	CT 110
<i>CEP55</i>	<i>CEP55</i>	10q23.33	CT 111
<i>FAM46D</i>	<i>FAM46D</i>	Xq21.1	CT 112
<i>TEX14</i>	<i>TEX14</i>	17q22	CT 113
<i>CTNNA2</i>	<i>CTNNA2</i>	2p12-p11.1	CT 114
<i>FAM133A</i>	<i>FAM133A</i>	Xq21.32	CT 115
<i>LYPD6B</i>	<i>LOC130576</i>	2q23.1-q23.2	CT 116
<i>ANKRD45</i>	<i>ANKRD45</i>	1q25.1	CT 117
<i>ELOVL4</i>	<i>ELOVL4</i>	6q14	CT 118
<i>IGSF11</i>	<i>IGSF11</i>	3q13.32	CT 119
<i>TMEFF</i>	<i>TMEFF1</i>	9q31	CT 120.1
<i>TMEFF</i>	<i>TMEFF2</i>	2q32.3	CT 120.2
<i>ARX</i>	<i>ARX</i>	Xp21	CT 121
<i>SPEF2</i>	<i>SPEF2</i>	5p13.2	CT 122

<i>GPAT2</i>	<i>GPAT2</i>	2q11.1	CT 123
<i>TMEM108</i>	<i>TMEM108</i>	3q21	CT 124
<i>NOL4</i>	<i>NOL4</i>	18q12	CT 125
<i>PTPN20A</i>	<i>PTPN20A</i>	10q11.22	CT 126
<i>SPAG4</i>	<i>SPAG4</i>	20q11.21	CT 127
<i>MAEL</i>	<i>MAEL</i>	1q24.1	CT128
<i>RQCD1</i>	<i>RQCD1</i>	2q35	CT 129
<i>PRAME</i>	<i>PRAME</i>	22q11.22	CT130
<i>TEX101</i>	<i>TEX101</i>	19q13.31	CT131
<i>SPATA19</i>	<i>SPATA19</i>	11q25	CT132
<i>ODF1</i>	<i>ODF1</i>	8q22.3	CT133
<i>ODF2</i>	<i>ODF2</i>	9q34.11	CT134
<i>ODF3</i>	<i>ODF3</i>	11p15.5	CT135
<i>ODF4</i>	<i>ODF4</i>	17p13.1	CT136

**Fonte:** 2005-2009© *CT Antigens Database*

**Legenda:** *CT identifier* – ordem conológica de descoberta de cada CTA.

**Anexo 4 - Ficha da Dados Clínicos – Faculdade de Odontologia (UFMG)**

**IDENTIFICAÇÃO E DADOS DEMÓGRAFICOS**

1. Número do estudo: \_\_\_\_\_ [ ][ ][ ]  
2. Nome do paciente: \_\_\_\_\_  
3. Idade: \_\_\_\_\_ anos ..... [ ][ ][ ]  
4. Gênero: (1) Masculino (2) Feminino ..... [ ]  
5. Raça: (1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Outra \_\_\_\_\_ [ ]  
6. Naturalidade: \_\_\_\_\_ 7- Procedência: \_\_\_\_\_  
8. Endereço: \_\_\_\_\_  
9-Telefone: Res: \_\_\_\_\_ Cel: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA CLÍNICA**

10. História familiar de câncer: (0) Não (1) Pais (2) Irmãos (3) Outro parente (9) Desconhece.. [ ][ ]  
15. Uso tabaco: (0) Não (1) Sim – quantidade .....tempo ..... tipo: .....(9) Desconhecido ..... [ ]  
16. Uso álcool (0) Não (1) Sim - quantidade .....tempo:.....tipo:..... (9)Desconhecido.....[ ]  
17. Medicamentos: \_\_\_\_\_

**LOCO-REGIONAL**

9. Local de remoção do tecido: (1) ponta de língua (2) corpo de língua (3) ponta e corpo de língua (4) sulco pelve-lingual (5) assoalho (6) gengiva inferior (7) retromolar (8) fundo de sulco (9) vestibulo ..... [ ]

**CIRURGIA**

16. Data da cirurgia: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ ..... [ ][ ][ ]  
17. Tipo de cirurgia: \_\_\_\_\_

Coletor de Dados: \_\_\_\_\_



## **Anexo 5 - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido**

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução 196/96 e Resolução CNS 251/97)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa que tem o seguinte título: “**Avaliação do nível de expressão dos Antígenos Específicos de Câncer/Testículo (CTAs) em amostras de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de boca**”. A evolução dos tumores que acometem a região da cabeça e pescoço é bastante variável dependendo do local de origem e de diversos outros fatores. No entanto, muito ainda precisa ser pesquisado para se conhecer a capacidade de crescimento desses tumores e possivelmente empregar, no futuro, este conhecimento para alterar o tratamento que pode comprometer a qualidade de vida do paciente. O objetivo deste estudo é a identificação de genes que se apresentam alterados nos cânceres de cavidade bucal. Estes dados poderão permitir o seguimento clínico adequado de pacientes futuros de acordo com os dados obtidos na análise destes genes, seguida de correlação com os dados clínicos. Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde e nem terá custos para você.

### **TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte da lesão que foi removida através de biópsia para conclusão do diagnóstico, neste projeto de pesquisa. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino. Será respeitado o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_

No. \_\_\_\_\_

Pesquisadores: **Cláudia Maria Pereira**  
Telefone: (31) 34092477.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**COEP**). Em caso de dúvida, você pode ligar para o **COEP** através do número (31) 3409-4592. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901.

