



Instituto Nacional de Câncer

Programa de Pós-graduação em Oncologia

VANESSA PAIVA LEITE DE SOUSA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS DNA
METILTRANSFERASES PELAS PROTEÍNAS p53 E SP1 EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

RIO DE JANEIRO

2017



Instituto Nacional de Câncer

Programa de Pós-graduação em Oncologia

VANESSA PAIVA LEITE DE SOUSA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS DNA
METILTRANSFERASES PELAS PROTEÍNAS p53 E SP1 EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

Defesa de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Senso do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Co-orientador: Dr^a. Nathalia Meireles da Costa

RIO DE JANEIRO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S725r Sousa, Vanessa Paiva Leite de.

Regulação da expressão das DNA metiltransferases pelas proteínas p53 e Sp1 em carcinoma epidermóide de esôfago / Vanessa Paiva Leite de Sousa. – Rio de Janeiro, 2017.

195 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2017.

Orientadores: Luis Felipe Ribeiro Pinto; Nathalia Meireles da Costa.

1. Neoplasias Esofágicas. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. Genes p53. 4. Fator de Transcrição Sp1. I. Pinto, Luis Felipe Ribeiro (Orient.). II. Costa, Nathalia Meireles da (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99432



Instituto Nacional de Câncer

Programa de Pós-graduação em Oncologia

VANESSA PAIVA LEITE DE SOUSA

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS DNA METILTRANSFERASES PELAS
PROTEÍNAS p53 E SP1 EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Felipe Ribeiro Pinto

CO-ORIENTADOR: Dr^a. Nathalia Meireles da Costa

EXAMINADORES:

Prof. Dr. João de Biaso Viola

Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira

Prof. Dr^a. Miriam Bianchi de Frontin Werneck

Prof. Dr^a. Thereza Christina Barja Fidalgo

Prof. Dr. Leonardo Augusto Teixeira Karam

Prof. Dr^a. Renata Meirelles Santos Pereira

RIO DE JANEIRO

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elizabeth e Cláudio,
minhas irmãs, Vanda e Déborah e meu marido Silas
pelo carinho e apoio irrestrito,
concedendo as condições necessárias para a
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto**, por permitir que minha tese de doutorado fosse realizada em seu laboratório. Muito obrigada pelo projeto confiado a mim.

À **Dr^a. Nathalia Meireles da Costa**, pela grande cooperação durante os procedimentos práticos, pela disposição, grande amizade e contribuição para a minha formação acadêmica. Nath, serei eternamente grata pelo seu empenho durante esses 4 anos!

À amiga **Nina** por todo carinho, pelas discussões e por ser tão diferente de mim!

Aos **colegas do Laboratório de Carcinogênese Molecular - Cpq/INCA** pelo apoio, companheirismo e pelas sugestões recebidas.

Ao meu marido, grande amigo e amor da minha vida, **Silas**, por todo amor, paciência e apoio demonstrado durante todo curso.

À minha mãe, **Elizabeth**, pelo estímulo, confiança, paciência e investimento.

Ao meu pai e avó, **Cláudio e Orlandina**, pelo carinho e legado deixado.

Às minhas irmãs, **Vanda e Déborah**, pela grande amizade e cumplicidade.

Às amigas **Luma, Islânnia e Gabriela** pelos grandes momentos de alegria, pelas confidências compartilhadas e pela amizade, nossos laços são eternos, obrigada por serem mais chegadas que irmãs.

Aos **amigos e irmãos**, pelas orações e carinho.

Aos **pacientes** pela doação das amostras.

Ao **CNPq, FAPERJ, CAPES e Ministério da Saúde** pelo apoio financeiro.

A **Deus**, sem o qual nada faria sentido.



Instituto Nacional de Câncer

Programa de Pós-graduação em Oncologia

REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS DNA METILTRANSFERASES PELAS PROTEÍNAS p53 E SP1 EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Vanessa Paiva Leite de Sousa

O câncer de esôfago (CE) é um tumor altamente frequente e letal, correspondendo ao oitavo lugar em incidência e sexto em letalidade, dentro todos os tipos de tumores. O subtipo histopatológico mais frequente de CE é o carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que corresponde a aproximadamente 80% dos tumores de esôfago. O CEE apresenta uma alta frequência de mutações no gene *TP53* que respondem pelas alterações genéticas mais frequentes nesse tumor e parecem contribuir significativamente para a carcinogênese esofágica. A proteína p53 exerce um papel central na resposta a sinais de estresse, e já foi descrito que sua associação com SP1 tem um papel importante na regulação de diversos genes, como *p21*. Resultados obtidos em nosso grupo sugeriram uma associação entre maior expressão da *DNMT3B* e a presença de mutação no gene supressor de tumor *TP53* em CEE. As DNA Metiltransferases (DNMTs) são enzimas que catalisam a transferência do grupamento metil para citosinas em dinucleotídeos CpG, sendo esta a modificação epigenética mais estudada em CEE. A associação entre mutações em *TP53* e aumento da expressão das DNMTs sugere um papel de p53 na regulação da expressão dessas enzimas e uma interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos no desenvolvimento desses tumores. Portanto, este projeto teve por objetivo avaliar a regulação da expressão das *DNMTs* por p53 e SP1 em CEE. Este trabalho demonstrou, pela análise do perfil de expressão das *DNMTs* e *SP1*, de acordo com o status mutacional de *TP53*, em amostras de CEE provenientes de pacientes do INCA e de pacientes cujos dados foram depositados no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que tanto *DNMT1* quanto *SP1* encontram-se superexpressos em amostras de CEE que possuem mutação no gene *TP53* e que as expressões desses genes se correlacionam positivamente nas amostras mutadas. Além disso, os experimentos *in vitro* de modulação da expressão de SP1 e/ou p53, seguidos de análise de expressão gênica, de avaliação da ligação dos fatores de transcrição ao promotor de *DNMT1* e da investigação da ativação transcricional desse gene, realizados em linhagens celulares derivadas de CEE (que expressam ou não p53 selvagem, ativa), mostraram que SP1 e p53 participam da regulação transcricional de *DNMT1*, sendo capazes de se ligar ao promotor do gene que codifica esta enzima e ativar a sua transcrição. SP1 é capaz de se ligar ao promotor de *DNMT1* mesmo em condições basais da célula, e p53 somente após a indução de sua expressão. Entretanto, especificidades da interação entre SP1 e p53 na regulação transcricional de *DNMT1* podem desencadear efeitos distintos. SP1 é capaz de transativar a expressão das *DNMT1* independente da presença de p53. No entanto, o aumento da expressão de SP1, em modelos celulares p53 ativo, foi associado à redução da expressão de p53 e das DNMTs. A proteína p53, por sua vez, pode ativar ou reprimir a expressão de DNMT1, e o efeito da interação desta proteína com seus elementos consenso no promotor desse gene é dependente dos níveis disponíveis de p53 nas células. Por fim, nesse estudo foi observado que a diminuição da expressão das DNMTs foi capaz de levar a uma redução dos níveis de metilação global do DNA. Portanto, esses resultados demonstram que a regulação da expressão das DNMTs por p53 é um indicador da interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos atuando na carcinogênese esofágica.



Instituto Nacional de Câncer

Programa de Pós-graduação em Oncologia

REGULATION OF DNA METHYLTRANSFERASES EXPRESSION BY p53 AND SP1 IN ESOPHAGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Vanessa Paiva Leite de Sousa

Esophageal cancer (EC) is a highly frequent and lethal tumor, responding for the eighth position in incidence and sixth in lethality, among all tumor types. The most common EC histopathological subtype is represented by the esophageal squamous cell carcinoma (ESCC), which accounts for approximately 80% of all esophageal tumors. ESCC displays a high frequency of mutations within *TP53* gene that respond for the most frequent genetic alterations observed in this tumor and appear to contribute significantly to esophageal carcinogenesis. The p53 protein plays a central role in the response to stress signals and it has been already described that its association with SP1 plays an important role in the regulation of several genes, such as *p21*. Results obtained in our group suggested an association between higher *DNMT3B* expression and the presence of mutation in *TP53* in ESCC samples. DNA Methyltransferases (DNMTs) are the enzymes responsible for catalyzing the transfer of the methyl group to cytosines comprised into CpG dinucleotides, the epigenetic modification most studied in CEE. The association between mutations in *TP53* and increased expression of DNMTs suggests a role of p53 in the regulation of the expression of these enzymes and an interaction between genetic and epigenetic mechanisms involved in the development of these tumors. Therefore, this project aimed to evaluate the regulation of DNMT expression by p53 and SP1 in ESCC. The results obtained in this work demonstrated, by the analysis of the *DNMT* and *SP1* expression profile, according to *TP53* mutational status, in ESCC samples from patients enrolled and treated at INCA and from patients whose data were deposited in the database The Cancer Genome Atlas (TCGA), that both *DNMT1* and *SP1* are overexpressed in ESCC samples from patients harboring mutations in *TP53* and that the expression levels of these genes positively correlates in the mutated samples. Furthermore, the modulation of SP1 and / or p53 expression performed *in vitro* by using ESCC-derived cell lines (expressing or not wild-type, active p53), followed by gene expression analysis, evaluation of the transcription factors binding onto *DNMT1* promoter and the investigation of transcriptional activation of that gene, showed that SP1 and p53 participate in the transcriptional regulation of *DNMT1*, being capable of binding to the promoter of the gene encoding this enzyme and activating its transcription. SP1 binds to *DNMT1* promoter even at basal cell conditions, nevertheless, p53 binds only after the induction of its expression. However, specificities of the interaction between SP1 and p53 in the transcriptional regulation of DNMT1 may trigger distinct effects. SP1 is capable of transactivating *DNMT1* expression, in a p53 presence independent context. However, increased expression of SP1 in active p53 cell models was associated with reduced expression of p53 and DNMTs. The p53 protein, in turn, can activate or repress the expression of DNMT1, and the effect resulting from the interaction of this protein with its consensus elements in the promoter of this gene is dependent on p53 intracellular levels. Finally, in this study it was observed that decreased expression of DNMTs was associated with a reduction in the levels of global DNA methylation. Therefore, these results demonstrate that regulation of DNMT expression by p53 is an indicator of the interaction between genetic and epigenetic mechanisms acting on esophageal carcinogenesis.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1 Câncer de Esôfago.....	24
1.2 <i>TP53</i>	33
1.2.1 <i>TP53</i> e CEE.....	36
1.3 Metilação do DNA.....	39
1.3.1 DNA Metiltransferases (DNMTs).....	42
1.4 SP1.....	46
2. OBJETIVOS.....	51
2.1 Objetivo Geral	51
2.2 Objetivos Específicos	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Amostras de Pacientes com Carcinoma Epidermóide de Esôfago (CEE)	52
3.2 Perfil de Expressão Gênica das <i>DNMTs</i> , <i>SP1</i> e <i>TP53</i> em CEE	53
3.2.1 Extração de RNA.....	53
3.2.2 Quantificação de RNA.....	54
3.2.3 Reação de Transcrição Reversa (RT).....	54
3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCRq).....	55
3.3 Avaliação do Perfil Mutacional do Gene <i>TP53</i> em CEE.....	56
3.3.1 Extração de DNA.....	56
3.3.2 Quantificação de DNA.....	57
3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de <i>TP53</i>	57
3.3.4 Sequenciamento de <i>TP53</i>	57
3.4 Coleta de Informações do Banco de Dados <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA).....	57

3.5 Linhagens Celulares.....	57
3.6 Tratamentos.....	58
3.6.1 Transfecção de vetor de expressão de p53 e SP1.....	58
3.6.2 Inibição da Expressão Gênica de <i>TP53</i> e <i>SP1</i> pelo uso de RNA de interferência (siRNA).....	61
3.6.3 Tratamento com Metil Metanosulfonato (MMS).....	61
3.6.4 Tratamento com Mitramicina A.....	62
3.7 Coleta das Células.....	62
3.8 Ensaio de Apoptose.....	63
3.9 Análise de Expressão Gênica.....	63
3.9.1 Extração de RNA.....	63
3.10 Análise de Expressão Proteica.....	64
3.10.1 Extração de Proteínas Nucleares.....	64
3.10.2 Dosagem de Proteínas Nucleares.....	64
3.10.3 <i>Western Blotting</i>	65
3.11 Busca por Sítios de Ligação de p53 e SP1 na Região Promotora dos Genes Alvo.....	66
3.12 Análise de Imunoprecipitação da Cromatina seguida de Sequenciamento (ChIP-Seq).....	67
3.13 Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP).....	67
3.14 Ensaio Duplo da Luciferase.....	70
3.15 Avaliação do Perfil de Metilação do DNA.....	70
3.15.1 Extração de DNA.....	70
3.15.2 Tratamento com Bissulfito de Sódio.....	70
3.15.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	71
3.15.4 Pirosequenciamento.....	71
3.16 Análise Estatística.....	72
4. RESULTADOS	73
4.1 Avaliação do Perfil de Expressão de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> e <i>SP1</i> em Carcinoma Epidermóide de Esôfago (CEE), de Acordo com o <i>Status</i> Mutacional de <i>TP53</i> – Análise <i>In Vivo</i>	73

4.2 Avaliação da Regulação da Expressão Gênica de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> e <i>SP1</i> em Carcinoma Epidermóide de Esôfago (CEE) após Modulação da Expressão e/ou Atividade de p53 e SP1	96
4.2.1 Expressão Basal de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> e <i>SP1</i> em linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 selvagem ou mutante.....	96
4.2.2 Avaliação do efeito da modulação da expressão e/ou atividade de <i>SP1</i> sobre a expressão de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)	97
4.2.2.1 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de <i>SP1</i> sobre a expressão da <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>DNMT3B</i> em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa	98
4.2.2.2 Avaliação do efeito do silenciamento de <i>SP1</i> sobre a expressão de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa.....	102
4.2.2.3 Avaliação do efeito da inibição da atividade de <i>SP1</i> sobre a expressão das <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa.....	106
4.2.2.4 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de <i>SP1</i> sobre a expressão das <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa.....	111
4.2.2.5 Avaliação do silenciamento de <i>SP1</i> sobre a expressão das <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagem celular derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa.....	115
4.2.2.6 Avaliação do efeito da inibição da atividade de <i>SP1</i> sobre a expressão das <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa.....	118
4.2.3 Avaliação do efeito da modulação da expressão de p53 sobre a expressão de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)	121
4.2.3.1 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de p53 sobre a expressão da <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressa p53 ativa.....	121

4.2.3.2 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de p53 sobre a expressão da DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa.....	122
4.2.3.3 Avaliação do efeito do silenciamento de <i>TP53</i> sobre a expressão das DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa.....	129
4.2.4 Avaliação do efeito da modulação concomitante da expressão de p53 e SP1 sobre a regulação da expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)	132
4.2.5 Avaliação da interação das proteínas p53 e SP1 com os promotores gênicos de <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)	134
4.2.5.1 Avaliação <i>in silico</i> da presença de elementos responsivos à p53 e SP1 na região promotora dos genes <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i>	134
4.2.5.2 Avaliação da ligação de p53 e SP1 às suas respectivas regiões consenso no promotor da <i>DNMT1</i> , <i>DNMT3A</i> e <i>DNMT3B</i> em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE).....	138
4.2.6 Avaliação do efeito da modulação da expressão de SP1 e p53 sobre a atividade transcricional do promotor de <i>DNMT1</i> em linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)	143
4.2.6.1 Avaliação do efeito da modulação de SP1 sobre a atividade transcricional do promotor da <i>DNMT1</i> em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa.....	143
4.2.6.2 Avaliação do efeito da modulação de SP1 sobre a atividade transcricional do promotor da <i>DNMT1</i> em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressam p53 ativa.....	145
4.2.6.3 Avaliação do efeito da modulação de p53 sobre a atividade transcricional do promotor da <i>DNMT1</i> em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa.....	147
4.2.6.4 Avaliação do efeito da modulação de p53 sobre a atividade transcricional do promotor da <i>DNMT1</i> em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressam p53 ativa.....	148

4.2.6.5 Avaliação do efeito da modulação conjunta de p53 e SP1 sobre a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressa p53 ativa.....149

4.3 Avaliação do Efeito da Redução da Expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B sobre os níveis de metilação global do DNA em Linhagens Celulares de Carcinoma Epidermóide de Esôfago (CEE)152

5. DISCUSSÃO.....155

6. CONCLUSÕES.....169

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....170

8. ANEXOS.....192

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Estadiamento do câncer de esôfago. Estadiamento do câncer de esôfago de acordo com tamanho do tumor (T), invasão linfonodal (N) e metástase à distância (M).

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica.

Tabela 3.2: Descrição das linhagens celulares utilizadas no estudo.

Tabela 3.3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no ensaio de imunoprecipitação da cromatina.

Tabela 4.1: Características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Tabela 4.2: Associação entre a expressão gênica de *DNMT1* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Tabela 4.3: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3A* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Tabela 4.4: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3B* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Tabela 4.5: Associação entre a expressão gênica de *SP1* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Tabela 4.6: Características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Tabela 4.7: Associação entre a expressão gênica de *DNMT1* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Tabela 4.8: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3A* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Tabela 4.9: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3B* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Tabela 4.10: Associação entre a expressão gênica de *SP1* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Tabela 5.1: Representação resumida dos resultados obtidos da parte das análises de regulação gênica de *DNMT1* por *SP1* e *p53* em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Taxas de incidência e mortalidade dos principais tumores para ambos sexos.
- Figura 1.2: Estimativa de prevalência dos 10 tipos de câncer mais incidentes, por sexo, no Brasil para os anos de 2016 e 2017
- Figura 1.3: Figura representativa do estadiamento do câncer de esôfago.
- Figura 1.4: Incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos.
- Figura 1.5: Principais fatores de risco associados ao CEE nas regiões de alta incidência da neoplasia.
- Figura 1.6: Modelo de ativação de p53 em resposta a danos genotóxicos ou sinais hiperproliferativos.
- Figura 1.7: Esquema da transferência do radical metil para citosinas gerando 5-metilcitosinas.
- Figura 1.8: Micronutrientes provenientes da dieta e que participam do metabolismo de um carbono
- Figura 1.9: Perfil de metilação no genoma de células tumorais.
- Figura 1.10: Esquema da transferência do grupamento metil para a citosina 38 do RNAt.
- Figura 1.11: Esquema representativo da estrutura gênica das DNMTs.
- Figura 3.1: Mapa do vetor pcDNA3 (INVITROGEN, EUA) utilizado como controle e na transfecção do gene *TP53*.
- Figura 3.2: Mapa do vetor pN3 (ADDGENE, Austrália) utilizado como controle e na transfecção do gene *SP1*.
- Figura 4.1: Perfil de expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) provenientes de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com a presença de mutações em *TP53*.
- Figura 4.2: Correlação entre as expressões gênicas de *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) proveniente de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.
- Figura 4.3: Perfil de expressão gênica de *SP1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) proveniente de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com a presença de mutações em *TP53*.

Figura 4.4: Expressão gênica de *SP1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) proveniente de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com o hábito de fumar dos pacientes.

Figura 4.5: Sobrevida global dos pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com a expressão de RNAm de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1*.

Figura 4.6: Perfil de expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), a partir de análise de dados depositados no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), de acordo com a presença de mutações em *TP53*.

Figura 4.11: Perfil de expressão gênica de *SP1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de acordo com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas.

Figura 4.12: Sobrevida global dos pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que tiveram seus dados depositados no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), de acordo com a expressão de RNAm de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1*.

Figura 4.13: Perfil de expressão basal de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1

Figura 4.14: Análise do perfil de morte celular por apoptose nas linhagens celulares derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C.

Figura 4.15: Perfil de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção com vetor de expressão de *SP1*.

Figura 4.16: Perfil de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 37°C, após transfecção com vetor de expressão de *SP1*

Figura 4.17: Análise da eficiência de transfecção de siRNA por citometria de fluxo nas linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C.

Figura 4.18: Perfil de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção com siSP1.

Figura 4.19: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma

Figura 4.20: Análise do perfil de morte celular por apoptose nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C após tratamento com Mitramicina A.

Figura 4.21: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após tratamento com Mitramicina A.

Figura 4.22: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 37°C, após tratamento com Mitramicina A.

Figura 4.23: Análise do perfil de morte celular por apoptose na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1 cultivada à 32°C.

Figura 4.24: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, p53 e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com vetor de expressão de SP1.

Figura 4.25: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116, após transfecção com vetor de expressão de SP1.

Figura 4.26: Análise da eficiência de transfecção de siRNA por citometria de fluxo na linhagem derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1 cultivada à 32°C.

Figura 4.27: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C após transfecção com siSP1.

Figura 4.28: Análise da eficiência de transfecção de siRNA por citometria de fluxo na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116.

Figura 4.29: Perfil de expressão basal de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116 após transfecção com siSP1.

Figura 4.30: Análise do perfil de morte celular por apoptose na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1 cultivada à 32°C após tratamento com Mitramicina A

Figura 4.31: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após tratamento com Mitramicina A.

Figura 4.32: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção com vetor de expressão de p53.

Figura 4.33: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com vetor de expressão de p53.

Figura 4.34: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116 após transfecção com vetor de expressão de p53.

Figura 4.35: Análise do perfil de morte celular por apoptose na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1 cultivada à 32°C após tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS) 1mM.

Figura 4.36: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS). (

Figura 4.37: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C após transfecção com siTP53.

Figura 4.38: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116 após transfecção com siTP53.

Figura 4.39: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, p53 e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção concomitante de vetor de expressão de p53 e SP1.

Figura 4.40: Predição dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT1*.

Figura 4.41: Predição dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT3A*.

Figura 4.42: Predição dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT3A*.

Figura 4.43: Análise *in silico* da interação de SP1 e p53 com a região promotora da *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L* e *TDG*, a partir de dados gerados por ChIP-seq.

Figura 4.43: Análise *in silico* da interação de SP1 e p53 com a região promotora da *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L* e *TDG*, a partir de dados gerados por ChIP-seq.

Figura 4.44: Avaliação da ligação de p53 e SP1 na região promotora da *DNMT1* nas linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 32°C.

Figura 4.45: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão de SP1 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13 e TE-1, cultivada à 37°C.

Figura 4.46: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após silenciamento de SP1 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13 e TE-1, cultivada à 37°C.

Figura 4.47: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão de SP1 na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1, cultivada à 32°C.

Figura 4.48: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após silenciamento de SP1 nas linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1, cultivada à 32°C.

Figura 4.49: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão de p53 na linhagem celular derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13.

Figura 4.50: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão e silenciamento de p53 na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1, cultivada à 32°C.

Figura 4.51: Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão concomitante de p53 e SP1 na linhagem celular derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13.

Figura 4.52: Análise do perfil de morte celular por apoptose nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C e 32°C após tratamento com Mitramicina A.

Figura 4.53: Análise do perfil de metilação de LINE-1 em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) tratadas com Mitramicina A.

Figura 5.1: Figura esquemática representativa dos mecanismos de regulação de *DNMT1* por SP1 e p53 em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) propostos a partir dos dados gerados nesse estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADE** - Adenocarcinoma de Esôfago
- BCL** - *Base Calling*
- BER** - *Base Excision Repair*
- cDNA** – DNA Complementar
- CE** – Câncer de Esôfago
- CEE** - Carcinoma Epidermóide de Esôfago
- CK** – Citoqueratina
- ChIP** – Imunoprecipitação da Cromatina
- ChIP-seq** – Imunoprecipitação da Cromatina seguida de Sequenciamento
- CHRN** - Receptores Colinérgicos Nicotínicos
- CMV** - Citomegalovírus
- DNMT** - DNA Metiltransferase
- EMSA** - *Electrophoretic mobility shift assay*
- ER** – Receptor de Estrogênio
- GR** - Receptor de Glicocorticóide
- GST** – Gene Supressor de Tumor
- HPV** - Papiloma Vírus Humano
- IARC** – *International Agency for Research on Cancer*
- IGF1R** - *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*
- INCA** - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- LINE** – *Long Interspersed Nuclear Elements*
- MMP** - *Matrix Metalloproteinases*
- MMS** - Metil Metanosulfonato
- MTHFR** - Metilenotetrahidrofolato Redutase
- NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*
- NNK** - *4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- PCRq** – Reação em Cadeia da Polimerase
- PCRq** – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
- RLIM** – *Ring Finger LIM domain binding protein*
- RNA_m** – RNA Mensageiro

RT – Transcrição Reversa

SAM - S-adenosil-metionina

SINE - *Short Interspersed Nuclear Elements*

siRNA - RNA de Interferência

SP – *Specific Proteins*

SPRR3 - *Small proline - rich protein 3*

SRA – *SET and RING finger-associated domain*

TAF - *TBP-associated factors*

TBP - *TATA-binding protein*

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDG – Timina DNA Glicosilase

THF - Tetra-hidrofolato

TK - *Thymidine kinase*

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO

O câncer de esôfago (CE) está entre os dez tipos de câncer mais prevalentes no mundo. Segundo dados do GLOBOCAN-2012, o CE é o oitavo tumor mais prevalente e a sexta causa de morte por câncer no mundo. Para o ano de 2015, foram estimados quase 500 mil novos casos da doença, sendo cerca 350 mil casos em homens e 150 mil casos em mulheres e, para o mesmo ano, foram esperados cerca de 434 mil óbitos em decorrência desse tumor (JEMAL *et al*, 2011; FERLAY *et al*, 2015).

As taxas de incidência e mortalidade desta neoplasia são bastante próximas, refletindo a baixa sobrevida (Figura 1.1). A razão entre as taxas de incidência e mortalidade é de 0,88 e os padrões geográficos de mortalidade acompanham os padrões de incidência. As altas taxas de mortalidade observadas decorrem de um diagnóstico tardio, uma vez que os sintomas são manifestos em estágios avançados da doença. Portanto, é evidente a necessidade da busca por metodologias que permitam o diagnóstico e, conseqüentemente, tratamento precoce desta neoplasia (ALLEN *et al*, 1997; MCLARTY *et al*, 1997).

Taxas de incidência e mortalidade por câncer Ambos os sexos

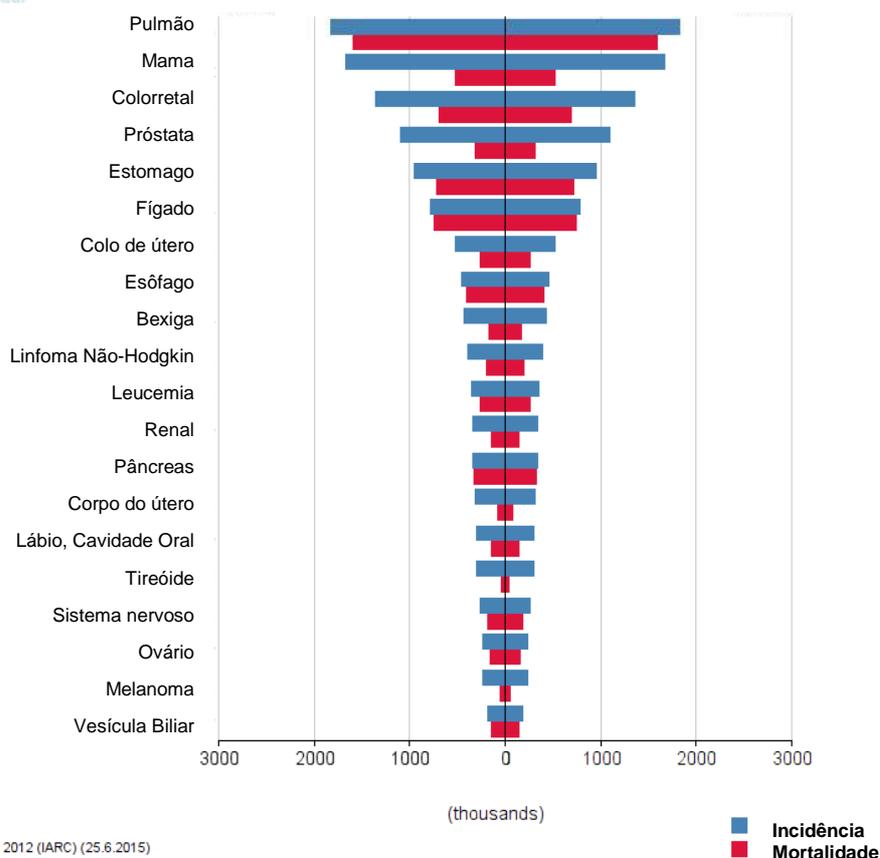
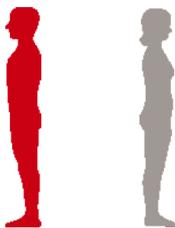


Figura 1.1: **Taxas de incidência e mortalidade dos principais tumores para ambos sexos.** Gráfico representativo das taxas de incidência e mortalidade dos diferentes tumores humanos, para ambos os sexos. As taxas de incidência são representadas pelas barras azuis, enquanto que as taxas de mortalidade foram representadas pelas barras vermelhas. Valores ajustados por idade, por 100.000 habitantes (Adaptado de GLOBOCAN 2012).

No Brasil, esse quadro não é diferente. Para o ano de 2016 esperam-se 7.950 novos casos da doença em homens e 2.860 em mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 8,04 casos a cada 100 mil homens e 1,76 para cada 100 mil mulheres. De acordo com a estimativa de incidência de câncer no Brasil, nos anos 2016 e 2017, o câncer de esôfago ocupa a sexta posição entre os tumores mais prevalentes em homens e mulheres (Figura 1.2) (INCA, Estimativa 2016. Incidência de Câncer no País, 2015).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016
por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%	Homens 		Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Côlon e Reto	17.620	8,6%
Côlon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1.2: **Estimativa de prevalência dos 10 tipos de câncer mais incidentes, por sexo, no Brasil para os anos de 2016 e 2017.** Figura representativa dos dez tipos de tumores mais incidentes estimados para os anos de 2016 e 2017 no Brasil. Os valores à esquerda representam o número de casos esperados dos diferentes tipos tumorais em homens, com destaque para o câncer de esôfago (sexto tumor mais prevalente). Os valores à direita representam o número de casos esperados dos diferentes tipos tumorais em mulheres. Os valores foram arredondados para múltiplos de 10 (Adaptado de INCA, Estimativa 2016. Incidência de Câncer no País, 2015).

O estadiamento dos tumores de esôfago leva em consideração o perfil de invasão do tumor primário (T), a invasão linfonodal (N) e a metástase à distância (M). A classificação T segue de acordo com o esquema descrito na figura 1.4. Os tumores classificados como Tis são aqueles intramucosos, que não invadem a lâmina própria. Os tumores do grupo T1 são aqueles que invadem a lâmina própria ou submucosa. Tumores classificados como T2 se estendem a camada muscular. Pertencem ao estágio T3 os tumores aqueles que invadem a adventícia e tumores em estágio IV invadem as estruturas adjacentes. Tumores classificados como N0 não apresentam metástase linfonodal, enquanto que os classificados como N1 possuem acometimento linfonodal. Por fim, a classificação M leva em consideração a presença (M1) ou ausência de metástases (M0). A união das classificações TNM permite o estadiamento do câncer de esôfago e está descrito na tabela 1.1. O desenho esquemático do estadiamento está representado na figura 1.3 (TNM, Classificação de tumores malignos, INCA, 2004; RUSTGI, 2014).

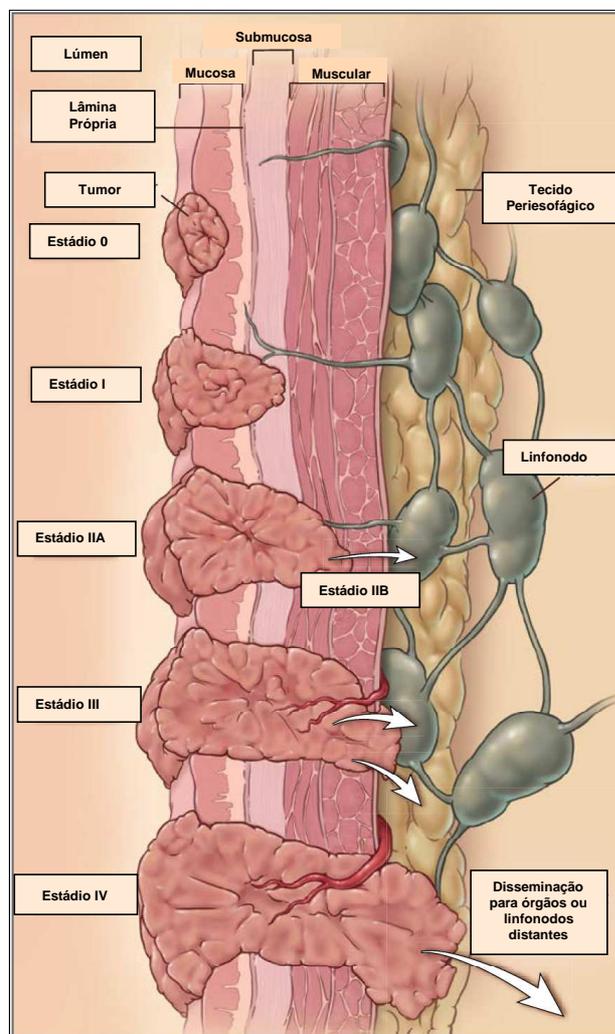


Figura 1.3: **Figura representativa do estadiamento do câncer de esôfago.** Figura representativa do estadiamento clínico do câncer de esôfago. Os tumores são classificados de acordo com a invasão da camada mucosa (T0), da região submucosa (T1), da camada muscular (T2), da camada adventícia (T3) e metástase à distância (T4) (Adaptado de RUSTIGI, 2014).

Tabela 1.1: **Estadiamento do câncer de esôfago.** Estadiamento do câncer de esôfago de acordo com tamanho do tumor (T), invasão linfonodal (N) e metástase à distância (M).

Estadiamento do Câncer de Esôfago			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio IIA	T2, T3	N0	M0
Estádio IIB	T1, T2	N1	M0
Estádio III	T3 T4	N1 Qualquer N	M0 M1
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

De acordo com a histopatologia, os tumores de esôfago podem ser divididos em dois subtipos principais: o adenocarcinoma de esôfago (ADE) e o carcinoma epidermóide (CEE), que diferem amplamente no que diz respeito aos fatores

etiológicos associados, às populações afetadas, à localização geográfica, às alterações moleculares e à evolução da neoplasia (MCLARTY *et al*, 1997; HONGO *et al*, 2009).

O ADE é bem menos prevalente que o CEE, embora sua incidência venha aumentando consideravelmente nos últimos anos, especialmente nos países desenvolvidos (HEALTH *et al*, 2000; POHL & WELCH, 2005). Esse subtipo histológico é o mais prevalente na América do Norte e na Europa (RUSTGI *et al*, 2014) e a razão entre a incidência entre homens e mulheres ocorre na proporção 7:1 (RUTEGARD *et al*, 2010). Um fator de risco conhecido para o ADE é a metaplasia intestinal causado pelo refluxo gastro-esofágico, chamado de esôfago de Barrett, que aumenta em até 100X o risco de desenvolvimento desse tumor (HVID-JENSEN *et al*, 2011; SPECHLER *et al*, 2014). Além deste, a obesidade é um dos fatores associados ao desenvolvimento do esôfago de Barrett e também atua como um fator de risco independente para o desenvolvimento do ADE (HAMPEL *et al*, 2005; KUBO *et al*, 2006).

O CEE, foco desse estudo, corresponde a cerca de 90% de todos os casos de CE e é o mais prevalente nos países menos desenvolvidos e a razão entre a incidência entre homens e mulheres é de 3:1 (JEMAL *et al*, 2011; RUSTGI *et al*, 2014; FERLAY *et al*, 2015). Uma característica peculiar do CEE é a acentuada variação geográfica de sua incidência, com áreas de alta incidência margeando áreas em que a incidência desta doença é até dez vezes menor. Dentre os países que apresentam alta incidência de CEE, se destacam os compreendidos no chamado “cinturão asiático do câncer de esôfago” (Turquia, Irã, Iraque, norte e oeste da China, Hong Kong, Japão, Cingapura, Afeganistão) (LAMBERT e HAINAUT, 2007), países desenvolvidos como França e Inglaterra e na América do Sul se destacam o Brasil e Uruguai (PARKING *et al*, 2005, ESLICK, 2009) (Figura 1.4).

Incidência Câncer de Esôfago por 100.000 habitantes

Ambos os sexos

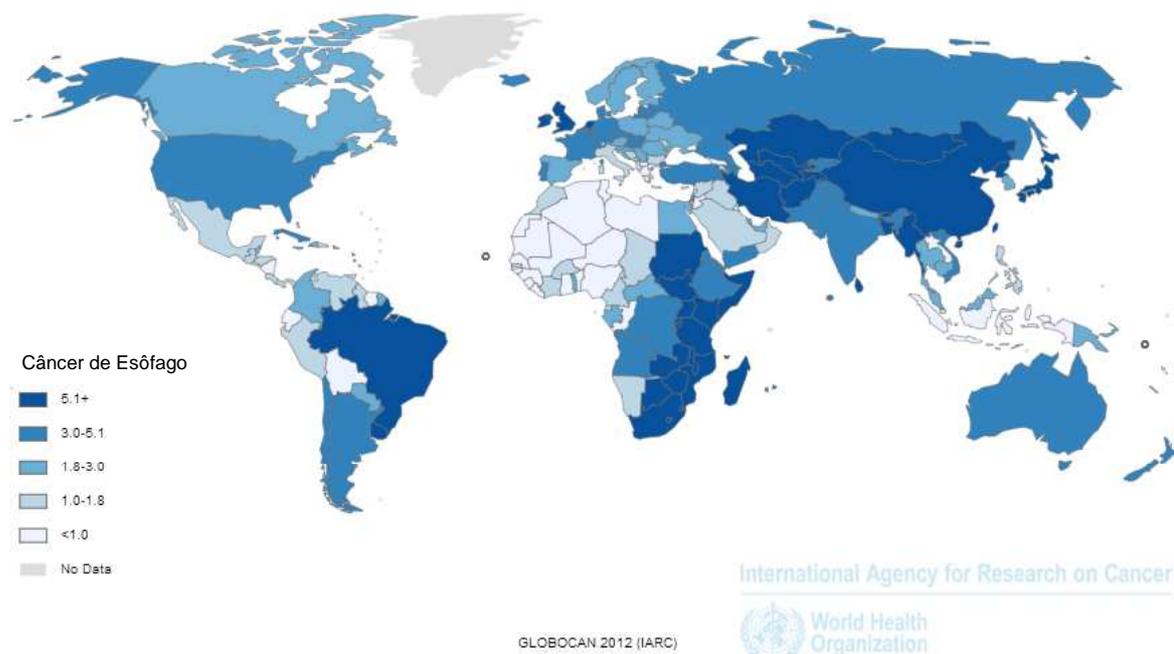


Figura 1.4: **Incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos.** Representação geográfica da incidência de câncer de esôfago no mundo para ambos os sexos. As cores mais escuras representam regiões de alta incidência, enquanto que as cores mais claras representam regiões de baixa incidência. Valores ajustados por idade, por 100.000 habitantes (Adaptado de GLOBOCAN 2012).

Estudos epidemiológicos mostraram que carcinógenos ambientais têm um papel crítico no desenvolvimento do CEE. Alguns fatores de risco já estão bem caracterizados como associados à carcinogênese esofágica, como consumo de álcool, tabaco, dieta com alimentos contaminados por nitrosaminas, desnutrição e consumo de bebidas em elevadas temperaturas (LIJINSKY, 1992; CASTELLSAGUÉ *et al*, 1999 e 2000). Nos últimos anos foi sugerido o papel da infecção por HPV (Papilomavírus Humano) no desenvolvimento do CEE, entretanto, estudos com maiores números de pacientes e metodologias mais robustas mostraram que a infecção por HPV não tem um papel relevante no desenvolvimento do CEE. Além disso, pacientes com tumores positivos para HPV não apresentam melhor prognóstico, como ocorre com pacientes com tumores de orofaringe (SYRJANEN *et al*, 2002; D-SOUZA *et al*, 2007, HERBSTER *et al*, 2012). Os principais fatores de risco nas diferentes regiões do mundo estão descritos na figura 1.5.

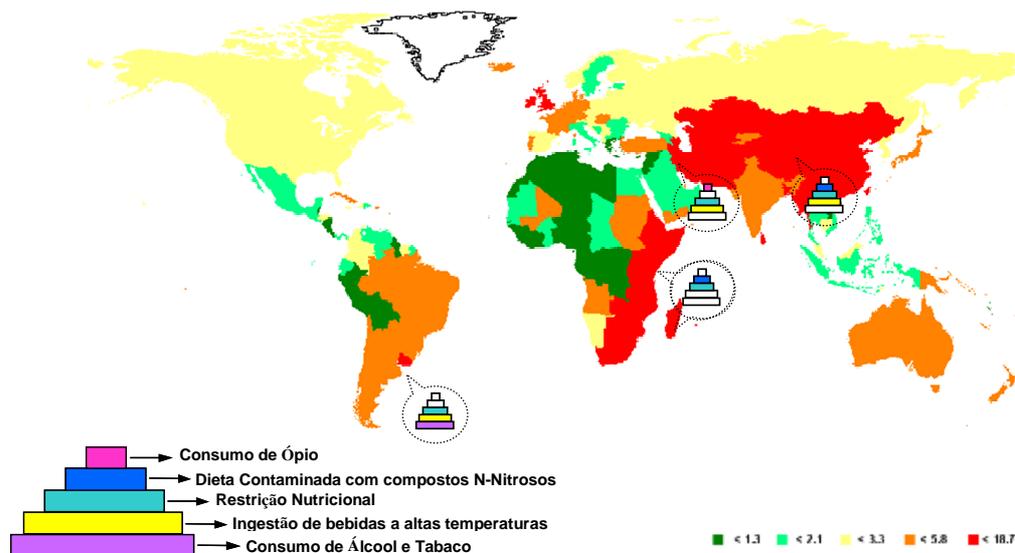


Figura 1.5: **Principais fatores de risco associados ao CEE nas regiões de alta incidência da neoplasia.** Figura representativa dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do CEE. Na América do Sul os principais fatores de risco são o consumo de álcool e tabaco, ingestão de bebidas a altas temperaturas e dieta pobre em nutrientes. Na África, os fatores de risco predominantes constituem a restrição nutricional e dieta contaminada por compostos N-Nitrosos. Em algumas regiões da Ásia destaca-se o consumo de ópio e na Ásia, enquanto que em outras o consumo de bebidas a altas temperaturas (Adaptado de DA COSTA *et al*, 2013).

Em uma publicação recente do nosso grupo, foi proposta a história natural de desenvolvimento do CEE. De acordo com os autores, após um longo tempo de exposição aos fatores de risco, a transformação neoplásica ocorre na mucosa esofágica (Da COSTA *et al*, 2013). De acordo com história natural do câncer, a intervenção primária tem como principal objetivo a prevenção da doença. No CEE, o principal objetivo seria a redução da exposição aos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do tumor, mais especificamente a redução do consumo de álcool e tabaco e o consumo de bebidas quentes em regiões específicas de alta incidência de CEE, como o sul do Brasil (HU *et al*, 1994; CASTELLSAGUÉ *et al*, 2000; ISLAMI *et al*, 2009). Outro ponto bastante importante e ressaltado no citado trabalho é a prevenção secundária que objetiva a detecção precoce da doença. Raramente os CEE são detectados em estádios iniciais da doença, o que leva a uma diminuição significativa da sobrevida desses pacientes. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos de *screening* mais eficientes, bem como a identificação de biomarcadores de detecção precoce, são de grande importância para o curso e prognóstico dessa doença.

A principal dificuldade para o diagnóstico do CEE em estágios iniciais consiste no fato de que, nesses estágios, a doença é assintomática (ENZINGER *et al*, 2003;

SHANG *et al*, 2013). A busca por novas metodologias que visam o diagnóstico precoce da doença seria de extrema relevância para uma melhor sobrevida e qualidade de vida dos pacientes com CEE. Além disso, entender os mecanismos moleculares envolvidos na gênese e progressão deste tumor é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes e específicas. Atualmente, já são descritas algumas alterações moleculares em CEE, desde estádios iniciais do desenvolvimento desse tumor, que poderiam auxiliar na detecção precoce do mesmo. Ciclina D1 é uma proteína envolvida na via de p16-pRb e induz a fosforilação de Rb, quando associado a CDK4-CDK6, e possui um papel importante na transição G1-S do ciclo celular (MOTOKURA *et al*, 1991 BALDIN *et al*, 1993). Em CEE, o aumento de expressão gênica ou proteica ocorre em 23-65% dos casos. Além disso, a superexpressão de ciclina D1 já é observada no tecido displásico e em tumores em estádios iniciais (SHAMMA *et al*, 2000). A proteína p16 é um supressor de tumor e inibe a função de ciclina D1, sendo capaz de levar à parada do ciclo celular, independente de p53, através da fosforilação de pRb. A inativação de p16 é frequente em CEE e é causada por perda de heterozigossidade e metilação da região promotora do gene. Essas alterações também são descritas em estádios iniciais do desenvolvimento do CEE, enquanto que a deleção homozigótica do locus gênico é um evento tardio na progressão tumoral (YOUNG *et al*, 1997; XING *et al*, 1999; KUWANO *et al*, 2005).

Recentemente, outras alterações moleculares têm sido identificadas presentes já no tecido esofágico adjacente ao tumor, mas sem alterações morfológicas. Alguns trabalhos recentes têm descrito alterações no perfil de expressão gênica e/ou proteica relevantes para a carcinogênese esofágica. Em um trabalho realizado por nosso grupo, foi descrito a maior expressão gênica e proteica de HMGA2 em CEE. Essa proteína é capaz de interagir com a maquinaria transcricional, influenciando a repressão ou ativação transcricional de uma variedade de genes. Os autores demonstraram que cerca de 64% e 90% das amostras oriundas de CEE apresentaram uma maior expressão gênica e proteica, respectivamente, de HMGA2 em relação ao tecido adjacente ao tumor. Além disso, foi detectado um aumento significativo da expressão desse gene já nas amostras de tecido esofágico morfológicamente normal adjacente ao tumor, quando comparado com as amostras de tecido esofágico proveniente de indivíduos saudáveis, livres de neoplasia. Ademais, a expressão gênica de HMGA2 foi capaz de discriminar o tecido tumoral do tecido não-tumoral com acurácia de aproximadamente 80%. Por fim, o silenciamento de HMGA2 em

linhagens celulares derivadas de CEE levou à diminuição do potencial proliferativo e migratório destas (PALUMBO *et al*, 2016A). Outro trabalho desenvolvido em nosso grupo reportou a superexpressão gênica e proteica de UBE2C em aproximadamente 73% das CEE analisadas e demonstrou, também, que a expressão desse gene foi capaz de discriminar as amostras de CEE das amostras de tecido esofágico não-tumoral com alta acurácia. A proteína UBE2C tem um papel central na progressão do ciclo celular. Além da superexpressão de UBE2C nas amostras de CEE, quando foi feita a comparação entre a expressão gênica de *UBE2C* em tecido esofágico livre de neoplasia e o tecido morfológicamente normal adjacente ao tumor, foi observado o aumento de 2 vezes na expressão gênica de *UBE2C* já nas amostras oriundas de tecido morfológicamente normal adjacente ao tumor. Por fim, esse estudo demonstrou que UBE2C afeta as taxas de proliferação e perfil do ciclo celular em linhagens celulares de CEE, através da modulação direta dos níveis de ciclina B1 (PALUMBO *et al*, 2016B). Também já foi descrita a alteração na expressão gênica e proteica de *SPRR3* (*small proline - rich protein 3*) em mucosa adjacente ao tumor, demonstrando que essa alteração pode ser um evento inicial no desenvolvimento do CEE (SIMÃO *et al*, 2011). *SPRR3* é expresso durante a diferenciação de queratinócitos e pode ser considerado um marcador de diferenciação em epitélio escamoso (ABRAHAM *et al*, 1996).

Além das alterações genéticas, alterações epigenéticas também já estão sendo caracterizadas em tumores de esôfago e alguns estudos têm avaliado o padrão de metilação na região promotora dos genes em CEE. Uma análise de perfil de metilação global demonstrou a hipometilação do promotor do gene *BCL3*, que é um gene ainda pouco conhecido, mas parece ter um papel fundamental na regulação da transcrição mediada por NF-kB. Além disso, esse trabalho mostrou também que o promotor de *TFF1* encontra-se hipermetilado em CEE e na mucosa histologicamente normal adjacente ao CEE em comparação ao epitélio esofágico saudável (LIMA *et al*, 2011). O gene *TFF1* faz parte de uma família de peptídeos que desempenham um papel fundamental para a restituição do epitélio gastrointestinal após injúria (RIBIERAS *et al*, 1998). Um outro tipo de alteração epigenética identificada em CEE é a alteração na expressão de microRNAs. A análise de expressão global de microRNA em CEE identificou que alguns microRNAs possuem sua expressão alterada em CEE, quando comparado ao epitélio esofágico adjacente ao tumor. Foi demonstrado que os microRNAs miR-338-3p, miR-218 e miR-139-5p tem a expressão reduzida nos tumores, enquanto que miR-183, miR-574-5p, miR-21 e

miR-601 foram encontrados superexpressos nos CEE. Além disso, foi demonstrado que a expressão diferencial de miR-338-3p, miR-139-5p, miR-574-5p e miR-601 está associada a um maior o risco para o desenvolvimento do CCE. (YANG *et al*, 2013). Um outro trabalho mostrou que a redução da expressão de miR-375 em CEE foi associada ao estadiamento clínico avançado e presença de metástases (LI *et al*, 2013).

Entretanto, a alteração mais prevalente em CEE são as mutações no gene *TP53*. Cerca de 40% dos CEE apresentam mutações no gene *TP53* e essas alterações parecem ocorrer precocemente, devido ao fato que as mutações nesse gene já são observadas em áreas de mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor e de displasia (MANDARD *et al*, 2000; IARC *TP53* DATABASE, 2016).

1.2 *TP53*

Inicialmente, p53 foi identificado como um antígeno que foi co-precipitado com o antígeno *large T* em células infectadas com o vírus SV40, em estudos publicados por Peter Tegtmeier entre 1975 e 1977 (TEGTMEYER P *et al*, 1975; TEGTMEYER P *et al*, 1977; HAINAUT P e WIMAN KD, 2009). Em 1979, Lane e Crawford mostraram que o antígeno T do SV40 foi co-precipitado com uma proteína da célula do hospedeiro com um peso molecular de aproximadamente 53 kDa. A proteína p53 foi descoberta em 1979, no entanto, ganhou atenção no final dos anos 1980 com a evidência de que o gene *TP53* se encontrava mutado ou alterado em uma grande proporção dos tumores humanos, independente do tipo histológico (LANE e CRAWFORD, 1979). Em 1990, Malkin e Srivastava demonstraram que mutações em *TP53* estão associadas à síndrome Li-Fraumeni, uma síndrome familiar caracterizada pela predisposição ao desenvolvimento a múltiplos tumores (MALKIN *et al*, 1990; SRIVASTAVA *et al*, 1990).

A proteína p53 é um fator de transcrição que atua como um supressor tumoral e tem um papel central na resposta a vários sinais de estresse, como indução da parada do ciclo celular, apoptose e senescência (BROWN *et al*, 2009). Por sua função extremamente relevante para a manutenção da integridade do genoma, p53 é caracterizado como o guardião do genoma. A fosfoproteína p53 é codificada pelo gene *TP53*, que está localizado no cromossomo 17p13 (HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000). A proteína p53 apresenta múltiplos domínios que compreendem os domínios

de ativação AD1 (resíduos 1-42) e AD2 (resíduos 43-92), um domínio de ligação ao DNA (resíduos 102-292), um domínio contendo sinal de localização nuclear (resíduos 292-325), um domínio de tetramerização (resíduos 325-363) e um domínio básico (resíduos 363-393) (BODE e DONG, 2004). Na ausência de sinais de estresse, a expressão de p53 é precisamente controlada por uma E3 ubiquitina ligase, MDM2, que é capaz de ubiquitinar resíduos de lisina localizados nos resíduos de ligação ao DNA e no resíduo básico. A ubiquitinação de p53 faz com que esta seja degradada via proteossoma 26S. MDM2 também inibe a função de p53 através da modulação de sua atividade transcricional e por prevenir a interação de p53 com a maquinaria basal de transcrição (MOMAND *et al*, 1992; BRONW *et al*, 2009). Portanto, o aumento da expressão de MDM2 leva à redução dos níveis de expressão de p53. No entanto, p53 é capaz de ativar a transcrição de *MDM2*, o que caracteriza um importante *feedback* na regulação de p53 (Figura 1.6). Quando a célula apresenta algum sinal de estresse, quinases sensoras, como ATM e ATR, são ativadas e iniciam uma via de sinalização que culmina com a fosforilação nos resíduos do domínio de ativação AD1. A fosforilação de p53 faz com que o complexo MDM2-p53 seja inibido e promove a estabilização de p53. Desta forma, p53 pode atuar como uma proteína supressora de tumor levando à ativação da transcrição de seus genes alvo que levam à indução da parada do ciclo celular, apoptose ou senescência, entre outras funções (COUTTS *et al*, 2006; BRONW *et al*, 2009). Além disso, sabe-se que p53 pode atuar como supressor tumoral independente da ativação da transcrição gênica. Essa proteína pode interagir diretamente com seus alvos como, por exemplo, enzimas participantes das vias de reparo de DNA. (MUMMENBRAUER *et al*, 1996; SENGUPTA *et al*, 2005; BRONW *et al*, 2009).

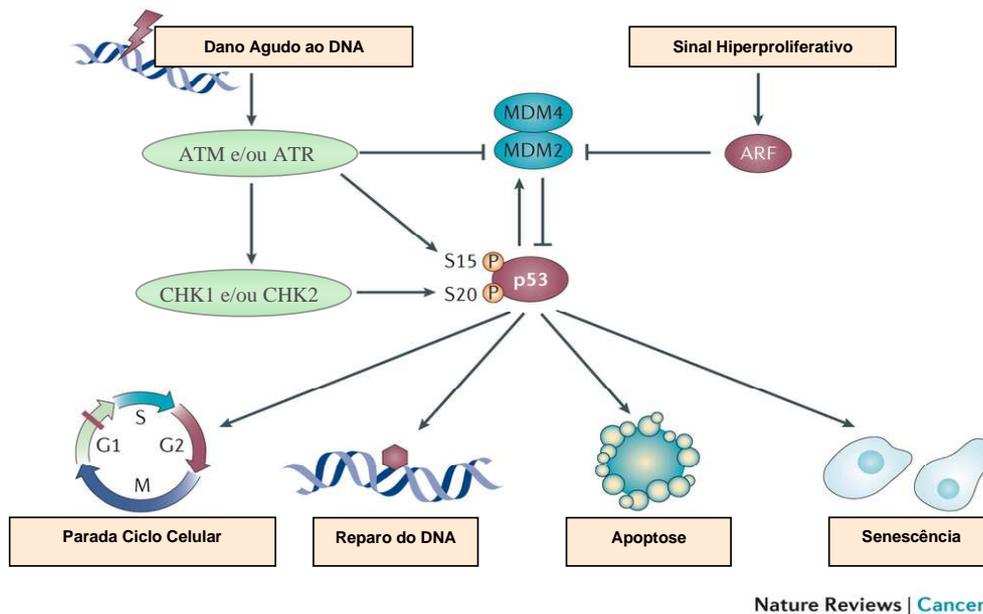


Figura 1.6: **Modelo de ativação de p53 em resposta a danos genotóxicos ou sinais hiperproliferativos.** A figura representa mecanismos de ativação da proteína p53. Sinais de estresse celular são capazes de ativar a proteína p53 através da fosforilação. A fosforilação de p53 inibe a repressão de p53 por MDM2. Uma vez ativa, p53 pode atuar como um fator de transcrição e induzir a expressão de genes envolvidos na parada do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose e senescência (Adaptado de BIEGING, 2014).

A perda da atividade de p53 tem um papel crucial no desenvolvimento de tumores. A evasão da resposta dependente de p53 geralmente ocorre por dois mecanismos distintos: mutações pontuais em *TP53* ou em proteínas que regulam a atividade de p53. Em cerca de metade dos tumores com perda da via de p53 o gene *TP53* se encontra mutado e em 95% destes a mutação está presente no domínio de ligação ao DNA (BULLOCK *et al*, 2000; HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000). Essas mutações geralmente conferem uma proteína com uma atividade dominante-negativo sobre o alelo selvagem remanescente, o que ocorre devido à hetero-oligomerização da proteína mutante com a proteína selvagem. A proteína mutante é mais estável que o p53 selvagem e é expresso em altos níveis nas células tumorais. Essas mutações geralmente levam a alterações estruturais e redução da interação da proteína com o DNA. Certos códons de *TP53* possuem altas frequências de mutações, e 28% das mutações acometem apenas 6 códons (175, 245, 248, 249, 273 e 282) de p53 (BARONI *et al*, 2004; PETIJEAN *et al*, 2009).

Além do papel bem caracterizado de p53 na regulação de vias em resposta a diversos sinais de estresse, já tem sido demonstrado a atuação de p53 na regulação de processos epigenéticos. Já foi reportado o papel de p53 na regulação da expressão de microRNAs, que são pequenos RNAs que atuam na regulação da

expressão de uma variedade de genes e consistem em um dos mecanismos de regulação epigenética (CHUANG *et al*, 2007; LIZ *et al*, 2015). O papel de p53 na regulação da expressão do miR-34, por exemplo, já tem sido bem caracterizado. Esse microRNA atua como um supressor tumoral e tem sua expressão regulada diretamente por p53. Muitas das funções de p53 são compartilhadas pelo miR-34 e a sua expressão confere maior robustez à resposta mediada por p53 em resposta aos sinais de estresse (HE *et al*, 2007; NAVARRO *et al*, 2015). A metilação do DNA é um outro mecanismo de regulação epigenética e consiste na transferência de grupamento metil para o DNA, preferencialmente em ilhas CpG, levando à formação de 5-metilcitosinas (ADAMS *et al*, 1979; HERCEG, 2007). A desaminação espontânea de citosinas e 5-metilcitosinas em sítios CpG leva ao mau pareamento G:T e, conseqüentemente, ativação de vias de reparo do DNA. A enzima timina DNA glicosilase (TDG) é responsável por iniciar o reparo por excisão de bases (BER) desses maus pareamentos (WATERS e SWANN, 1998; HARDELAND *et al*, 2003). Além do papel anti-mutagênico da TDG no reparo de DNA, através da sua atividade glicosilase, essa enzima também desempenha um papel importante na retirada de 5-metilcitosinas do DNA e, portanto, no processo de ativação da desmetilação do DNA (CORTELLINO *et al*, 2011). Um trabalho desenvolvido no nosso grupo demonstrou que p53 regula diretamente a expressão e atividade do promotor da TDG, demonstrando um papel indireto de p53 na regulação de um outro mecanismo de regulação epigenético: a metilação do DNA (DA COSTA *et al*, 2012).

1.2.1 TP53 e CEE

Como dito anteriormente, mutações no gene *TP53* são as alterações moleculares mais frequentemente encontradas nos tumores de esôfago, já tendo sido observadas em cerca de 40% dos CEE (MANDARD *et al*, 2000; IARC *TP53* DATABASE, 2016). Como o gene *TP53* encontra-se alterado em cerca de metade dos tumores humanos (HAINAUT e HOLLSTEIN 2000; BRONW *et al*, 2009), o amplo espectro de mutações nesse gene permite identificar as possíveis fontes geradoras das mesmas devido às “impressões digitais” características de cada tipo de dano deixadas no DNA (HAINAUT *et al*, 1998). Uma vez que determinados carcinógenos podem provocar mutações características no gene *TP53* (impressões digitais), a análise das alterações neste gene pode sugerir os carcinógenos que efetivamente contribuíram para a transformação maligna observada. A maior parte

das mutações do gene *TP53* em CEE (31%) são em bases A:T, sugerindo a ação de compostos genotóxicos de origem externa. Dessa forma, o tabaco, especialmente por causa de nitrosaminas e do benzo[a]pireno, potencializado por outros fatores como álcool ou metais, vírus, alimentação, clima ou susceptibilidade genética, pode estar relacionado às alterações encontradas (BLOT e MCLAUGHLIN, 1999).

Em relação ao perfil mutacional do gene *TP53* em CEE, foi descrito que pacientes apresentando essa malignidade e provenientes das regiões sudeste e sul do Brasil apresentavam uma prevalência de 34,5% de mutação em regiões *hot-spots* desse gene (éxons 5-8), sendo as mutações mais prevalentes as encontradas nos códons 248, 179, 214 e 220. A análise do perfil de mutações em *TP53* mostrou que os tipos de mutação em pacientes com CEE do sudeste do Brasil são semelhantes aos encontrados em pacientes com CEE residentes no sul da França, com alta porcentagem em alterações em bases A:T (ROSSINI *et al*, 2009). Esse tipo de mutação pode ser atribuído aos efeitos do acetaldeído, produto do metabolismo do etanol (NOORI *et al*, 2001), corroborando a participação de um dos principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento desse tumor descritos para essas áreas geográficas. Por outro lado, o perfil de mutações em *TP53* dos tumores de pacientes do sul do Brasil é semelhante às alterações encontradas em CEE de chineses, caracterizado pela transição de guanina para adenina em sítios CpG (LUNG *et al*, 1996; PUTZ *et al*, 2002; ROSSINI *et al*, 2009). Essa alteração pode ser decorrente ou da desaminação espontânea de 5-metilcitosinas levando à geração de timinas ou por altos níveis de óxido nítrico produzido durante o processo inflamatório (SOUICI *et al*, 2000). A ingestão de bebidas em altas temperaturas é um hábito cultural no sul do Brasil, representado pelo consumo de chimarrão, e em regiões de alta incidência de CEE, como a China (HU *et al*, 1994; CASTELLSAGUÉ *et al*, 2000). Mais uma vez, os dados de análise do perfil mutacional de *TP53* em CEE corroboram o envolvimento dos fatores etiológicos associados às regiões geográficas específicas com o desenvolvimento desse tumor.

Outros estudos recentes avaliaram o perfil mutacional de *TP53* em pacientes com CEE e provenientes de áreas de altíssima incidência dessa malignidade. No estudo realizado com uma população chinesa, foi demonstrado que a prevalência de mutações em *TP53* chegou a 93%. Na casuística avaliada, a mutação exômica mais prevalente foi a transição C:T preferencialmente em dinucleotídeos CpG (85% das alterações) (GAO, 2014). Um outro trabalho avaliando perfil mutacional de CEE na população chinesa demonstrou que 83% das amostras apresentaram mutações no

gene *TP53* e 85% das mutações estavam presentes no domínio de ligação ao DNA (SONG *et al*, 2014). Ainda, um outro estudo conduzido na província de Golestan, no Irã, reportou uma prevalência de 89,9% de mutações em *TP53* em pacientes com CEE quando foi avaliado a presença de mutações nos éxons 2 ao 11. O perfil de mutações encontradas foi bastante heterogêneo e padrões diferentes de mutações foram encontradas de acordo com a descrição da temperatura de consumo de chá consumido (ABEDI-ARDEKANI *et al*, 2011). Juntos, esses dados mostram que perda da atividade de p53 tem um papel crucial para o desenvolvimento do CEE.

Os estudos citados acima demonstram que *TP53* é frequentemente encontrado alterado em CEE e que sua alteração parece contribuir de maneira significativa para o desenvolvimento deste tumor, entretanto, os mecanismos pelos quais isso ocorre ainda não estão bem esclarecidos. O papel de p53 na carcinogênese esofágica tem sido sugerido pela alta prevalência de mutações no gene que codifica essa proteína (MANDARD *et al*, 2000; GAO, 2014; SONG *et al*, 2014). No entanto, alguns trabalhos já têm demonstrado o papel de p53 na regulação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do CEE. Já foi demonstrado que a p53 selvagem é responsável por induzir o aumento da expressão da TDG em linhagem de CEE. A TDG faz parte da via de reparo do DNA por excisão de base. Os autores mostraram que o aumento da expressão de p53 está diretamente associado ao aumento da expressão gênica e proteica da TDG. Além disso, foi demonstrado que p53 é capaz de se ligar ao promotor da *TDG* e induzir sua ativação. Células que possuem p53 mutante não foram capazes de ativar a transcrição da *TDG*, demonstrando o papel de p53 na ativação de um importante mecanismo de reparo do DNA (DA COSTA *et al*, 2012).

Um trabalho desenvolvido em nosso grupo demonstrou que há uma relação significativa entre o aumento da expressão gênica de *DNMT3B* e a presença de mutação em *TP53* no domínio de interação desta com o DNA, sugerindo um papel de p53 na regulação da expressão gênica das DNA metiltransferases (DNMTs). Das amostras que possuíam mutação em *TP53*, 85,7% apresentaram uma expressão pelo menos duas vezes maior de *DNMT3B* no tumor em relação ao tecido normal adjacente (SIMÃO, 2008). A possível regulação da expressão dessa enzima pela proteína p53 pode ser um importante indicador da interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos no desenvolvimento do CEE.

1.3 METILAÇÃO DO DNA

O termo epigenética diz respeito ao estudo das alterações no material genético que afetam o fenótipo, mas não o genótipo das células. Portanto, modificações epigenéticas são modificações que promovem a alteração da expressão gênica sem afetar a sequência de bases do DNA. Existem três mecanismos epigenéticos que levam à regulação da expressão gênica que são: metilação do DNA, modificação de histonas e RNAs associados ao silenciamento (ADAMS *et al*, 1979; MAI *et al*, 2005; HERCEG, 2007, LIZ *et al*, 2015). Atualmente, o mecanismo mais amplamente estudado é a metilação do DNA.

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético caracterizado pela adição de um grupamento metil (CH_3) no carbono de citosinas em dinucleotídeos CpG. Esta reação é catalizada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (HENDRICH *et al*, 2000; LI, 2002). O grupamento metil utilizado nessa reação é originado do doador de metil S-adenosil-metionina (SAM) (Figura 1.7). A formação do SAM depende de alguns micronutrientes provenientes da dieta, como vitamina B6, vitamina B2 e vitamina B12, que serão utilizados como substratos da via de metabolismo de um carbono (Figura 1.8) (ANDERSON *et al*, 2012).

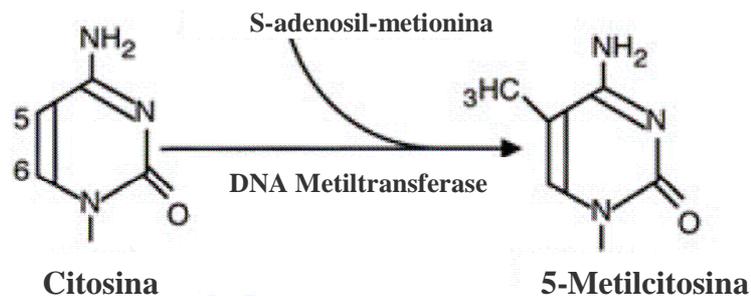


Figura 1.7: **Esquema da transferência do radical metil para citosinas gerando 5-metilcitosinas.** As enzimas DNMTs catalisam a transferência do grupamento metil do doador S-adenosil-metionina para o carbono 5 de citosinas, gerando a formação da base 5-Metilcitosina (Adaptado de KANAI, 2008).

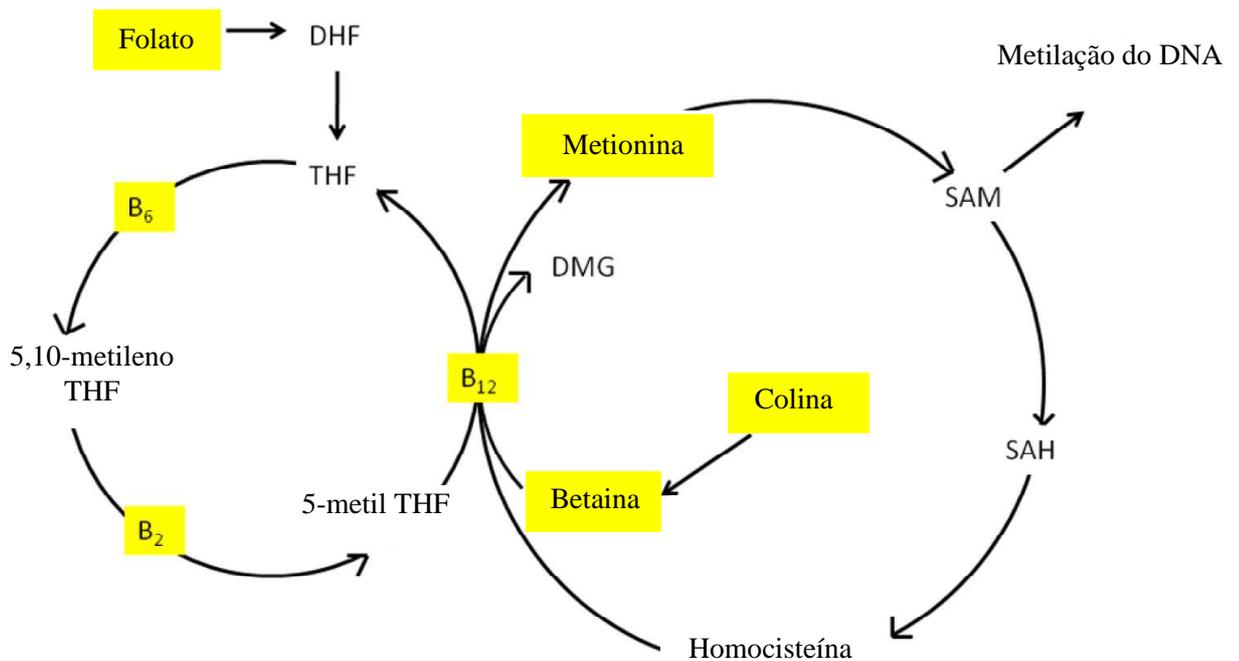


Figura 1.8: **Micronutrientes provenientes da dieta e que participam do metabolismo de um carbono.** A vitamina B6 é um co-factor para serina hidroximetil na conversão da tetra-hidrofolato (THF) a THF 5,10-metileno. (2) A vitamina B2 é um precursor de FAD, que é um co-factor para metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) na conversão de THF 5,10-metileno a 5-metil THF. (3) A vitamina B12 é um precursor de metionina sintase, envolvidos na produção de metionina a partir da homocisteína e betaina (Adaptado de ANDERSON, 2012).

A metilação do DNA tem um importante papel na modulação da estrutura da cromatina, na regulação transcricional e na estabilidade genômica e é essencial para o desenvolvimento dos mamíferos (HERCEG, 2007). Os dinucleotídeos CpG estão presentes no genoma humano sob a forma de ilhas e estão localizados principalmente nas regiões promotoras dos genes. Os dinucleotídeos CpG são encontrados em sequencias transponíveis, chamadas SINEs e LINEs (“*short interspersed nuclear elements*” e “*long interspersed nuclear elements*”). Em células normais, essas sequencias se apresentam metiladas, impedindo a expressão de retrotransposons, e promovendo a estabilidade do genoma. No entanto, em tumores, essas regiões se encontram hipometiladas, o que contribui para a instabilidade genômica observada (BESTOR, 2000; REIK, 2007; LOPEZ *et al*, 2009). A hipometilação também afeta a região promotora de oncogenes e genes que sofreram *imprinting* durante a embriogênese, fazendo com que eles sejam expressos em tumores (REIK, 2007). No entanto, em tumores, as regiões CpG presentes na região promotora de genes supressores de tumor se encontram hipermetiladas (Figura 1.9). Esse mecanismo impede a transcrição e está associado à perda de expressão de genes supressores tumorais (SIEGFRIED *et al*, 1999).

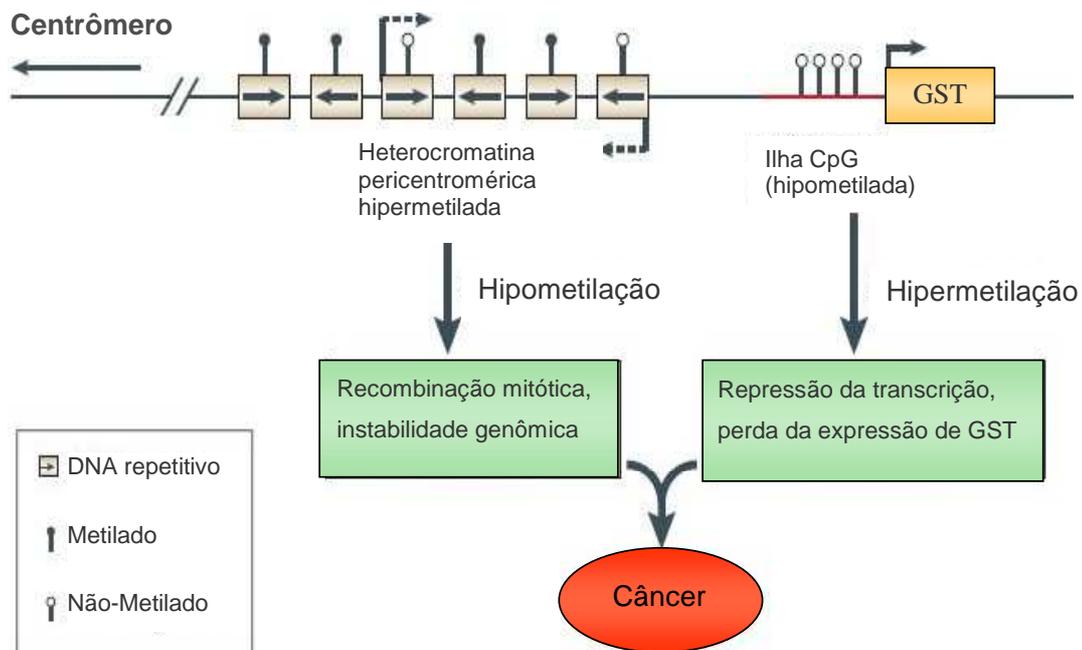


Figura 1.9: **Perfil de metilação no genoma de células tumorais.** Figura representativa do perfil de metilação do DNA de células normais e tumorais. Células normais possuem regiões de heterocromatina hipermetilada. No entanto, ilhas CpG presentes na região promotora de genes supressores de tumor (GST) se encontram hipometiladas. Células tumorais possuem regiões de heterocromatina hipometiladas, o que está associado à maiores taxas de recombinação mitótica e instabilidade genômica. Entretanto, as ilhas CpG presentes na região promotora de GST se encontram hipermetiladas, o que está associado à repressão da transcrição gênica. Tanto a hipometilação global quanto o silenciamento de GST podem contribuir para o desenvolvimento do Câncer (Adaptado de ROBERTSON, 2005).

A perda de metilação em dinucleotídeos CpG foi a primeira anormalidade epigenética identificada em células tumorais (FEINBERG e VOLGELSTEIN, 1983; FEINBERG e TYCKO, 2004). Feinberg e Vogelstein pesquisaram diferenças entre células tumorais e normais em 1983 e observaram que uma grande proporção de regiões CpG estava metilada nas células provenientes do tecido tumoral, quando comparado ao tecido normal (FEINBERG e VOLGELSTEIN, 1983). Em 1989, a hipermetilação em regiões promotoras do gene supressor tumoral *RB* foi associada ao seu silenciamento gênico e, em 1991, Sakai e colaboradores mostraram que a hipermetilação da região promotora de *RB* ocorria em apenas um dos alelos e estava associado à redução dos níveis de expressão do gene (SAKAI *et al*, 1991). A confirmação do silenciamento epigenético de genes supressores de tumor foi comprovada, através da demonstração de que havia 92% de redução da expressão gênica de *RB* em tumores com hipermetilação da sua região promotora (GREGER *et al*, 1994). Mais tarde, a expressão de uma série de outros genes supressores de tumor foi encontrada reduzida, como *MLH1*, *VHL*, *E-Caderina* e *CDKN2A*, em

linhagens celulares e em tumores primários e essa redução foi correlacionada à densa metilação dos dinucleotídeos CpG presentes nos promotores desses genes (CUNNIHGAM *et al*, 1998; HERMAN *et al*, 1994; GRAFF *et al*, 1995; FEINBERG e TYCKO, 2004).

1.3.1 DNA Metiltransferases (DNMTs)

Conforme citado anteriormente, as DNMTs são as enzimas responsáveis pela adição do radical metil ao carbono de citosinas integrantes de dinucleotídeos CpG, reação que caracteriza o processo de metilação do DNA. Em mamíferos foi descrito a presença de 5 DNMTs. A DNMT1 é classificada como DNMT de manutenção e foi a primeira a ser descoberta (BESTOT *et al*, 1988). Esta enzima é capaz de transferir grupos metil ao DNA hemimetilado, durante a replicação do DNA. Estudos têm mostrado que a DNMT1 tem preferência 10-40 vezes maior ao DNA hemimetilado do que ao DNA não metilado (BESTOR, 1992; PRADHAN *et al*, 1999). No entanto, fibroblastos com superexpressão de DNMT1 apresentam aumento da metilação *de novo*, mostrando que esta enzima também é capaz de realização esse tipo de metilação (VERTINO *et al*, 1996). A DNMT1 é capaz de realizar a manutenção dos padrões de metilação do DNA por dois mecanismos distintos: a interação direta com a forquilha de replicação (LIDA *et al*, 2002) ou pela interação com UHRF1, uma proteína que possui uma afinidade específica a sítios CpG hemimetilados (SHARIF *et al*, 2007). Durante a fase S do ciclo celular, a DNMT1 é transportada para o núcleo através do seu sinal de localização nuclear e no núcleo é endereçado para a forquilha de replicação mediante sua interação com PCNA (LIDA *et al*, 2002). O segundo mecanismo envolve a interação com a proteína UHRF1. A proteína UHRF1 se liga diretamente ao DNA hemimetilado através de seu domínio SRA (*SET and RING finger-associated domain*) e forma um complexo com a DNMT1, mediando seu deslocamento para o DNA hemimetilado (SHARIF *et al*, 2007). Além disso, já foi demonstrado que UHRF1 também é capaz de estimular a atividade de metilação do DNA exercida pela DNMT1 (BERKYUREK *et al*, 2014).

Embriões de camundongos *knockout* para DNMT1 (*DNMT1^{-/-}*) possuem uma hipometilação global, são raquíticos, mostram atraso no desenvolvimento e morrem durante a gestação, demonstrando que a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento de mamíferos (LI *et al*, 1992). De uma maneira geral, a manutenção da metilação do DNA possui uma frequência de erro de 5% por sítio CpG e por

divisão celular. Esses erros são minimizados pela atuação das DNMT3A e DNMT3B que auxiliam a DNMT1 na manutenção dos perfis de metilação do DNA durante a replicação (CHEN *et al*, 2003; JONES *et al*, 2009).

As enzimas DNMT3A e DNMT3B são responsáveis pela metilação *de novo* e, dessa forma, adicionam grupos metil a dinucleotídeos CpG do DNA sem a necessidade de uma fita-molde metilada (LUCZAK *et al*, 2006). As DNMT3A e DNMT3B interagem na mesma proporção com o DNA hemimetilado ou DNA não metilado (PRADHAN *et al*, 1999). Camundongos *knockout* para as enzimas DNMT3 mostraram que essas enzimas são necessárias para a metilação *de novo* que ocorre no genoma durante a implantação do embrião, bem como para a metilação *de novo* na integração de sequências retrovirais (JAHNER *et al*, 1982; OKANO *et al*, 1999). A DNMT3A tem sido identificada como responsável pela metilação de genes *imprinting* e a manutenção da metilação em regiões pericentroméricas. Regiões pericentroméricas são considerados alvos específicos da DNMT3B, uma vez que camundongos *DNMT3B* *-/-* perdem a metilação nessas regiões e morrem ainda no útero (OKANO *et al*, 1999). A DNMT3L faz parte da família DNMT3, porém não apresenta atividade catalítica. No entanto, já foi demonstrado que a DNMT3L é capaz de ativar os outros membros da família DNMT3. Os autores mostraram que a DNMT3L está co-localizada e imunoprecipita com as DNMT3A e DNMT3B em células embrionárias de camundongo. Além disso, as células *DNMT3L* *-/-* não são capazes de manter o padrão de metilação de genes *imprinting*. (HATA *et al*, 2002; KANAI, 2008). A análise cristalográfica da DNMT3A e da DNMT3L indicam que a interação entre essas proteínas leva à formação de um complexo heterotetramérico que possui dois sítios catalíticos (JIA *et al*, 2007). Também já foi descrito que a região N-terminal da DNMT1 pode se ligar à região N-terminal da DNMT3A e da DNMT3B, conferindo à DNMT1 uma atividade DNA metiltransferase *de novo*. Além disso, as enzimas DNMT3 podem atuar como DNA metiltransferases de manutenção na ausência da DNMT1 (FATEMI *et al*, 2002; KIN *et al*, 2002).

A DNMT2, também conhecida como TRDMT1, não possui atividade DNA metiltransferase. No entanto, esta enzima possui atividade RNA metiltransferase, tendo sido descrita como responsável pela transferência do grupamento metil para o a citosina 38 do RNA transportador do ácido aspártico (Figura 1.10) (GOLL *et al*, 2006). Ao contrário do descrito para as DNMT1, DNMT3A e DNMT3B, o silenciamento desse gene não levou a nenhuma alteração fenotípica, sugerindo que

a expressão da DNMT2 tenha maior relevância na evolução das espécies do que no desenvolvimento embrionário. (SCHAEFER *et al*, 2010, GROS *et al*, 2012).

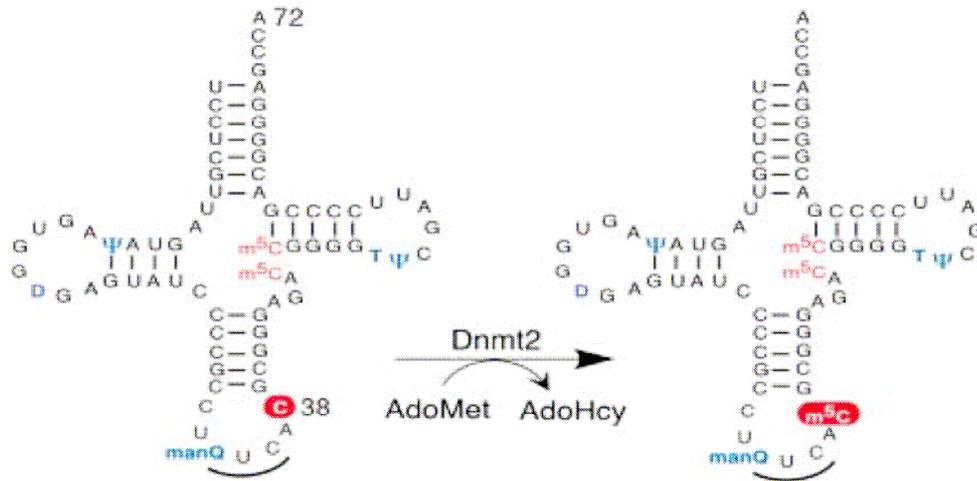


Figura 1.10: **Esquema da transferência do grupamento metil para a citosina 38 do RNA.** A DNMT2 catalisa a transferência do metil para o carbono 38 do RNA transportador de ácido aspártico (Retirado de GOLL, 2006).

O domínio catalítico C-terminal das DNMTs é caracterizado pela presença de 5 motivos altamente conservados: I, IV, VI, IX e X (Figura 1.11). Os motivos I e X formam o principal sítio de ligação ao SAM. O motivo IV fornece tiolato para o sítio de ativação. O motivo VI possui resíduos glutamílicos que adicionam prótons à citosina metilada, e, por fim, o motivo IX tem um papel na manutenção da estrutura do domínio de metilação (BESTOR *et al*, 1988; HERMANN *et al*, 2004; KANAI, 2008). A DNMT2 possui todos os motivos do domínio catalítico C-terminal conservados, mas perdeu o domínio regulatório N-terminal presente nas outras DNMTs (DONG *et al*, 2001). A porção N-terminal das DNMTs se liga ao DNA e possui uma variedade de domínios como o domínio de endereçamento nuclear, de interação com a cromatina, com a forquilha de replicação e com uma série de outras proteínas que irão, associadas às DNMTs, levar à modulação da cromatina e metilação do DNA (HERMANN *et al*, 2004; KANAI, 2008).

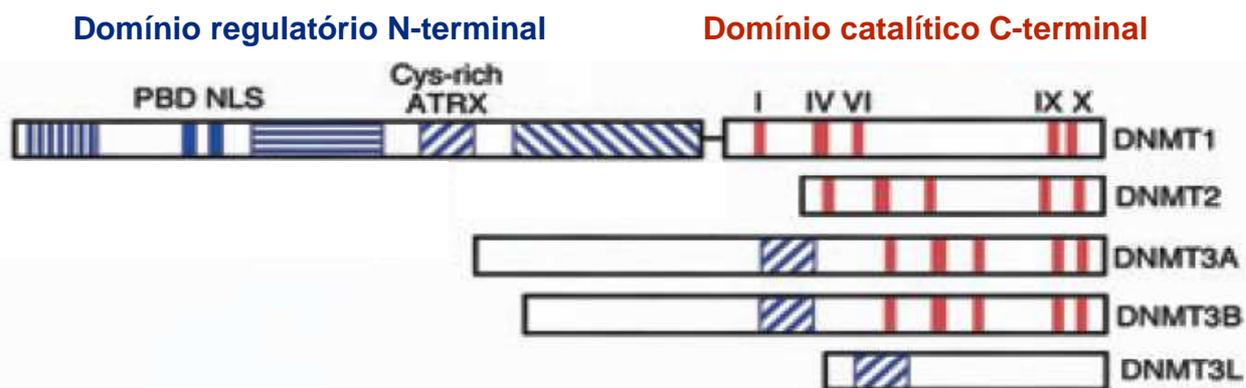


Figura 1.11: **Esquema representativo da estrutura gênica das DNMTs.** A estrutura das DNMTs é constituída por um domínio regulatório N-terminal (representado pela cor azul) e um domínio catalítico C-terminal (representado pela cor vermelha). A DNMT1 possui todos os domínios, enquanto que as DNMT3A e DNMT3B perderam parte do domínio regulatório. A DNMT2 possui apenas o domínio catalítico e a DNMT3L apenas o domínio regulatório (Adaptado de KANAI, 2008).

A superexpressão das DNMTs tem sido caracterizada em uma série de tumores humanos, que incluem os tumores de mama, colorretal, gástricos e fígado (GIRAULT *et al*, 2003; OH *et al*, 2007; FUJII *et al*, 2010; HE *et al*, 2013; PASTA *et al*, 2015). Em tumores esporádicos de mama, análises de expressão gênica mostraram que há maior expressão da *DNMT3B* em comparação com as outras *DNMTs*. Além disso, a *DNMT3B* foi superexpressa em 30% dos tumores e o aumento de sua expressão foi associado a tumores pouco diferenciados, ER (Receptor estrogênio) negativos e com a superexpressão de Ki-67 (GIRAULT *et al*, 2003). Em tumores colorretais, a análise da expressão protéica de DNMT1, por imuno-histoquímica, mostrou que há um aumento da expressão dessa enzima. Além disso, foi observado que há um aumento gradual na expressão dessa proteína no cólon de pacientes com colite ulcerativa, sugerindo que a alteração na expressão da DNMT1 seja um evento inicial no desenvolvimento de câncer colorretal (FUJII *et al*, 2010).

Apenas um trabalho mostrou o perfil de expressão gênica das *DNMTs* em CEE. Foi avaliada a expressão das *DNMTs* em 17 tumores e comparação com a amostra normal adjacente ao tumor. A expressão da *DNMT3B* foi significativamente maior nos tumores quando comparados ao tecido normal adjacente (SIMÃO *et al*, 2006). Além disso, já foi demonstrado que em CEE, o perfil global de metilação é alterado, tendo sido descritas, inclusive, alterações no tecido histologicamente normal adjacente ao tumor, sugerindo que essas alterações no padrão de metilação de determinados genes ocorrem precocemente (LIMA *et al*, 2011). O gene *p16* foi descrito hipermetilado em 35,7% das amostras de CEE analisadas em um estudo

nosso grupo e, destas, 53,3% apresentaram baixa expressão de *p16* e alta expressão de *DNMT3B* (SIMÃO *et al*, 2006). Esses resultados demonstram que as alterações de metilação, e conseqüentemente a atividade das DNMTs, são de grande importância para o desenvolvimento do CEE.

1.4 SP1

SP1 é uma proteína que faz parte da família de proteínas específicas (SP) que é composta por fatores de transcrição que possuem um domínio específico *zinc finger* de interação com o DNA (NAGAOKA *et al*, 2011). Os fatores de transcrição SP se ligam preferencialmente em regiões GC do genoma e podem ser separados em dois grupos: SP1-SP4 e SP5-SP9 (KINGSLEY *et al*, 1992; BEISHLINE *et al*, 2015). O domínio de organização das proteínas SP1-SP4 é muito similar. Entretanto, diferente dos outros membros da família SP, SP1 contém um domínio C-terminal de multimerização que medeia a ativação de promotores que contém múltiplos elementos responsivos a SP1 de forma adjacente (MASTRANGELO *et al*, 1991). As proteínas SP1 formam tetrâmeros que permitem a associação de regiões promotoras proximais com regiões *enhancers* distais pela formação de dobras no DNA. Além disso, a multimerização também expõe várias regiões das moléculas de SP1 para interações com outras proteínas e modificações pós translacionais (SU *et al*, 1991; MASTRANGELO *et al*, 1991).

SP1 é expresso em células de mamíferos e inicialmente foi descrito como um fator de transcrição participante da transcrição de uma série de genes constitutivos. Entretanto, hoje sabe-se que SP1 é importante para uma variedade de processos fisiológicos como regulação do ciclo celular, apoptose e diferenciação (BLACK *et al*, 2001; OLEAGA *et al*, 2012). Estimativas sugerem que existem pelo menos 12000 elementos responsivos a SP1 no genoma humano (CAWLEY *et al*, 2004). SP1 é superexpresso em vários tumores, incluindo câncer de mama, gástrico, pancreático, pulmão, gliomas e câncer de tireóide. Em muitos tumores, a expressão de SP1 tem sido associada ao estadiamento, potencial invasivo, metástase e pior prognóstico (CHIEFARI *et al*, 2002; WANG *et al*, 2003; JIANG *et al*, 2008; GUAN *et al*, 2012; BEISHLINE *et al*, 2015).

A associação entre a expressão de SP1 e o tabagismo já tem sido demonstrado em diferentes estudos. Um trabalho realizado com diferentes linhagens celulares de câncer de pulmão demonstrou que o tratamento destas com

extrato extraído do cigarro foi capaz de induzir o aumento da expressão proteica de SP1 e sua translocação para o núcleo celular após 3 horas de tratamento. Além disso, os autores demonstraram que SP1 foi capaz de ativar a transcrição de *MUC5AC*, um gene envolvido na síntese de muco, nessas linhagens (DI *et al*, 2012). Um dos mecanismos de ativação da proliferação celular mediada pela nicotina, um dos componentes do cigarro, ocorre pela ativação de receptores colinérgicos nicotínicos (CHRN). O tratamento de linhagens celulares de carcinoma de células escamosas de pulmão com a nicotina foi capaz de induzir a expressão da subunidade $\alpha 7$ do CHRN de via ativação transcricional mediada SP1 (BROWN *et al*, 2013). Além disso, já tem sido demonstrado que o gene *ABCG2* é um possível marcador de célula-tronco de CEE. Zhang e colaboradores demonstraram que a expressão de *ABCG2*, em linhagens de CEE e de carcinoma de pulmão, pode ser induzida após o tratamento destas com o extrato derivado do cigarro. No entanto, o tratamento destas linhagens com Mitramicina A, um inibidor da atividade de SP1, foi capaz de reverter esse efeito. Os autores também demonstraram que SP1 é capaz de se ligar à região promotora desse gene e ativar a sua transcrição (ZHANG *et al*, 2012).

SP1 tem sido descrito como responsável pela regulação de uma série de genes envolvidos no desenvolvimento de tumores. Já foi caracterizado que SP1 está envolvido na regulação de *MDM2*. A presença de polimorfismos específicos no promotor de *MDM2* tem sido associado ao aumento da expressão desta proteína devido ao aumento de sua transativação via SP1. A consequência do aumento da expressão de *MDM2* é a redução da expressão de p53 e aumento da suscetibilidade ao câncer (KNAPPSKOG *et al*, 2011). SP1 também já foi descrito como um importante regulador da expressão de *p16* e sua região promotora apresenta múltiplos sítios de ligação a SP1 e a expressão de SP1 é importante na indução da expressão de *p16* em fibroblastos humanos que entram em senescência (WU *et al*, 2007; WANG *et al*, 2007). SP1 também está envolvido na regulação de *IGF1R*. Já é bem descrito que a sinalização por *IGFR1* é utilizada por células tumorais para manutenção da proliferação. A região promotora desse gene possui 8 sítios de ligação a SP1 e essas regiões são essenciais para regulação da transcrição de *IGF1R*. Já foi descrito, também, que diversas outras proteínas interagem com SP1 na regulação de *IGF1R* (WERNER *et al*, 1990; MAOR *et al*, 2006; AIELLO *et al*, 2010). SP1 também foi identificado como o regulador

transcricional de *EGFR* em câncer e a inibição e ativação da transcrição de *EGFR* em tumores é dependente do parceiro protéico ligado a SP1 (JIN *et al*, 2012).

O fator de transcrição SP1 atua, muitas vezes, em cooperação com outro fator de transcrição intrinsecamente envolvido com processos carcinogênicos: o p53. Esses dois fatores de transcrição atuam conjuntamente na regulação do gene *p21*, levando a um aumento da atividade transcricional desse gene e, conseqüentemente, induzindo sua expressão gênica. No entanto, quando as células foram tratadas com Mitramicina A, um inibidor da ligação de SP1 aos seus sítios de ligação ao DNA, tiveram a ativação da transcrição de *p21* dependente de p53 inibida. (KOUTSONDOUTS *et al*, 2004). A interação entre p53 e SP1 também já foi demonstrada na ativação transcricional de *p21* em fibroblastos em senescência. Os autores mostraram há uma maior expressão de *p21* em fibroblastos em senescência. No entanto, a deleção dos sítios de ligação à SP1 na região promotora de *p21* foi capaz de inibir a atividade do promotor desse gene. Além disso, p53 foi capaz de interagir com SP1 e essa interação foi maior nos fibroblastos em senescência, via fosforilação de p53 e SP1, sugerindo o papel conjunto de p53 e SP1 na regulação transcricional de *p21* (KIM *et al*, 2014). A cooperação entre p53 e SP1 também foi demonstrada na repressão transcricional de genes pró apoptóticos durante a ativação de p53 (LI *et al*, 2014). A repressão transcricional de genes envolvidos na sobrevivência celular é essencial para a apoptose (GRINKEVICH *et al*, 2009) e os resultados obtidos por Li e colaboradores mostraram que houve a redução de mais de 50% da apoptose em células com p53 selvagem após a depleção de SP1 (LI *et al*, 2014). A interação entre p53 e SP1 também já foi observada durante a diferenciação de células epiteliais. A redução da expressão de citoqueratina 14 (CK14), um marcador de células basais epiteliais, durante o processo de diferenciação ocorre mediante a ligação de SP1 na região promotora da *CK14*. Além disso, a repressão da transcrição da *CK14* só foi observada após interação entre p53 e SP1 (CAI *et al*, 2012).

No entanto, já foi demonstrado que a interação entre p53 e SP1 na modulação da expressão gênica pode ser influenciada pelos níveis protéicos de p53 e SP1. Ki-67 é uma proteína nuclear e presente durante as fases do ciclo celular G1, S, G2 e M sendo considerado um marcador de células proliferativas. As proteínas p53 e SP1 atuam conjuntamente na inibição da transcrição de *Ki-67* e os autores concluíram que é necessária a interação entre p53 e SP1 para a repressão da expressão de *Ki-67*. No entanto, o aumento da expressão SP1 foi capaz de

reverter o efeito inibitório sobre o promotor de *Ki-67* e levar ao aumento da sua atividade. Dessa forma, ficou demonstrado que SP1 pode levar a efeitos antagônicos na expressão de *Ki-67* e isso pode ser causado devido à quantidade de SP1 disponível (WANG *et al*, 2011). Também já foi demonstrado que o complexo p53-SP1 regula negativamente a expressão de RLIM (*RING finger LIM domain-binding protein*). A proteína atua como regulador dos fatores de transcrição LHX2, LHX3 e LMO2, contribuindo para o controle do desenvolvimento embrionário. A análise da região promotora de *RLIM* mostrou que apenas SP1 possui sítios de ligação no promotor de *RLIM* e a atuação de p53 na regulação desse gene ocorre indiretamente, via formação de complexo com SP1. Contudo, a indução da expressão de SP1 levou ao aumento da atividade do promotor de *RLIM* e os autores concluíram que a regulação negativa de p53 sobre a transcrição do gene *RLIM* ocorre devido ao sequestro de SP1 e inibição de sua atividade (KONG *et al*, 2013). Em um outro trabalho, foi demonstrado a atuação de p53 associado a SP1 na regulação da expressão gênica do receptor de glicocorticóide (*hGR*). O gene *hGR* possui 3 regiões promotoras (1A, 1B e 1C). Os autores demonstraram, por sequenciamento, que a região promotora 1C de *hGR* possui nove regiões GC, que são sítios para interação de SP1. A superexpressão de SP1 levou ao aumento da atividade do promotor 1C de forma dose-dependente, enquanto que a co-transfecção com p53 levou à supressão da atividade do promotor. Por fim, os autores demonstraram que p53 é capaz de inibir a interação de SP1 com o DNA (SUEHIRO *et al*, 2004).

A atuação conjunta de SP1 e p53 na regulação da atividade de DNMT1 já foi demonstrada. Estève e colaboradores demonstraram que p53 é capaz de recrutar DNMT1 para o promotor da *survivina* e que essa interação entre p53 e DNMT1 induz o aumento da atividade metiltransferase da enzima e, conseqüentemente, redução da expressão do gene (ESTÈVE *et al*, 2005). *Survivina* é uma proteína que faz parte da família de inibidores da apoptose e é regulada negativamente por p53 (HOFFMAN *et al*, 2002). O promotor da *survivina* possui sítios de ligação para p53 e SP1. Em 2007, o mesmo grupo reportou que a proteína SP1 também é capaz de interagir com o complexo p53-DNMT1. Os autores demonstraram que SP1 se encontra ligado ao promotor da *Survivina*, levando à ativação da transcrição gênica. No entanto, após 15 horas de tratamento genotóxico com doxorrubicina, SP1 atua como âncora, recrutando o complexo p53-DNMT1. A interação entre p53-SP1-

DNMT1 foi associada à redução da expressão gênica de *Survivina* (ESTÈVE *et al*, 2007).

A regulação da expressão gênica de DNMT1 por SP1 já foi demonstrado em células de câncer de pulmão não pequenas células. Os autores demonstraram que o aumento da expressão de SP1 está associado a uma maior atividade do promotor da *DNMT1*. No entanto, a transfecção concomitante de p53 e SP1 é capaz de inibir o efeito ativador da transcrição exercido por SP1. A transfecção de p53 associada a baixas doses do vetor de expressão de SP1 foi capaz de levar à inibição da expressão de DNMT1. Além disso, a avaliação realizada em amostra humana, mostrou que há uma associação entre a superexpressão de DNMT1, a superexpressão de SP1 e a presença mutação no gene *TP53*. Os autores também demonstraram que pacientes com superexpressão de SP1 e DNMT1 apresentaram uma menor sobrevida (LIN *et al*, 2010).

Apenas um trabalho mostrou o perfil de expressão de SP1 em CEE. A avaliação foi realizada por imuno-histoquímica e os autores demonstraram que os pacientes em que tumores possuíam superexpressão de SP1 e Fascina apresentaram uma menor sobrevida em três anos (CAO, 2014). Portanto, pouco se sabe sobre o papel de SP1 na carcinogênese esofágica.

Como dito anteriormente, dados do nosso grupo demonstraram que há uma relação significativa entre o aumento da expressão da *DNMT3B* e a presença de mutações em *TP53* em CEE (SIMÃO TA, 2008), sugerindo um papel de p53 na regulação da expressão das DNMTs nesse tumor . Somado a isso, ainda em CEE, já é sabido que mutação em *TP53* é a principal alteração genética encontrada e que o padrão de metilação do DNA, mecanismo epigenético mediado pelas DNMTs, também é alterado e já na mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor (LIMA *et al*, 2011), sugerindo que alterações no perfil de metilação são alterações precoces na carcinogênese esofágica. Dessa forma, a possível regulação das DNMTs pela proteína p53 pode ser um importante indicador da interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos envolvidos no desenvolvimento desses tumores. Além disso, as proteínas p53 e SP1 atuam em conjunto na regulação da expressão de diversos genes (ESTÈVE *et al*, 2005; WANG *et al*, 2011; KONG *et al*, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre o possível o papel de p53 e SP1 na regulação das enzimas que participam da metilação do DNA em CEE.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível papel das proteínas p53 e SP1 na regulação da expressão gênica das DNA Metiltransferases 1 (DNMT1), 3A (DNMT3A) e 3B (DNMT3B) em Carcinoma Epidermóide de Esôfago (CEE).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de expressão gênica das *DNMTs* e *SP1* em amostras de pacientes com CEE, de acordo com o status mutacional do gene *TP53*, e possíveis associações aos dados clinico-patológicos;
- Avaliar a expressão gênica e proteica das *DNMTs* em linhagens celulares que expressam ou não p53 ativa, após modulação da expressão e atividade de SP1 e/ou de p53;
- Avaliar a presença de elementos responsivos às proteínas p53 e SP1 na região promotora dos genes que codificam as *DNMTs*;
- Avaliar se ocorre a ligação de p53 e SP1 na região promotora das *DNMTs*, bem como suas conseqüências sobre a atividade transcricional do promotor de *DNMT1*, após modulação da expressão e atividade de SP1 e/ou de p53;
- Avaliar o efeito da diminuição da expressão das *DNMTs* sobre os níveis de metilação global do DNA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS DE PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO (CEE)

Foram utilizadas amostras tumorais de trinta e cinco pacientes com diagnóstico confirmado de CEE e matriculados no Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) entre os anos de 2013 e 2015. A utilização das amostras foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética do INCA (Número de registro: 116/11) (Anexo 1) e os pacientes consentiram a participação no estudo através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

As amostras avaliadas consistiram de biópsias coletadas através de exame de endoscopia digestiva, no qual foi retirado um fragmento de tecido esofágico tumoral apenas de pacientes que não haviam sido submetidos a tratamento quimio e/ou radioterápico. Os dados epidemiológicos e clínico patológicos foram obtidos através da análise dos prontuários dos mesmos.

3.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS *DNMTS*, *SP1* E *TP53* EM CEE

3.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita utilizando o *RNeasy Mini kit* (QIAGEN, ALEMANHA), seguindo as orientações do fabricante. A extração do RNA foi feita de um fragmento da biópsia de até 30 mg. O tecido foi macerado com auxílio de um pilão na presença de 600 µL do tampão RLT acrescido de beta-mercaptoetanol. As amostras foram submetidas à centrifugação por 3 minutos à velocidade de 12.000 x g. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 1 volume de etanol 70% foi adicionado. Após homogeneização, 700 µL da solução foram transferidas para uma coluna de purificação alocada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 15 segundos a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e o procedimento foi repetido até passar toda a solução pela coluna. Em seguida, 700 µL do tampão RW1 foram adicionados na coluna de purificação e centrifugados por 15 segundos a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi

descartado e 500 μ L do tampão RPE foram adicionados a coluna de purificação e, posteriormente, centrifugados por 2 minutos a 8.000 x g. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 1 minuto a 12.000 x g. Após essa centrifugação, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 30 μ L de água livre de RNase foram adicionados na coluna com o objetivo de eluir o RNA ali contido. As amostras foram submetidas à nova centrifugação à 8.000 x g por 1 minuto. Os tubos contendo o RNA total extraído foram armazenados à -80°C.

3.2.2 Quantificação de RNA

A quantificação do RNA foi feita através de espectrofotometria (NANODROP, EUA). O aparelho foi configurado para mensurar ácidos nucleicos, com comprimento de onda de 260 nm. Em seguida, foi aplicado 1 μ L do RNA total extraído no leitor óptico do aparelho. O resultado mostra a concentração de RNA em μ g/ μ L e o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a absorvância em 260 nm e 280 nm (comprimento de onda necessário para mensuração de proteínas da solução). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão mostrou um valor maior que 1,7. O cálculo da concentração do RNA levou em consideração a informação de que uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 40 μ g/ mL de RNA.

3.2.3 Reação de Transcrição Reversa (RT)

O RNA extraído foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) pela enzima *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* (INVITROGEN, EUA). Foi adicionado ao tubo de reação de cada amostra 1 μ g de RNA, 1 μ L de oligonucleotídeo randômico (250 ng) e 1 μ L de cada desoxirribonucleotídeo na concentração de 10 mM. As amostras foram incubadas à 65°C por 5 minutos. Posteriormente foi adicionado 4 μ L do tampão de enzima 5x, 2 μ L do cofator DTT à 0,1 M e 1 μ L de *RNase Out*. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida foi adicionado 1 μ L (200U) da enzima *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase* (INVITROGEN, EUA) em cada amostra. A reação de RT utilizou o seguinte perfil térmico: 25°C por 10 minutos; 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas à -20°C.

3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (PCRq)

Com o objetivo de analisar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) dos genes investigados, foi utilizada a técnica de PCRq. Para tal, foi utilizado o fluoróforo *SYBR Green* (QIAGEN, ALEMANHA). A reação foi realizada em um volume final de 15 μL contendo: 7,5 μL de *Quantifast SYBR Green PCR Master Mix 2X*, presente no *kit QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (QIAGEN, ALEMANHA); 0,5 μL de cada iniciador à 10 μM ; 1 μL do cDNA transcrito na reação de RT. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação estão descritos na tabela 3.1. A reação de PCR utilizou o seguinte perfil térmico: 95°C por 5 minutos (desnaturação do DNA), 40 ciclos compostos por 95°C por 5 segundos e 60°C por 10 segundos (hibridação dos iniciadores e síntese da cadeia complementar). Ao final dos ciclos, foi realizado uma curva de dissociação, com variação da temperatura de 65°C a 95°C, durante 5 segundos em cada ponto da curva. Os pontos tiveram variação de 1°C. A curva de dissociação foi realizada para avaliação da possível formação de produtos inespecíficos e/ou contaminações na reação. O *GAPDH* foi o gene constitutivo utilizado como controle endógeno em todos os experimentos. As reações foram analisadas pelo programa *Rotor-Gene 6000 Series Software* (QIAGEN, ALEMANHA).

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para avaliação da expressão gênica.

Gene	Iniciadores	Produto Amplificado
DNMT1	S: 5' GATGTGGCGTCTGTGAGGT 3' AS: 5' CCTTGCAGGCTTTACATTTCC 3'	151 pb
DNMT3A	S: 5' CCTGAAGCCTCAAGAGCAGT 3' AS: 5' TGGTCTCCTTCTGTTCTTTGC 3'	134 pb
DNMT3B	S: 5' CAAATGGCTTCAGATGTTGC 3' AS: 5' TCCTGCCACAAGACAAACAG 3'	163 pb
TP53	S: 5' CCTGAGGTTGGCTCTGACTG 3' AS: 5' ACAGGCACAAACACGCACC 3'	165 pb
SP1	S: 5' GAGTTGGTGGCAATAATGGG 3' AS: 5' GATGGCTGGGACTCCTGC 3'	118 pb
GAPDH	S: 5' CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA 3' AS: 5' AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT 3'	124 pb

3.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL DO GENE *TP53* EM CEE

A presença de mutações no gene *TP53* já havia sido previamente avaliada (SANTOS, 2016), conforme descrito abaixo.

3.3.1 Extração de DNA

A extração foi realizada seguindo o protocolo descrito pelo fabricante do *DNEasy Blood and Tissue kit* (QIAGEN, ALEMANHA). As biópsias de CEE foram maceradas com o auxílio de um pilão acrescido de 300 µL de tampão ATL. Após esse processo, foi adicionado a proteinase K, com posterior incubação a 56°C em agitação constante por 2 horas. A inativação da proteinase K foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante 10 minutos. As amostras foram então submetidas à centrifugação à 14000 rpm por 30 segundos e foi adicionado 200 µL de tampão de ligação e 200 µL de etanol absoluto. Após a homogeneização das soluções, este conteúdo foi então transferido para a uma coluna com tubo coletor (contidos no *kit*) e centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto. Adicionou-se em seguida, 500 µL de tampão de lavagem a coluna e esta foi submetida à centrifugação na velocidade de 14000 rpm por 1 minuto. Posteriormente, foi adicionado 500 µL de um segundo tampão de lavagem presente no *kit* a coluna e esta foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto. Em seguida, foi

acrescentado ao centro da coluna 30 μL de tampão de eluição (contido no *kit*). As amostras foram submetidas à centrifugação a 14000 rpm por 1 minuto.

3.3.2 Quantificação de DNA

A quantificação do DNA foi feita através de espectrofotometria (NANODROP, EUA) e os ácidos nucleicos foram medidos em comprimento de onda de 260 nm. Foi aplicado 1 μL do DNA total extraído no leitor óptico do aparelho e foi possível avaliar a concentração de DNA em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e o grau de pureza da amostra a partir da razão entre a absorvância em 260 nm e 280 nm (comprimento de onda necessário para mensuração de proteínas da solução). As amostras foram consideradas puras quando o resultado desta razão mostrou um valor maior que 1,7. O cálculo da concentração do DNA levou em consideração a informação de que uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA.

3.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação de *TP53*

O gene *TP53* foi amplificado através da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores, compreendendo os exons 2 ao 11 do gene. Os iniciadores utilizados foram: Exons 2-4 S 5' CCAGGTGACCCAGGGTTGGA 3' AS - 5' AGCATCAAATCATCCATTGC 3'; Exons 5-9 S - 5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT 3' AS - 5' ACTTGATAAGAGGTCCCAAG 3'; Exons 10-11 S - 5' CAATTGTA ACTTGAACCATC 3' AS - 5' AGGCTGTCAGTGGGGAACAA 3'. Em cada 40 reação foram adicionados 2,5 μL do tampão 10X, 0,8 μL de MgCl_2 , 2,5 μL do mix dos três pares de iniciadores, 0,25 μL de dNTP, 1 unidade de Taq Platinum (INVITROGEN, EUA), 50 ng de DNA e água suficiente para completar volume final de 25,0 μL . Posteriormente, os produtos de PCR foram purificados com o *kit PureLink™ Genomic DNA Purification* de acordo com o protocolo do fabricante (INVITROGEN, EUA).

3.3.4 Sequenciamento de *TP53*

As amostras foram sequenciadas com a utilização do equipamento *Illumina HiSeq 2000*, seguindo as recomendações do fabricante. Em cada canaleta do sequenciador foram colocadas quatro amostras. As reações de sequenciamento foram feitas com 100 ciclos utilizando o primer senso e 100 ciclos utilizando o iniciador antisenso formando para cada fragmento da biblioteca produtos de 100 pb em cada ponta do fragmento (*reads*). Durante a corrida, são geradas e analisadas as imagens que fizeram a captura da fluorescência durante a síntese da *read*. A análise dessas imagens foi salva nos chamados arquivos *base calling* (BCL). Os arquivos BCL, juntamente com os arquivos contendo as localizações dos *clusters*, arquivos LOCS, foram convertidos para arquivos FastQ utilizando o software CASAVA (ILLUMINA, EUA). Os arquivos FastQ contém as sequências das *reads* bem como a qualidade do sequenciamento de cada base na escala Phred.

3.4 COLETA DE INFORMAÇÕES DO BANCO DE DADOS THE CANCER GENOME ATLAS (TCGA)

Informações sobre os dados de expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *SP1* e status mutacional de *TP53* de pacientes diagnosticados com CEE e depositados no TCGA, bem como os seus dados clínico-patológicos e epidemiológicos, foram extraídos e analisados. As informações foram extraídas da base de dados públicas *cBioPortal for Cancer Genomics* (CERAMI *et al*, 2012; GAO *et al*, 2013).

3.5 LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram a TE-1 e a TE-13, ambas derivadas de CEE, e HCT-116, derivada de carcinoma colorretal. As linhagens celulares foram gentilmente cedidas pelo Dr. Pierre Hainaut (IARC, França). A fim de garantir que as linhagens estavam isentas de contaminação por micoplasma, testes periódicos com o *kit MycoSensor PCR Assay* (AGILENT, EUA) foram realizados.

A linhagem celular TE-1 apresenta uma mutação termo-sensível no éxon 8 do gene *TP53* que leva à troca de uma valina por uma metionina no códon 272. A troca de aminoácidos gerada pela mutação leva a uma mudança conformacional na

proteína p53 que impede a ligação da proteína à região promotora dos seus genes alvo e, conseqüentemente, a transativação dos mesmos, quando as células são cultivadas à temperatura padrão de 37°C. No entanto, quando a linhagem é cultivada a 32°C, a proteína p53 adquire uma conformação selvagem e, portanto, capaz de transativar os genes regulados por ela (BARNAS *et al*, 1997). A linhagem TE-13 não apresenta alterações na sequência gênica de *TP53*. No entanto, muito baixos níveis de RNAm são encontrados e não há detecção proteica de p53, o que pode ser devido a uma falha na transcrição ou processamento pós-transcricional (BARNAS *et al*, 1997).

As linhagens derivadas de CEE (TE-1 e TE-13) foram cultivadas com meio RPMI 1640 (GIBCO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-Glutamina/Penicilina/Estreptomicina (GIBCO, EUA). As linhagens foram mantidas em estufa à 37°C sob 5% de CO₂. Para que a proteína p53 obtivesse uma conformação selvagem, a linhagem TE-1 foi mantida por no mínimo 8 horas em estufa à 32°C.

A linhagem HCT-116, também utilizada neste estudo, é derivada de carcinoma colorretal e selvagem para p53. Esta foi cultivada com meio McCoy's 5A (GIBCO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% do coquetel L-Glutamina/Penicilina/Estreptomicina (GIBCO, EUA). As células foram cultivadas à 37°C sob 5% de CO₂.

Todas as linhagens utilizadas nesse trabalho estão descritas na tabela 3.2.

Tabela 3.2: **Descrição das linhagens celulares utilizadas no estudo.**

Linhagens	Idade do paciente	Sexo do paciente	Histologia	Origem da linhagem	Tumorigenicidade em camundongos
TE-1	58	M	Carcinoma Epidermóide de esôfago	Lesão Primária	+
TE-13	65	F	Carcinoma Epidermóide de esôfago	Lesão Primária	+
HCT-116	Adulto	M	Carcinoma Colorretal	Lesão Primária	+

3.6 TRATAMENTOS

3.6.1 Transfecção de vetor de expressão de p53 e SP1

Com o objetivo de induzir a expressão de p53 e SP1, as linhagens celulares foram transfectadas com vetores de expressão contendo a sequência codificante de p53 ou SP1. O vetor de expressão de p53, pcDNA3-p53, foi produzido e gentilmente cedido, assim como seu arcabouço (pcDNA3) utilizado como controle, pelo Dr. Pierre Hainaut (IARC, França). O vetor de expressão de SP1, pN3-SP1 (#24543, ADDGENE), e o seu arcabouço utilizado como controle, pN3 (#24544, ADDGENE), foram comercialmente obtidos no repositório de plasmídeos AddGene. As figuras 3.1 e 3.2 ilustram os arcabouços utilizados para construção do vetor de expressão de p53 e SP1, respectivamente.

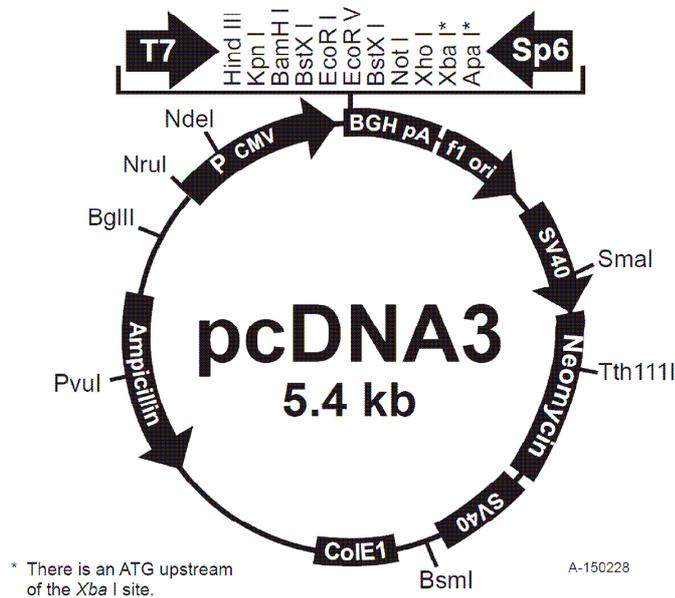


Figura 3.1: Mapa do vetor pcDNA3 (INVITROGEN, EUA) utilizado como controle e na transfecção do gene *TP53*. O vetor pcDNA3 possui 5,4 kb e foi concebido para transfecção gênica estável ou transitória em mamíferos. Este vetor possui muitos locais de clonagem nas orientações (+) e (-). Possui o promotor imediato precoce do citomegalovírus (CMV) e possui os genes de resistência à Ampicilina e Neomicina.

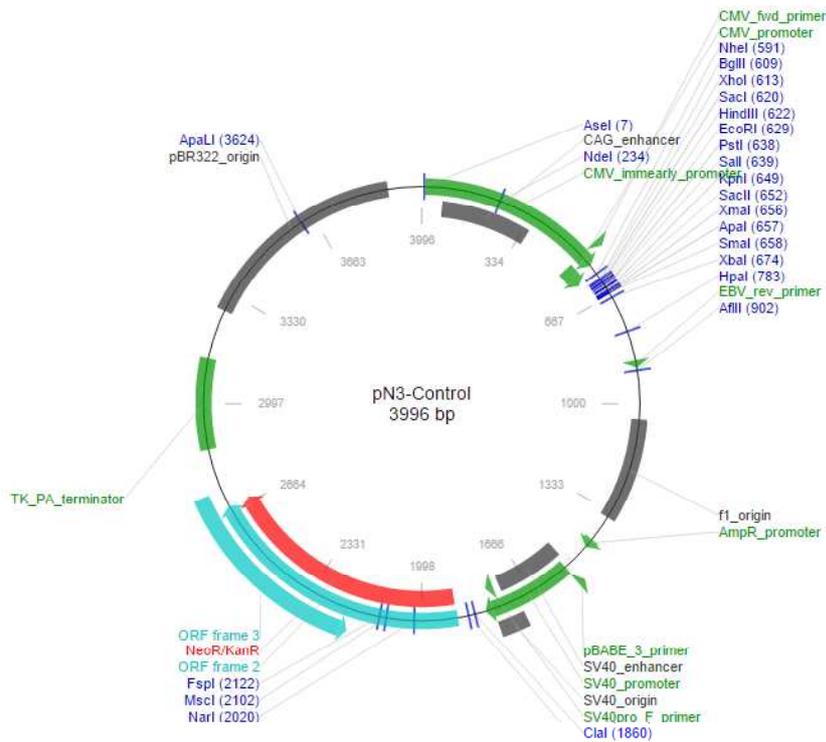


Figura 3.2: Mapa do vetor pN3 (ADDGENE, Austrália) utilizado como controle e na transfecção do gene *SP1*. O vetor pN3 possui 3996 bp e foi concebido para transfecção gênica estável ou transitória em mamíferos. Possui o promotor imediato precoce do citomegalovírus (CMV) e possui o gene de resistência à Kanamicina.

Para que tal experimento fosse realizado, as linhagens TE-1, TE-13 e HCT-116 foram cultivadas em placas de 6 poços. Nas 24 horas que antecederam o experimento, foi feito o plaqueamento de 2×10^5 células TE-1 e $2,5 \times 10^5$ células TE-13 e HCT-116 em cada poço. Para realização da transfecção das células foi adicionada ao meio Opti-MEM (GIBCO, EUA) quantidades crescentes dos vetores de expressão de p53 e/ou SP1 de acordo com a linhagem celular, totalizando um volume de 50 μ L. Uma segunda preparação foi feita simultaneamente adicionando 3 μ L do reagente transfectante *Lipofectamine 2000* (INVITROGEN, EUA) para cada 1 μ g de plasmídeo ao meio Opti-MEM (GIBCO, EUA), totalizando um volume de 50 μ L. Ambas soluções permaneceram em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as soluções foram misturadas e foram deixadas à temperatura ambiente por mais 20 minutos. Em seguida, os 100 μ L da solução final foi adicionado em cada

poço após prévia troca do meio de cultura específico de cada linhagem celular. Após 24 horas as células foram coletadas conforme descrito no item 3.7.

3.6.2 Inibição da Expressão Gênica de *TP53* e *SP1* pelo uso de RNA de interferência (siRNA)

A inibição da expressão gênica de *TP53* e *SP1* foi realizada utilizando siRNAs específicos nas linhagens celulares TE-1, TE-13 e HCT-116. 2×10^5 células TE-1 e $2,5 \times 10^5$ células TE-13 e HCT-116 foram plaqueadas/ poço/ placa de 6 poços e, em seguida, 5 μ L do reagente *K2 Multiplier* (BIONTEX, Alemanha) foi adicionado em cada poço e as células incubadas à 37°C por 2 horas. Após esse período, 1 μ L do siRNA anti-*TP53* 20 μ M (ID: 106141, AMBION, EUA) ou siRNA anti-*SP1* 20 μ M (ID:13319, AMBION, EUA) ou siRNA SCR controle (AM4611, AMBION, EUA) foi adicionado ao meio Opti-MEM (GIBCO, EUA), totalizando um volume final de 20 μ L. Uma segunda solução foi preparada simultaneamente contendo 1,2 μ L do reagente de transfecção K2 (BIONTEX, Alemanha) e 15 μ L do meio Opti-MEM (GIBCO, EUA). As soluções foram mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos e misturadas em seguida. A solução final permaneceu à temperatura ambiente por 15 minutos e, posteriormente, os 36,2 μ L finais desta foram adicionados aos poços contendo as células. Após 24 horas, o meio de cultura das amostras foi substituído e nova solução contendo siRNA foi adicionado e a incubação foi feita por mais 24 horas quando as células foram coletadas, conforme descrito no item 3.7.

3.6.3 Tratamento com Metil Metanosulfonato (MMS)

Com o objetivo de induzir a expressão de p53 após o dano genotóxico, as linhagens celulares foram tratadas com agente alquilante do DNA Metil Metanosulfonato (MMS) (SIGMA, EUA). Para que tal experimento fosse realizado, 2×10^5 células/ poço da linhagem celular TE-1 foram plaqueadas 24 horas antes do tratamento. No dia do tratamento, o meio de cultura foi trocado por meio fresco (2mL por poço) e foi adicionado o MMS (SIGMA, EUA) na concentração de 1mM/poço. O tempo de incubação do MMS nas amostras foi de 3, 6 e 24 horas. Ao final do período de incubação, as células foram coletadas conforme descrito no item 3.7.

3.6.4 Tratamento com Mitramicina A

Para inibir a ligação de SP1 à região promotora dos genes avaliados, as células foram tratadas com Mitramicina A (SIGMA, EUA). Mitramicina A é um policetídeo policíclico aromático isolado da *Streptomyces strains*. Este policetídeo é capaz de se ligar em regiões ricas em G-C do DNA, onde ocorre a ligação de SP1 e, conseqüentemente, impede a sua ligação. Portanto, a Mitramicina A é capaz de inibir a transcrição de genes que regulados por SP1 (MILLER *et al*, 1987). Para a realização do tratamento com Mitramicina A (SIGMA, EUA), 2×10^5 células TE-1 e $2,5 \times 10^5$ células TE-13 foram plaqueadas/poço/ placa de 6 poços 24 horas antes do tratamento. No dia do tratamento, o meio de cultura específico de cada linhagem foi substituído por 2 ml de meio de cultura fresco contendo Mitramicina A (SIGMA, EUA). Para avaliação da expressão gênica e proteica das DNMTs e p53, a Mitramicina A foi utilizada nas concentrações crescentes de 50 nM, 100 nM e 200 nM e o tempo de incubação foi de 24 horas. Para avaliação da porcentagem de metilação em LINE-1, a Mitramicina A foi utilizada na concentração de 50nM por 24 horas, 48 horas e 54 horas. Posteriormente, as células foram coletadas conforme descrito no item 3.7.

3.7 COLETA DAS CÉLULAS

As células foram coletadas após os tratamentos para posterior extração de RNA e proteínas. Para a coleta das células, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com 1 ml tampão PBS 1x para retirada das células mortas e resto de meio de cultura. Em seguida, foi adicionado às amostras 500 µL de Tripsina-EDTA 0,25% (SIGMA, EUA) e as células foram incubadas em estufa à 37°C por 2 minutos. Após o tempo de incubação, foi adicionado 500 µL de meio de cultura com o objetivo de parar a atividade da tripsina. As células foram coletadas e submetidas à centrifugação por 5 minutos à 1500 rpm. O precipitado de células foi lavado com tampão PBS 1x e as células foram submetidas a nova centrifugação por 5 minutos a

1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e as células foram armazenadas em *freezer* à -80°C.

3.8 ENSAIO DE APOPTOSE

Os níveis de apoptose das células após os tratamentos com MMS e Mitramicina A e após transfeção as linhagens com a utilização do reagente *Lipofectamine 2000* (INVITROGEN, EUA) foram avaliados pela marcação das mesmas com o anticorpo anti-anexina V. Para tal, foi utilizado o kit *Apoptosis Detection Kit II* (BD BIOSCIENCES, EUA). Após o término dos tratamentos, as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação acrescido de 5 µL de anexina V FITC e 5 µL de iodeto de propídeo. As células foram incubadas nesta solução por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 400 µL do tampão de ligação e a porcentagem de células positivas para anexina V foi avaliada por citometria de fluxo (*FACScalibur Becton Dickison*), após a aquisição de 10.000 eventos. A excitação do fluorocromo foi feita a partir de um laser de argônio com um comprimento de onda de 488 nm e a emissão foi coletada através de um filtro de 530/30 nm.

3.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

3.9.1 Extração de RNA

A extração de RNA das células foi realizada pelo método de fenol-clorofórmio com o uso do reagente TRizol[®] (AMBION, EUA). Após a coleta das células, conforme descrito no item 3.7, foi adicionado ao precipitado de células 1 mL do reagente TRizol[®] e estes permaneceram à temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 200 µL de clorofórmio (MERCK MILLIPORE, EUA) e foi feita a mistura vigorosa dos reagentes por 15 segundos e sua incubação à temperatura ambiente por 3 minutos. A amostra foi submetida à centrifugação por 15 minutos à 12000 rpm, 4 °C e a fase aquosa foi retirada e transferida para outro tubo. À fase aquosa foi adicionado 500 µL de isopropanol (MERCK MILLIPORE, EUA) e

esta foi mantida à -20 °C por 1 hora. Após o tempo de incubação, a amostra foi submetida à nova centrifugação por 10 minutos, à 12000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi retirado e foi acrescentado às amostras 1 mL de etanol 75%. Estas foram submetidas a centrifugação por 5 minutos a 7500 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* de RNA foi ressuspensionado com 20 µL de água *RNAse free*. As amostras foram incubadas a 60 °C durante 15 minutos e armazenadas em *freezer* a -80 °C.

O RNA extraído foi quantificado seguindo a descrição presente no item 3.2.2. Em seguida, o RNA foi reversamente transcrito em DNA complementar (cDNA) pela enzima *SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (INVITROGEN, EUA), conforme descrito no item 3.2.3. Este material foi utilizado para posterior avaliação da expressão gênica das *DNMTs*, *TP53* e *SP1* pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq), conforme protocolo descrito no item 3.2.4.

3.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTÉICA

3.10.1 Extração de Proteínas Nucleares

A extração de proteínas foi realizada de modo a possibilitar a separação entre as proteínas presentes nos diferentes compartimentos celulares e isolamento do extrato de proteínas nucleares, que foram utilizadas nesse estudo. Após a coleta das células, conforme descrito no item 3.7, o precipitado de células foi ressuspensionado com PBS 1 x gelado e submetido à centrifugação por 5 minutos à 1500 rpm. O sobrenadante foi retirado e uma nova lavagem com PBS 1 x foi realizada, seguida de centrifugação. Foi adicionado ao precipitado de células 50 µL do tampão A (Tris 1 M, Glicerol 50%, KCl 1 M, NP40 10%, EDTA 0,5 M, β-Mercaptoetanol 250 mM) e, em seguida, as amostras foram incubadas à 4 °C durante 8 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas a centrifugação por 5 minutos à 14000 rpm, 4 °C. O sobrenadante, contendo as proteínas citoplasmáticas, foi descartado e, ao precipitado, foi adicionado 20 µL do tampão B (Tris 1 M, Glicerol 50%, KCl 1 M, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M, β-Mercaptoetanol 250 mM), seguido de incubação por 30 minutos à 4°C. Por fim, as amostras foram centrifugadas durante 8 minutos à 14000 rpm, 4 °C e o sobrenadante, contendo as proteínas nucleares, foi recolhido e armazenado em *freezer* à -80 °C.

3.10.2 Dosagem de Proteínas Nucleares

A concentração das proteínas do extrato nuclear foi determinada pelo método de Bradford, com leitura das amostras no espectrofotômetro *GeneQuant* (AMSTERDAM BIOSCIENCE, HOLANDA) à 595 nm de comprimento de onda. Para isso, foi adicionado 1 mL do Bradford (BIO-RAD, EUA) diluído 5 x em cubetas. Foi adicionado 1 µL de cada amostra nas cubetas e foi efetuada a leitura. O branco da reação possuiu apenas o reagente Bradford (BIO-RAD, EUA). A curva padrão foi feita com 0,5, 1, 2, 4 e 8 µL de BSA na concentração de 1 mg/mL.

3.10.3 Western Blotting

Com o objetivo de avaliar a expressão de DNMT1, p53 e SP1 no extrato de proteínas nucleares das diferentes amostras, foi realizada a técnica de *Western Blotting*. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 8%. O gel de separação das proteínas continha solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (30%), tampão TRIS 1,5M pH 8,8, APS10% e TEMED. Sobre o gel de separação das proteínas foi acrescentado o *stacking gel* 4% que consistia de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (30%), tampão TRIS 0,5 M pH 6,8, APS 10% e TEMED. Um total de 40 µg de extrato proteico foi adicionado ao tampão de amostra 4X (SDS 20%, glicerol, TRIS 1,5 M, pH 6,8; azul de bromofenol 0,2% e DTT 1 M), de modo que a concentração final fosse 1X. Em seguida, as amostras foram aquecidas à 100°C por 5 minutos e centrifugadas brevemente à 13000 rpm. Por fim, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida à 60 V por aproximadamente 3 horas. O tampão utilizado na corrida eletroforética consistia em TRIS 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% (pH 8,3).

Ao fim da corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose com o auxílio do *Kit* de transferência iBlot Dry Blotting System (INVITROGEN, EUA), conforme protocolo sugerido pelo fabricante. A transferência das proteínas ocorreu à 20 V durante 7 minutos.

Posteriormente, a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi bloqueada em solução PBS 1x-leite 5% durante 1 hora seguido da incubação com os anticorpos específicos diluídos em solução PBS 1x-leite 2% durante 1 hora. O

anticorpo monoclonal contra p53 (DO-7, DAKO, Dinamarca) foi utilizado na diluição 1:8000, o anticorpo monoclonal anti-DNMT1 (ab92453, ABCAM, Reino Unido) foi utilizado na diluição 1:1000, o anticorpo policlonal anti-SP1 (ab13370, ABCAM, Reino Unido) foi utilizado na diluição 1:1000. O anticorpo utilizado como controle de carregamento foi o anti-lamina A/C (4777, CELL SIGNALING, USA), utilizado na diluição 1:1000. Após o período de incubação, a membrana foi submetida a 3 lavagens com duração de 10 minutos cada uma com tampão PBS 1x- Tween 0,1%. As membranas foram submetidas à incubação com anticorpo secundário diluído em solução PBS 1x-leite 2% por 1 hora. Os anticorpos utilizados foram anti-IgG de coelho (31460, THERMO SCIENTIFIC, EUA) na diluição 1:50000, capaz de interagir com o anticorpo primário anti-SP1, e anti-IgG de camundongo na diluição 1:50000 (NIF 825, GE HEALTHCARE, Reino Unido), capaz de interagir com os anticorpos primários anti-DNMT1, anti-p53 e anti-Lamina A/C. A membrana foi submetida a 3 lavagens de 10 minutos com PBS 1x- Tween 0,1% e a detecção das proteínas foi feita através do *Kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE HEALTHCARE, Reino Unido).

3.11 BUSCA POR SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE p53 E SP1 NA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES ALVO

A busca pelos possíveis sítios de ligação aos fatores de transcrição p53 e SP1 na região promotora dos genes que codificam as *DNMTs* foi feita através da análise da presença de sequências consenso a ambas as proteínas. A sequência consenso de ligação a p53 é: RRRC(A/T)(T/A)GYYY, onde R é uma purina e Y é uma pirimidina (IARC *TP53* DATABASE). A sequência consenso de ligação à SP1 é um GC Box – GGGGCGGGG – (ZHANG *et al*, 2013). As sequências de DNA contidas na região promotora das *DNMTs* foram obtidas a partir do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – www.ncbi.nlm.nih.gov). A presença de possíveis sítios de ligação de p53 e SP1 à região promotora das *DNMTs* foi feita através dos *softwares*: *MatInspector-Genomatix* (www.genomatix.de), *TFBind* (tfbind.hgc.jp) e *PROMO* (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). Os sítios descritos em mais de um dos *softwares* utilizados foram avaliados quanto à conservação dessas

sequencias em diferentes espécies. O alinhamento entre as espécies foi realizado através de ferramentas de ortologia do *Ensembl* (www.ensembl.org).

3.12 ANÁLISE DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA SEGUIDA DE SEQUENCIAMENTO (ChIP-SEQ)

A fim de se determinar a interação das proteínas SP1 e p53 na região promotora de genes de interesse, foi feita a análise de dados de sequenciamento realizado após imunoprecipitação das proteínas p53 e SP1 depositados no banco de dados SRA-NCBI. Para a avaliação das sequencias genômicas imunoprecipitadas com a proteína p53, foram consideradas as amostras depositadas sob registro no SRA: SRR1539836 e SRR333829 e são referentes à dados de sequenciamento de DNA após imunoprecipitação de p53 após indução de estresse genotóxico em linhagens celulares humanas. Foi utilizado como controle as amostras depositadas sob os registros: SRR1539838 e SRR333830, correspondente aos dados de sequenciamento de DNA que não passaram pela etapa de imunoprecipitação. Para a avaliação das sequencias genômicas imunoprecipitadas com a proteína SP1, foram considerados as amostras depositadas sob registro no GEO SRR578019 e SRR578020, sem a utilização de amostras controle. Os dados brutos baixados do banco SRA no formato sra foram convertidos para fastq através do SRA *toolkit*. As *reads* no formato fastq derivadas do sequenciamento de DNA foram avaliadas em relação à sua qualidade utilizando a ferramenta FASTQc e em seguida foram alinhadas ao genoma de referência (versão HG19) utilizando a ferramenta BWA (LI *et al*, 2012). Para a identificação dos picos resultantes da interação das proteínas com o DNA foi utilizado o *software* MACS2 utilizando como *cutoff* o valor de *qvalue* igual a 0,05 (ZHANG *et al*, 2008). Em seguida, avaliou-se a presença de picos que indicam possível interação das proteínas p53 e SP1 na região promotora dos seguintes genes: *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L* e *TDG*. Os picos foram visualizados utilizando-se a ferramenta IGV (ROBINSON *et al*, 2012).

3.13 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA (ChIP)

O ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (*ChIP assay*) foi realizado com o objetivo de avaliar a ligação da p53 e SP1 ao promotor das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*. Essa metodologia foi realizada utilizando o *kit SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP (Magnetic Beads)* (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA), seguindo as informações descritas pelo fabricante. Para o ensaio, foram utilizadas células TE-13 transfectadas com p53 e/ou SP1 e células TE-1 tratadas com 100nm de Mitramicina A e cultivadas à 32°C. Foram plaqueados $1,3 \times 10^6$ células TE-13 ou 2×10^6 células TE-1 em placas de Petri de 100 x 20mm/10ml e, após 24 horas e 12 horas após os tratamentos nas células TE-13 e TE-1, respectivamente, foi adicionado 1% de formaldeído por 10 minutos às células para preservar as interações entre as proteínas e o DNA. Em seguida, as células foram incubadas com 125 mM de glicina por 5 minutos a fim de parar a reticulação entre as proteínas e o DNA. Posteriormente, o meio das células foi retirado e estas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x gelado. Em seguida, as células em solução de PBS 1X contendo inibidores de proteases (Protease Inhibitor Cocktail 200x, CELL SIGNALING TECHNOLOGY, USA) foram coletadas com o auxílio de um *scraper* e submetidas à centrifugação à 1500 rpm durante 5 minutos à 4°C. O precipitado de células foi ressuspendido em 1 mL de *Buffer A* acrescido de DTT e inibidores de proteases. As amostras foram incubadas à 4°C por 10 minutos. Posteriormente, o precipitado foi submetido à centrifugação à 3000 rpm à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi ressuspendido em 1mL de *Buffer B* acrescido de DTT. O lisado foi submetido à nova centrifugação nas mesmas condições anteriores e o precipitado foi ressuspendido em 100µL de *Buffer B* acrescido de DTT. Foi adicionado à essa solução 0,5 µL de da nuclease *Micrococcal nuclease* (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA) e as amostras foram incubadas à 37°C por 20 minutos. A reação de digestão foi interrompida com a adição de 10 µL de EDTA 0.5M. As amostras foram submetidas à nova centrifugação à 13000 rpm durante 1 minuto à 4°C e o sobrenadante foi removido. O precipitado foi ressuspendido em 100 µL de *ChIP Buffer* acrescido de inibidores de proteases e incubadas à 4°C durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à sonicação utilizando o aparelho Vibra cell 75041 e nas seguintes condições: 12 X (5' on: 5s off), amplitude 21%. Após a sonicação das células, seguiu-se a etapa de imunoprecipitação de proteínas utilizando 2,5 µL de anticorpo anti-p53 1C12 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA), 5 µL de anticorpo anti-SP1 D4C3 (CELL

SIGNALING TECHNOLOGY, EUA), 10 µL d anticorpo anti-H3 D2B12 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA) e 2 µL de anticorpo anti-IgG #2729 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA). A etapa de imunoprecipitação foi realizada durante 12 horas sob agitação à 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas com 30 µL de bilhas magnéticas *ChIP-Grade Protein G magnetic beads* (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a imunoprecipitação, o cross-link DNA-p53 e DNA-SP1 foi revertido pela adição de 6 µL de NaCl 5 M e 2 µL de Proteinase K (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, EUA) à 65°C por 2 horas. O DNA foi recuperado de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA purificado foi submetido à reação em cadeia da polimerase quantitativa, conforme descrito no item 3.2.4. As sequencias dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do promotor das *DNMTs* estão descritas na tabela 3.3. A imunoprecipitação por IgG foi utilizada como controle negativo IgG e a imunoprecipitação com H3 foi utilizada como controle positivo. A quantidade de DNA ligado à p53, SP1, H3 e IgG foi calculada em relação ao *input* de DNA (2%), seguindo a recomendação do fabricante.

Tabela 3.3: **Oligonucleotídeos iniciadores utilizados no ensaio de imunoprecipitação da cromatina.**

Gene	Iniciadores
DNMT1 (A)	S: 5' CCCACCTCCCAGCAAAC 3' AS: 5' TCTACCACCCAGTCCG 3'
DNMT1 (B)	S: 5' GGACTGGGGTGGTAGACG 3' AS: 5' CGGGCAGCGAGATGGC 3'

3.14 ENSAIO DUPLO DA LUCIFERASE

Foi realizado o ensaio duplo da luciferase a fim de avaliar se o promotor da *DNMT1* poderia ser ativado nas diferentes condições experimentais. Para isso foi utilizado o sistema repórter pGL4-DNMT1 e a atividade produzida por este plasmídeo foi medida por um sistema duplo utilizando a luciferase como repórter (*Dual Luciferase Reporter Assay System kit*, PROMEGA, USA). Para realização desse experimento foram utilizados 0,25 µg dos vetores pGL4-Promoter Vector e pGL4-DNMT1, contendo a região promotora completa da *DNMT1* (nucleotídeos -254 a +317) e que nos foi gentilmente cedido pelo Dr. Yi-Ching Wang (*National Cheng Kung University*,

Taiwan). Os níveis de atividade *firefly* luciferase produzidos pelos sistemas-repórteres foram normalizados pelos níveis do vetor controle pRL-TK, que codifica a atividade de *renilla* luciferase. Os vetores repórteres foram transfectados nas células utilizando a *Lipofectamine 2000* (INVITROGEN, EUA) como agente transfectante. Os níveis de atividade *firefly* luciferase e *renilla* luciferase foram medidos 48 horas após a transfecção utilizando o luminômetro *Veritas™ Microplate Luminometer* (PROMEGA, EUA). Os experimentos seguiram o protocolo sugerido pelo fabricante (PROMEGA, EUA). O sistema repórter foi construído a partir do arcabouço pGL4 (PROMEGA, EUA) e contém o promotor completo da *DNMT1* e compreende os nucleotídeos -254 a +317, sendo considerado o início da transcrição o nucleotídeo 0. Essa sequência possui 2 elementos responsivos à p53 (-149 e -140) e 4 elementos responsivos à SP1 (-178, -76, -26 e +60) (LIN *et al*, 2010).

3.15 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA

3.15.1 Extração de DNA

Após o tratamento das linhagens celulares, estas foram coletadas e foi adicionado ao precipitado de células 500 µL de solução de digestão (NaCl 100 mM; Tris-HCl 10 mM; EDTA 25 mM e SDS 0,5% - pH 8,0) e 10 µL de proteinase K 25 mg/mL (INVITROGEN, EUA). As proteínas celulares foram digeridas após incubação das amostras à 65°C por 1 hora. A reação de digestão foi inibida após a adição de 300 µL de NaCl 6M. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação à 12000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. Para precipitação do DNA, foi adicionado 500 µL de isopropanol e as amostras foram incubadas à -20°C por 30 minutos. Após centrifugação à 12000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado ao imunoprecipitado 500 µL de etanol 70%. Posteriormente foi feita uma nova centrifugação à 12000 rpm por 2 minutos e o DNA precipitado foi ressuspenso em 10 µL de água livre de DNase. Em seguida, o DNA foi quantificado de acordo com a descrição presente no item 3.3.2.

3.15.2 Tratamento com Bissulfito de Sódio

A fim de modificar o DNA genômico e substituir as citosinas não metiladas em uracila, o DNA genômico foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio, utilizando o *EZ DNA Methylation Kit* (ZYMO RESEARCH, EUA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para realização desse experimento, 500 ng do DNA das linhagens TE-1, cultivadas à 32°C e 37°C, e TE-13 após o tratamento com 50 nM de Mitramicina A foi submetido à modificação com bissulfito de sódio. O DNA modificado foi eluído em 20 µL do tampão de eluição presente no *kit*, de maneira que sua concentração final fosse de 25 ng/µL.

3.15.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA anteriormente modificado foi submetido à reação em cadeia da polimerase a fim de permitir a avaliação do perfil de metilação na sequência transponível LINE-1. Inicialmente, 25 ng de DNA genômico modificado com bissulfito de sódio foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização de iniciadores específicos para a amplificação de ilhas CpG presentes em LINE-1 (S: 5' TTGTTGCCCGCCTCTACTAC 3'; AS: 5' ACCTCCCTAACCCCTTAC 3'). Para que fosse possível o sequenciamento genômico em uma das fitas, um dos iniciadores utilizados estava marcado com biotina. A amplificação genômica foi feita com 1U da enzima Taq Platinum (QIAGEN, ALEMANHA) acrescido de tampão 1X, MgCl₂ 1mM, 0,2 mM dNTP Mix e 0,2 mM de cada iniciador. A amplificação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação (15 minutos à 95°C), seguida de 50 ciclos de desnaturação (40 segundos à 95°C), anelamento (40 segundos à 56°C) e extensão (40 segundos à 72°C), finalizada por uma extensão a 72°C por 10 minutos. A especificidade dos produtos amplificados, assim como o controle negativo de cada reação, foram avaliados em gel de agarose 2%.

3.15.4 Pirosequenciamento

Os produtos de PCR foram coletados utilizando “beads” revestidas com estreptavidina. A fita biotinilada foi então sequenciada na plataforma *PyroMark Q96* (QIAGEN, ALEMANHA). Esta técnica baseia-se no sequenciamento por síntese, com adição e incorporação sequencial de nucleotídeos. O método de

pirossequenciamento trata cada sítio CpG como um polimorfismo C/T e gera um dado quantitativo da proporção relativa do alelo metilado versus o alelo não metilado. Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse foram avaliados convertendo os pirogramas em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos. Para avaliação do perfil de metilação em LINE-1 foi utilizado o oligonucleotídeo de sequenciamento: 5'CAAATAAAACAATACCTC3'.

3.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0* (*GraphPad Software Incorporated*, EUA) e os valores foram considerados significativos quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05. Para avaliar se os dados obedeciam a uma distribuição normal, utilizou-se o teste *Kolmogorov-Smirnov*. Em seguida, para a análise de diferença de expressão entre os diferentes grupos com dados paramétricos foi aplicado o teste t não pareado ou pareado, de acordo com o grupo amostral. Dados não-paramétricos foram testados com a utilização do teste de *Mann-Whitney*. A correlação entre as expressões dos diferentes genes foi realizada utilizando o teste de correlação de *Pearson* quando os dados possuíam distribuição paramétrica ou correlação de *Spearman* para dados considerados não-paramétricos. A análise de correlação da sobrevida dos pacientes com os valores de expressão dos genes selecionados foi realizada utilizando a curva de *Kaplan-Meier*.

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* E *SP1* EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO (CEE), DE ACORDO COM O STATUS MUTACIONAL DE *TP53* – ANÁLISE *IN VIVO*

A fim de avaliar a expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* em CEE, foi utilizado dois sets de amostras, sendo o primeiro (set investigativo) composto por amostras tumorais de pacientes atendidos e tratados no INCA, enquanto que o segundo (set confirmatório) foi composto por amostras de pacientes cujos dados foram depositados no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Para compor o set investigativo, foram avaliados inicialmente 35 casos de pacientes com diagnóstico confirmado de CEE e matriculados no INCA entre os anos 2013 e 2015. Para análise das características clínico-patológicas, foram determinados a idade mediana dos pacientes, gênero, tabagismo, etilismo, estadiamento do tumor e grau de diferenciação do tumor. As características dos pacientes estão descritas na Tabela 4.1. A idade mediana dos pacientes foi 58,5 anos, com variação entre 39 e 78 anos. Do total de pacientes incluídos no estudo, 74,3% dos pacientes eram do gênero masculino e 25,7% eram do gênero feminino. Quanto à exposição aos fatores de risco, 57,1% dos pacientes eram tabagistas ativos e 25,7% eram ex-tabagistas. Em 17,2% dos prontuários não havia informação quanto ao hábito de fumar. O consumo de bebidas alcoólicas foi declarado por 45,7% dos pacientes e 20% dos pacientes se declararam ex-etilistas. Entretanto, não havia informação quanto ao consumo de bebidas alcoólicas em 20% dos prontuários.

A frequência de casos conforme o estadiamento do tumor também foi calculada, bem como o grau de diferenciação. Dos tumores avaliados, 14,3% foram classificados como pertencentes ao grupo de estadiamento inicial (estádio I e II) e 62,9% dos tumores estavam em estádios mais avançados (estádios III e IV). No total, 82,9% dos tumores eram moderadamente diferenciados, enquanto que, 17,1% dos tumores eram pouco diferenciados. O tempo médio de sobrevivência foi de 9,7 meses e em 71,7% dos casos avaliados, o desfecho foi o óbito.

Tabela 4.1: Características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Dados Clínico-Patológicos	Número de Indivíduos (%)
Idade	
Mediana (anos)	58,5 (39-78)
< 60 anos	20 (57,1%)
≥ 60 anos	15 (42,9%)
Total	35
Gênero	
Masculino	26 (74,3%)
Feminino	9 (25,7%)
Total	35
Tabagismo	
Não tabagista	0 (0%)
Tabagista ativo	20 (57,1%)
Ex-tabagista	9 (25,7%)
Sem informação	6 (17,2%)
Total	35
Etilismo	
Não etilista	5 (14,3%)
Etilista ativo	16 (45,7%)
Ex-etilista	7 (20,0%)
Sem informação	7 (20,0%)
Total	35
Estadiamento	
I + II	5 (14,3%)
III + IV	22 (62,9%)
Sem informação	8 (22,8%)
Total	35
Grau de Diferenciação	
G1	0 (0%)
G2	29 (82,9%)
G3	6 (17,1%)
Total	35
Óbito	
Sim	25 (71,4%)
Não	10 (28,6%)
Total	35

A análise de expressão de RNAm de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* foi realizada nas 35 amostras frescas de CEE, por RT-PCRq. A análise de expressão gênica foi realizada em amostras pertencentes ao banco de amostras de CEE mantido em nosso laboratório. A presença de mutações no gene *TP53* já havia sido previamente avaliada (SANTOS, 2016), conforme descrito no item 3.3. Nessa casuística, 68,6% das amostras possuíam mutações no gene *TP53*. O perfil de mutações encontradas está descrito no anexo 2. Inicialmente, as amostras foram agrupadas de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou quando não houve reprodutibilidade na reação de RT-PCRq. A análise mostrou o aumento de expressão gênica de *DNMT1* em amostras que possuíam o gene *TP53* mutado, quando comparado às amostras com o gene *TP53* selvagem ($p= 0,02$) (Figura 4.1 - A). No entanto, para a análise de expressão de RNAm de *DNMT3A* ($p=0,12$) e *DNMT3B* ($p=0,78$), de acordo com o *status* mutacional de *TP53*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 4.1 – B e C).

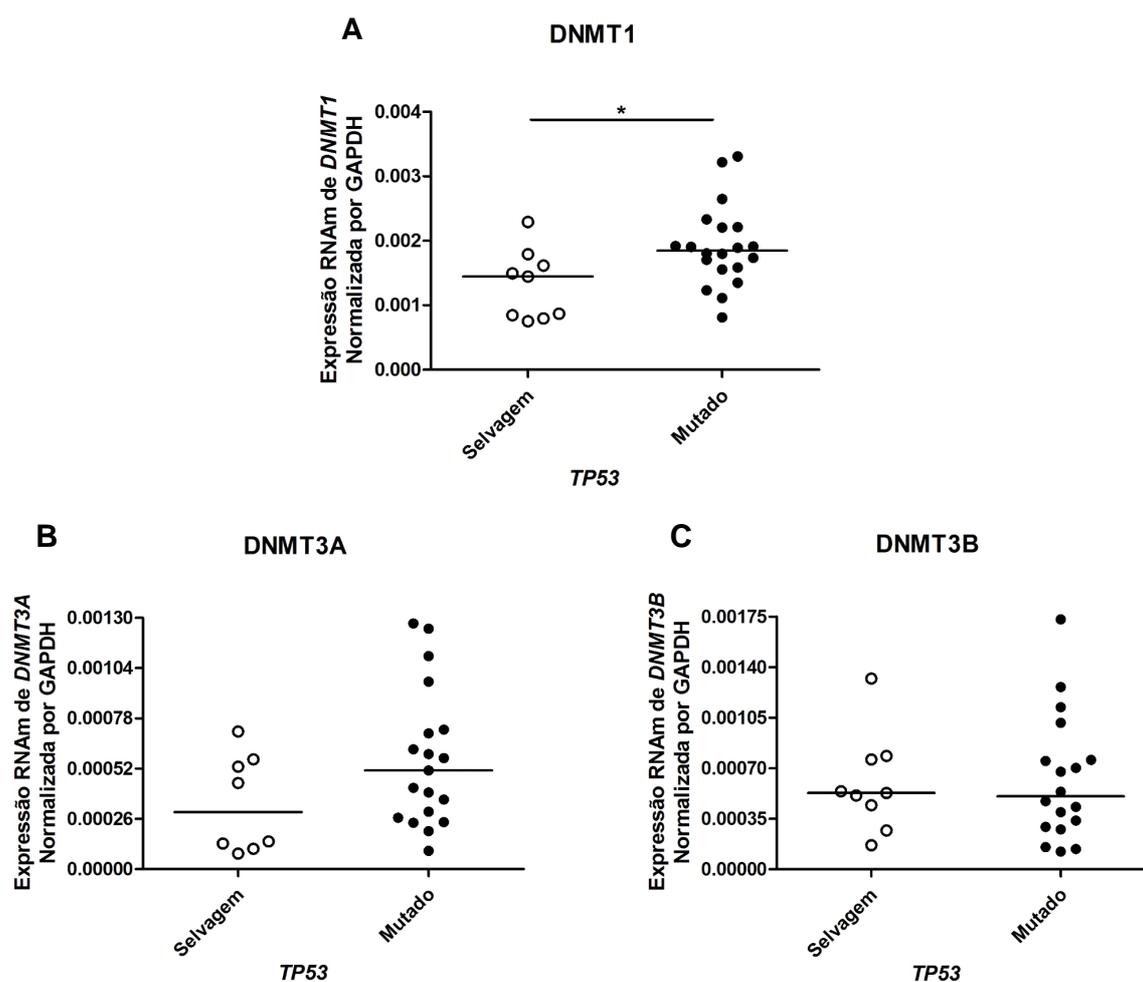


Figura 4.1: Perfil de expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) provenientes de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com a presença de mutações em *TP53*. Representação gráfica da expressão de RNAm *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B) e *DNMT3B* (C) normalizada por *GAPDH* ($2^{-\Delta CT}$), utilizado como *housekeeping gene*, em 28 amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA e agrupadas de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. Foram incluídas 9 amostras que possuíam *TP53* selvagem e 19 amostras que possuíam *TP53* mutante. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou quando não houve reprodutibilidade na reação de RT-PCRq. Teste *Mann Whitney* * $p < 0,05$.

Em seguida foi avaliado se haveria algum nível de correlação entre os níveis de expressão das diferentes *DNMTs* avaliadas. Não foi observada nenhuma correlação significativa entre as expressões de RNAm de *DNMT1* e *DNMT3A* ($p=0,34$ e $r=-0,17$) e *DNMT3B* ($p=0,25$ e $r=-0,21$). No entanto, conforme demonstrado na figura 4.2, foi detectada uma forte correlação entre as expressões das *DNMT3A* e *DNMT3B* ($p < 0,0001$ e $r = 0,80$).

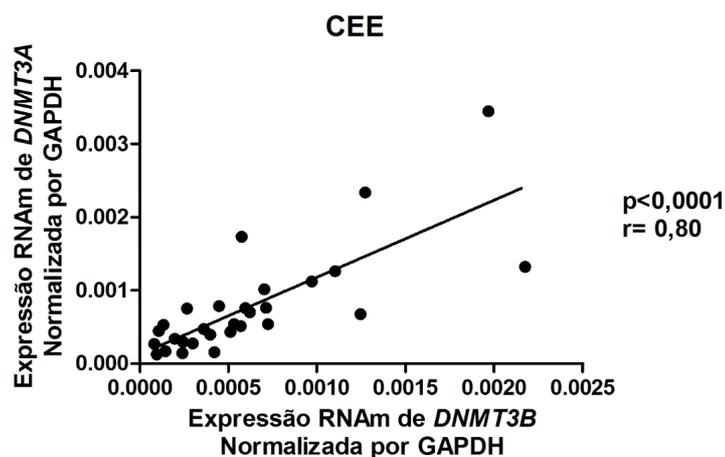


Figura 4.2: **Correlação entre as expressões gênicas de *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) proveniente de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.** Representação gráfica da correlação entre a expressão gênica de *DNMT3A* E *DNMT3B* normalizada por *GAPDH* ($2^{-\Delta-CT}$), utilizado como *housekeeping gene*, em 30 amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou quando não houve reprodutibilidade na reação de RT-PCRq. Teste *Spearman r* $p < 0,0001$; $r = 0,80$.

Também foi realizada a análise de expressão de RNAm de *SP1* nas amostras de CEE e os casos foram agrupados de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. Foi observada maior expressão gênica de *SP1* em amostras com o gene *TP53* mutado ($p = 0,03$) (Figura 4.3 - A). Uma vez que já havia sido determinada a maior expressão de *DNMT1* em amostras com mutações em *TP53*, foi feito o teste *Spearman r* para determinar se havia correlação entre a expressão de *DNMT1* e *SP1* nessa casuística. Como demonstrado na figura 4.3 (B), foi observada a correlação positiva ($r = 0,41$ e $p = 0,04$) entre as expressões gênicas de *DNMT1* e *SP1* em amostras que possuíam mutações em *TP53*. Quando a análise foi feita considerando apenas as amostras com *TP53* selvagem, não foi observada a correlação entre as expressões de *DNMT1* e *SP1* ($p = 0,56$).

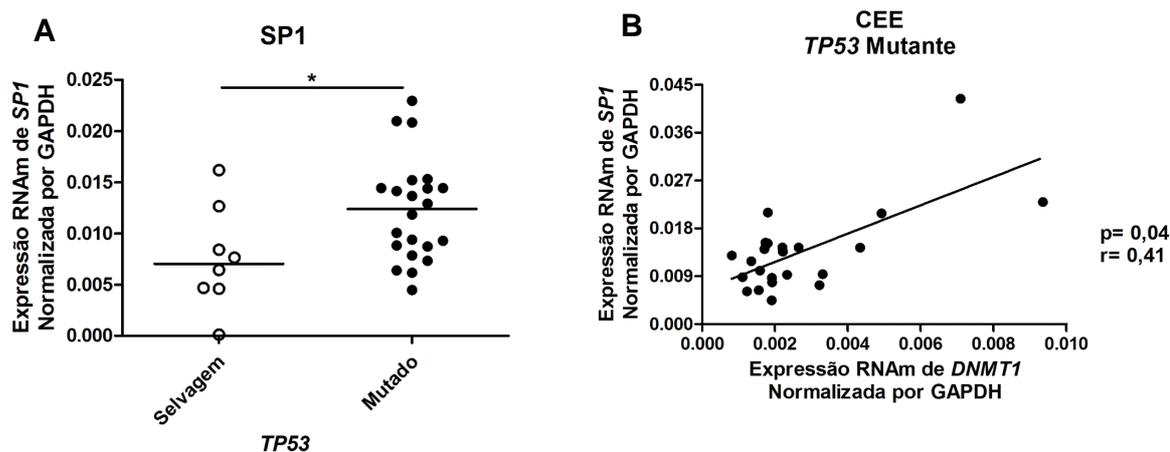


Figura 4.3: Perfil de expressão gênica de *SP1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) proveniente de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com a presença de mutações em *TP53*. (A) Representação gráfica da expressão de RNAm de *SP1* normalizada por *GAPDH* ($2^{-\Delta-CT}$), utilizado como *housekeeping gene*, em 28 amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA e agrupadas de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. Foram incluídas 8 amostras que possuíam *TP53* selvagem e 22 amostras que possuíam *TP53* mutante. Teste *t Student* * $p < 0,05$. (B) Representação gráfica da correlação entre a expressão gênica de *SP1* e *DNMT1* normalizada por *GAPDH* ($2^{-\Delta-CT}$), utilizado como *housekeeping gene*, em 22 amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA com mutação em *TP53*. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou quando não houve reprodutibilidade na reação de RT-PCRq. Teste *Spearman* $r = 0,41$; $p = 0,04$.

Uma vez que foram determinados os níveis de expressão das *DNMTs* e de *SP1* em amostras de CEE, foi avaliado, em seguida, se havia alguma associação entre as expressões dos diferentes genes investigados e as características clínico patológicas dos pacientes. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre a expressão de *DNMT1* e os dados clínico-patológicos avaliados (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Associação entre a expressão gênica de *DNMT1* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Característica	Mediana DNMT1 (min-max)	p
Gênero		
Masculino	$0,18 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,94 \times 10^{-2}$)	0,61
Feminino	$0,18 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,43 \times 10^{-2}$)	
Tabagismo		
Tabagista Ativo	$0,18 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,36 \times 10^{-2}$)	0,78
Ex-tabagista	$0,12 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,46 \times 10^{-2}$)	
Etilismo		
Etilista ativo	$0,19 \times 10^{-2}$ ($0,12 \times 10^{-2}$ - $0,32 \times 10^{-2}$)	0,89
Não e ex- etilista	$0,16 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,46 \times 10^{-2}$)	
Estadiamento		
I + II	$0,13 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,36 \times 10^{-2}$)	0,24
III + IV	$0,19 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,49 \times 10^{-2}$)	
Grau Histológico		
G1 + G2	$0,19 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,94 \times 10^{-2}$)	0,58
G3	$0,17 \times 10^{-2}$ ($0,12 \times 10^{-2}$ - $0,33 \times 10^{-2}$)	
Óbito		
Sim	$0,19 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,94 \times 10^{-2}$)	0,37
Não	$0,16 \times 10^{-2}$ ($0,08 \times 10^{-2}$ - $0,49 \times 10^{-2}$)	

Nas análises de associação entre as expressões de RNAm de *DNMT3A* e *DNMT3B* e as características clínico-patológicas dos pacientes, verificamos a associação entre as expressões das *DNMT3A* (Tabela 4.3) e *DNMT3B* (Tabela 4.4) com o estadiamento do tumor. Os tumores em estádios iniciais (estádio I e II) apresentaram maior expressão das *DNMT3* em comparação com os tumores em estádios avançados ($p=0,03$). No entanto, vale ressaltar que, o número de tumores em estádios iniciais nessa casuística era muito pequeno ($n=4$).

Tabela 4.3: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3A* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Característica	Mediana DNMT3A (min-max)	P
Gênero		
Masculino	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,42 \times 10^{-2}$)	0,85
Feminino	$0,04 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,07 \times 10^{-2}$)	
Tabagismo		
Tabagista Ativo	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,20 \times 10^{-2}$)	0,26
Ex-tabagista	$0,06 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,22 \times 10^{-2}$)	
Etilismo		
Etilista ativo	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,13 \times 10^{-2}$)	0,60
Não e ex-etilista	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,22 \times 10^{-2}$)	
Estadiamento		
I + II	$0,11 \times 10^{-2}$ ($0,05 \times 10^{-2}$ - $0,42 \times 10^{-2}$)	0,03
III + IV	$0,04 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,22 \times 10^{-2}$)	
Grau Histológico		
G1 + G2	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,20 \times 10^{-2}$)	0,81
G3	$0,04 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,13 \times 10^{-2}$)	
Óbito		
Sim	$0,04 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,22 \times 10^{-2}$)	0,23
Não	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,20 \times 10^{-2}$)	

Tabela 4.4: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3B* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.

Característica	Mediana DNMT3B (min-max)	P
Gênero		
Masculino	$0,07 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,90 \times 10^{-2}$)	0,25
Feminino	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,08 \times 10^{-2}$)	
Tabagismo		
Tabagista Ativo	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,34 \times 10^{-2}$)	0,83
Ex-tabagista	$0,06 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,23 \times 10^{-2}$)	
Etilismo		
Etilista ativo	$0,08 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,23 \times 10^{-2}$)	0,78
Não e ex- etilista	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,34 \times 10^{-2}$)	
Estadiamento		
I + II	$0,17 \times 10^{-2}$ ($0,05 \times 10^{-2}$ - $0,90 \times 10^{-2}$)	0,03
III + IV	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,17 \times 10^{-2}$)	
Grau Histológico		
G1 + G2	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,13 \times 10^{-2}$)	0,86
G3	$0,04 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,23 \times 10^{-2}$)	
Óbito		
Sim	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,01 \times 10^{-2}$ - $0,17 \times 10^{-2}$)	0,91
Não	$0,05 \times 10^{-2}$ ($0,02 \times 10^{-2}$ - $0,34 \times 10^{-2}$)	

Por fim, avaliamos se haveria alguma associação entre a expressão gênica de *SP1* e os dados clínico-patológicos dos pacientes (Tabela 4.5). Como demonstrado na figura 4.4, foi observado a maior expressão de *SP1* em tumores de pacientes tabagistas ($p= 0,02$).

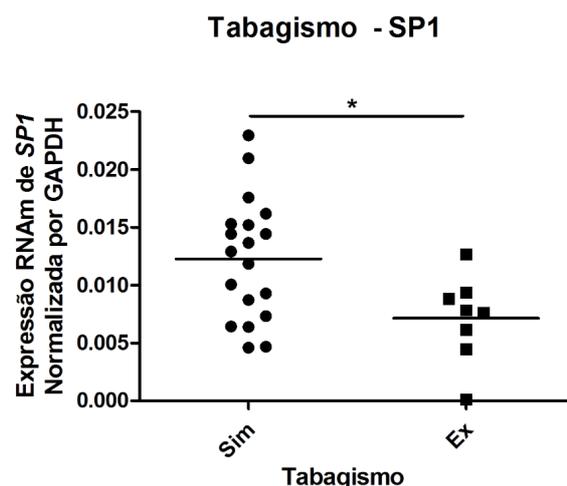


Figura 4.4: **Expressão gênica de *SP1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) proveniente de pacientes matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com o hábito de fumar dos pacientes.** Representação gráfica da expressão de RNAm de *SP1* normalizada por *GAPDH* ($2^{\Delta-CT}$), utilizado como *housekeeping gene*, em 27 amostras de CEE e agrupadas de acordo com o hábito de fumar dos pacientes matriculados no INCA. Foram incluídas 19 amostras de pacientes que se declararam tabagistas e 7 amostras de pacientes que se declararam ex-tabagistas. Nessa casuística, nenhum paciente foi classificado como não-tabagista. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou quando não houve reprodutibilidade na reação de RT-PCRq ou sem a informação sobre o hábito de fumar do paciente. Teste *t Student* * $p < 0,05$.

Tabela 4.5: **Associação entre a expressão gênica de *SP1* e as características clínico-patológicas dos 35 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo.**

Característica	Mediana SP1 (min-max)	P
Gênero		
Masculino	0,01 ($0,01 \times 10^{-2}$ - 0,05)	0,52
Feminino	0,01 ($0,45 \times 10^{-2}$ - 0,02)	
Tabagismo		
Tabagista Ativo	0,01 ($0,46 \times 10^{-2}$ - 0,02)	0,02
Ex-tabagista	0,01 ($0,01 \times 10^{-2}$ - 0,01)	
Etilismo		
Etilista ativo	0,01 ($0,45 \times 10^{-2}$ - 0,02)	0,79
Não e ex-etilista	0,01 ($0,46 \times 10^{-2}$ - 0,02)	
Estadiamento		
I + II	0,01 ($0,62 \times 10^{-2}$ - 0,05)	0,89
III + IV	0,01 ($0,45 \times 10^{-2}$ - 0,02)	
Grau Histológico		
G1 + G2	0,01 ($0,01 \times 10^{-2}$ - 0,02)	0,53
G3	0,01 ($0,62 \times 10^{-2}$ - 0,02)	
Óbito		
Sim	0,01 ($0,45 \times 10^{-2}$ - 0,05)	0,99
Não	0,01 ($0,01 \times 10^{-2}$ - 0,02)	

Além disso, não foi observado impacto dos níveis de expressão de nenhuma das *DNMTs* avaliadas, nem de *SP1* sobre a sobrevivência dos pacientes investigados (Figura 4.5).

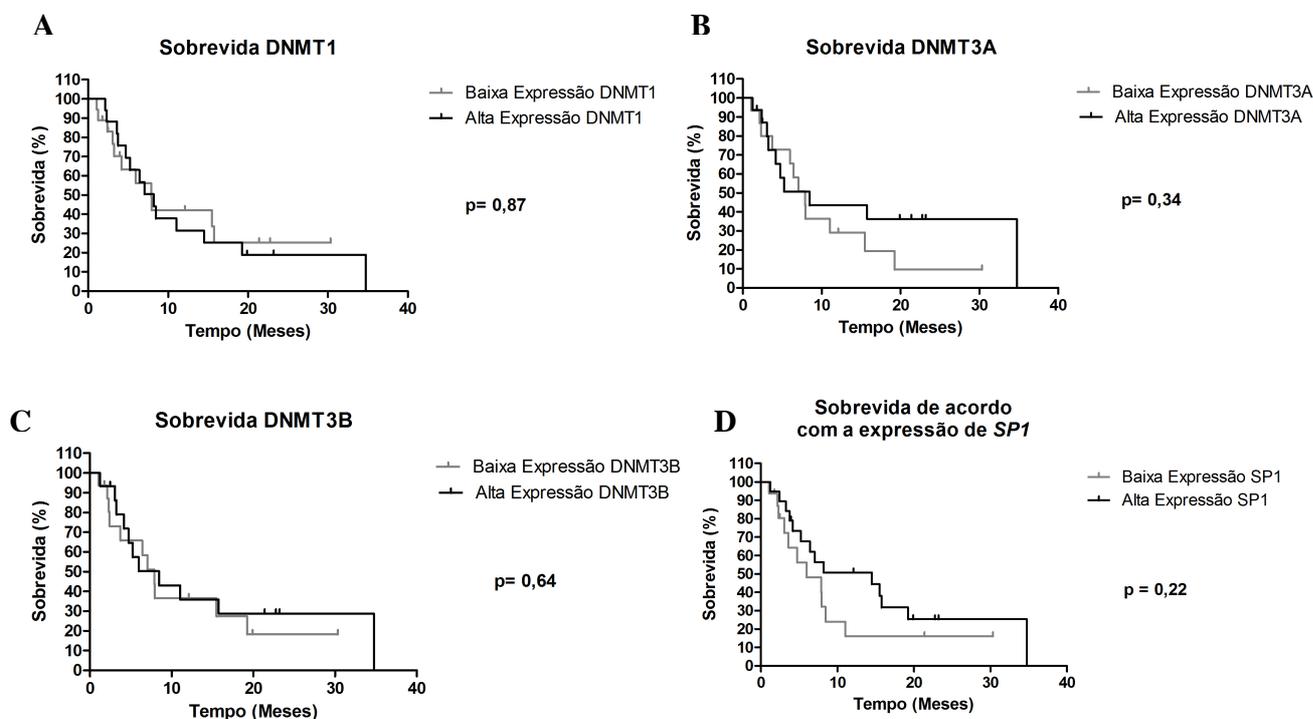


Figura 4.5: **Sobrevida global dos pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) matriculados no INCA e compreendidos nesse estudo, de acordo com a expressão de RNAm de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1*.** Representação gráfica, com curva de Kaplan-Meier, da sobrevivência global de 28 pacientes matriculados no INCA por um período de 35 meses. Os pacientes foram agrupados de acordo com a mediana das expressões gênicas de *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B), *DNMT3B* (C) e *SP1* (D). Os tumores que expressavam níveis de RNAm acima da mediana de expressão inseridos no grupo de “Alta Expressão” e os que expressavam níveis de RNAm abaixo da mediana de expressão inseridos no grupo “Baixa Expressão”. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou quando não houve reprodutibilidade na reação de RT-PCRq. Teste *Log-rank*.

Conforme mencionado previamente, a fim de avaliar se o perfil de RNAm das *DNMTs* e *SP1* observado em tumores de pacientes matriculados no INCA era validado em um número amostral maior e em uma população diferente, foram realizadas as mesmas análises em um *set* de validação, composto por amostras cujos dados estão depositados no TCGA. Foi avaliada a expressão de RNAm em 95 amostras de CEE de pacientes oriundos de diferentes países (Brasil, Canadá, Rússia, Ucrânia, Estados Unidos e Vietnã). Para análise das características clínico-patológicas foram

considerados: a idade mediana dos pacientes, gênero, tabagismo, etilismo, estadiamento do tumor e grau de diferenciação do tumor. As características dos pacientes estão descritas na Tabela 4.6.

Do total de pacientes incluídos nessa casuística, a idade mediana de idade foi de 57 anos, com variação entre 36 e 90 anos, dos quais 85,3% dos pacientes eram do gênero masculino e 14,7% eram do gênero feminino, semelhante ao perfil dos pacientes matriculados no INCA. Quanto à exposição aos fatores de risco, 33,7% dos pacientes não eram tabagistas, enquanto que, 30,5% eram tabagistas ativos e 31,6% eram ex-tabagistas. Essa característica em muito diferiu dos pacientes matriculados no INCA, uma vez que, naquele grupo amostral, nenhum deles se declarou não-tabagista. O consumo de bebidas alcoólicas foi declarado por 72,6% dos pacientes e 25,3% dos pacientes se declararam não-etilistas. Considerando as características do tumor, 62,1% foram classificados como pertencentes ao grupo de estadiamento inicial (estádio I e II) e 35,8% dos tumores estavam em estádios mais avançados (estádios III e IV). Portanto, nesse grupo amostral, a maior parte dos tumores foram diagnosticados em estágio inicial, diferente do perfil de amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA. Quanto ao perfil de diferenciação do tumor, 16,8% eram bem diferenciados, 50,5% eram moderadamente diferenciados, enquanto que, 22,1% dos tumores eram pouco diferenciados. Do total de pacientes, 33,7% foram a óbito e o tempo médio de sobrevida foi de 15,1 meses.

Tabela 4.6: Características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Dados Clínico-Patológicos	Número de Indivíduos (%)
Idade	
Mediana (anos)	57 (36-90)
< 60 anos	57 (60,0%)
≥ 60 anos	38 (40,0%)
Total	95
Gênero	
Masculino	81 (85,3%)
Feminino	14 (14,7%)
Total	95
Tabagismo	
Não tabagista	32 (33,7%)
Tabagista ativo	29 (30,5%)
Ex-tabagista	30 (31,6%)
Sem informação	4 (4,2%)
Total	95
Etilismo	
Não etilista	24 (25,3%)
Etilista ativo	69 (72,6%)
Ex-etilista	0 (0%)
Sem informação	2 (2,1%)
Total	95
Estadiamento	
I + II	59 (62,1%)
III + IV	34 (35,8%)
Sem informação	(2,1%)
Total	95
Grau de Diferenciação	
G1	16 (16,8%)
G2	48 (50,5%)
G3	21 (22,1%)
Sem informação	10 (10,5%)
Total	95
Óbito	
Sim	32 (33,7%)
Não	63 (66,3%)
Total	95

A avaliação do perfil de expressão gênica das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* e *SP1* foi realizada agrupando as amostras de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. Os dados de expressão gênica e mutação no gene *TP53* dessas amostras depositados no TCGA foram gerados pela técnica de RNA-seq. O perfil de expressão dos diferentes genes a partir de dados gerados por RNA-seq e foram normalizados com a utilização do *software* RSEM-1. Além disso, das 95 amostras de CEE analisadas, todas possuíam a análise de *status* mutacional de *TP53*. Do total de amostras, 90,5% possuíam mutações no gene *TP53*. A lista com os tipos de mutações encontradas está descrita no anexo 3. Semelhante ao observado na avaliação do perfil de expressão das *DNMTs* e de *SP1* em amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA, foi observada a maior expressão de *DNMT1* em amostras com *TP53* mutado ($p=0,02$). Além disso, não foi observada diferença no perfil de expressão das *DNMT3A* e *DNMT3B* quando as amostras foram categorizadas de acordo com o *status* mutacional de *TP53* (Figura 4.6).

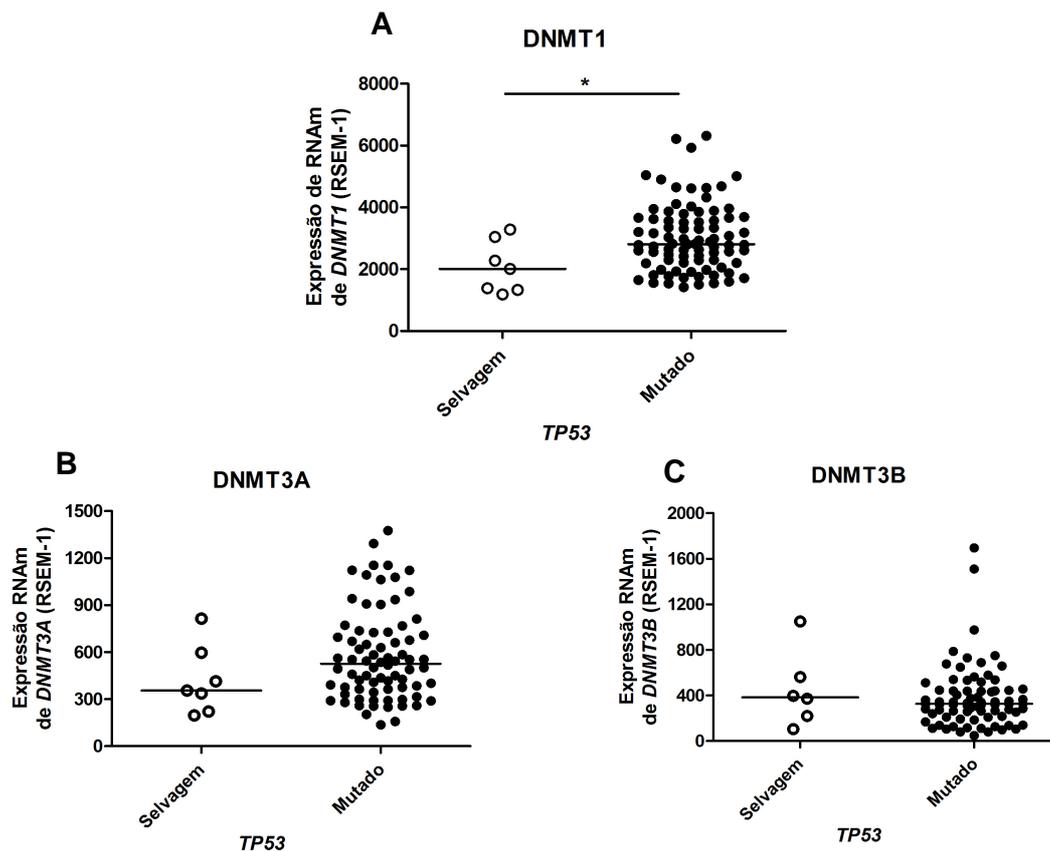


Figura 4.6: Perfil de expressão gênica de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), a partir de análise de dados depositados no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), de acordo com a presença de mutações em *TP53*. Representação gráfica da expressão de RNAm de *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B) e *DNMT3B* (C) (RSEM-1) em 94 amostras de CEE agrupadas de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do software RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Foram incluídas 7 amostras que possuíam *TP53* selvagem e 87 amostras que possuíam *TP53* mutante. Foram excluídas amostras consideradas *outliers*. Teste *Mann Whitney* * $p < 0,05$.

Também foi realizada a análise de expressão de RNAm de *SP1* nessas mesmas amostras de CEE, de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. Foi observada maior expressão gênica de *SP1* em amostras com o gene *TP53* mutado ($p = 0,03$) (Figura 4.7-A). Além disso, foi demonstrada a correlação estatisticamente significativa entre as expressões gênicas de *DNMT1* e *SP1* ($r = 0,22$ e $p = 0,04$) em amostras que possuíam mutações em *TP53* (Figura 4.7 - B). Quando a análise foi feita considerando apenas as amostras com *TP53* selvagem, não foi observada a correlação entre as expressões de *DNMT1* e *SP1* ($p = 0,46$). Esses resultados vão de encontro aos observados com as análises realizadas nas amostras de CEE provenientes de pacientes matriculados no INCA.

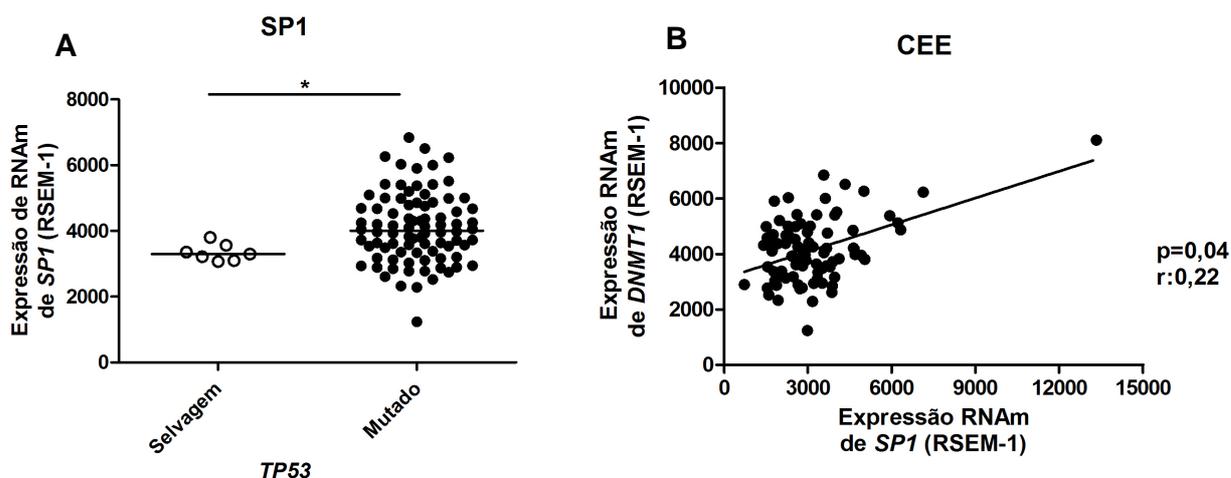


Figura 4.7: Perfil de expressão gênica de *SP1* em em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), a partir de análise de dados depositados no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), de acordo com a presença de mutações em *TP53*. (A) Representação gráfica da expressão de RNAm de *SP1* (RSEM-1) em 94 amostras de CEE agrupadas de acordo com a presença ou não de mutações no gene *TP53*. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do *software* RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Foram incluídos 7 amostras que possuíam *TP53* selvagem e 87 amostras que possuíam *TP53* mutante. Foram excluídas amostras consideradas *outliers*. Teste *Mann Whitney* $*p < 0,05$. (B) Representação gráfica da correlação entre a expressão gênica de RNAm de *SP1* (RSEM-1) e *DNMT1* (RSEM-1) em amostras de CEE com mutação em *TP53*. Foram incluídas 95 amostras. Teste *Spearman* r $p = 0,04$; $r = 0,22$.

Uma vez que foram determinados os níveis de expressão das *DNMTs* e de *SP1* nas amostras de CEE provenientes do TCGA, foi avaliado, em seguida, se havia alguma associação entre as expressões dos diferentes genes investigados e as características clínico-patológicas dos pacientes. Foram excluídas das análises amostras consideradas *outliers* ou quando a informação sobre a característica clínico-patológica não estava disponível. A análise revelou associação entre a maior expressão gênica de *DNMT1* em tumores de pacientes tabagistas ($p = 0,04$) (Figura 4.8). No entanto, não houve diferença entre a expressão da *DNMT1* e os outros dados clínico-patológicos avaliados (Tabela 4.7).

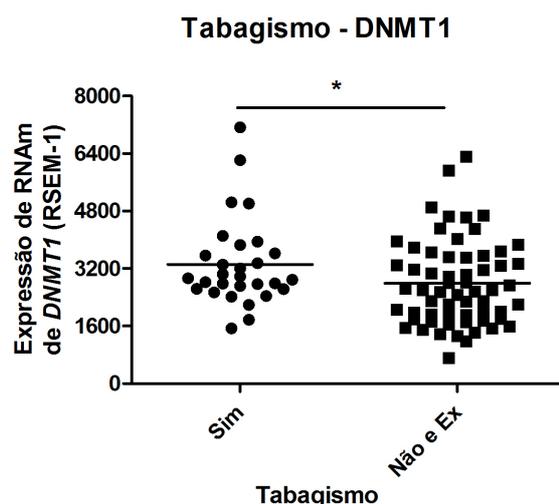


Figura 4.8: Perfil de expressão gênica de *DNMT1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), de acordo com o hábito de fumar dos pacientes. Representação gráfica da expressão de RNAm de *DNMT1* (RSEM-1) em 90 amostras de CEE e agrupadas de acordo com o hábito de fumar dos pacientes. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do *software* RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Foram incluídas 29 amostras de pacientes que se declararam tabagistas e 61 amostras de pacientes que se declararam ex-tabagistas e não tabagistas. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou sem informação sobre o hábito de fumar do paciente. Teste *Mann Whitney* * $p < 0,05$.

Tabela 4.7: Associação entre a expressão gênica de *DNMT1* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Característica	Mediana DNMT1 (min-max)	<i>p</i>
Gênero		
Masculino	2798 (717,2 - 7131)	0,27
Feminino	2722 (1383 - 3965)	
Tabagismo		
Tabagista ativo	2927 (1534 - 7131)	0,04
Não e ex-tabagista	2602 (717,2 - 6317)	
Etilismo		
Etilista ativo	2786 (1185 - 6317)	0,45
Não etilista	2952 (1545 - 5007)	
Estadiamento		
I + II	2822 (1185 - 7131)	0,79
III + IV	2770 (717,2 - 5040)	
Grau Histológico		
G1	3243 (1383 - 6218)	0,82
G2	2798 (1332 - 7131)	
G3	3078 (1415 - 6317)	
Óbito		
Sim	2714 (717,2 - 5040)	0,23
Não	2822 (1185 - 7131)	

Quando a expressão gênica de *DNMT3A* foi considerada na associação com os dados clínico-patológicos, foi demonstrado que há maior expressão de RNAm de *DNMT3A* em tumores pouco diferenciados ($p=0,04$) (Figura 4.9). No entanto, não foi demonstrada a associação entre a expressão deste gene com nenhuma outra característica clínico-patológica (Tabela 4.8).

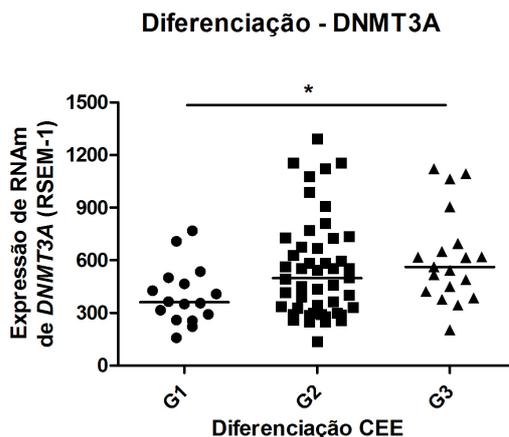


Figura 4.9: Perfil de expressão gênica de *DNMT3A* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, de acordo com a diferenciação tumoral. Representação gráfica da expressão de RNAm de *DNMT3A* (RSEM-1) em 83 amostras de CEE e agrupadas de acordo com o grau de diferenciação do tumor. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do *software* RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Foram incluídos 16 tumores classificados como bem diferenciados (G1), 48 tumores classificados com moderadamente diferenciados (G2) e 19 tumores classificados como pouco diferenciados (G3). Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou sem informação sobre o grau de diferenciação do tumor. Teste *Kruskal-Wallis* $*p<0,05$.

Tabela 4.8: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3A* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Característica	Mediana DNMT3A (min-max)	P
Gênero		
Masculino	500,1 (137,1 - 3351)	0,63
Feminino	503,9 (221,3 - 1375)	
Tabagismo		
Tabagista ativo	466 (158,5 - 1547)	0,63
Ex-tabagista	498,6 (137,1 - 1648)	
Etilismo		
Etilista ativo	466,0 (137,1 - 3351)	0,90
Não etilista	523,4 (244,3 - 1293)	
Estadiamento		
I + II	477,7 (158,5 - 1375)	0,28
III + IV	553,5 (137,1 - 1154)	
Grau Histológico		
G1	360 (158,5 - 768,1)	0,04
G2	498,6 (137,1 - 1293)	
G3	561,9 (203,5 - 1121)	
Óbito		
Sim	416,4 (137,1 - 941,9)	0,14
Não	500,1 (221,3 - 1154)	

Além disso, quando foi feita a análise do perfil de expressão do RNAm da *DNMT3B* nos tumores de CEE, observamos que houve uma maior expressão deste em amostras tumorais em estadiamentos mais avançados ($p=0,04$) (Figura 4.10). Não foi demonstrada a associação da expressão gênica de *DNMT3B* com nenhuma outra característica clínico-patológica (Tabela 4.9).

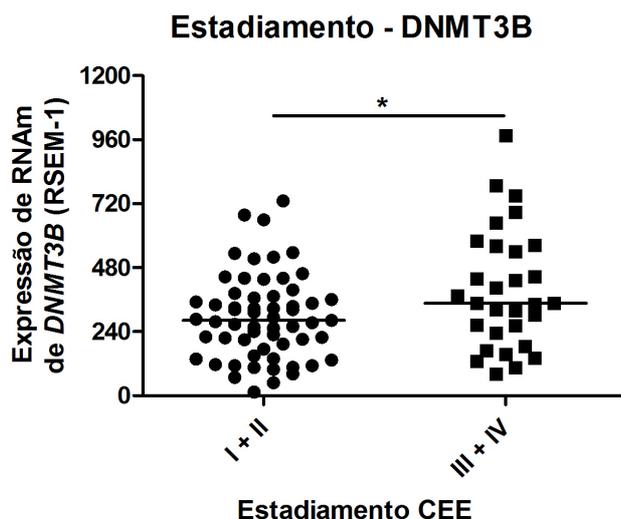


Figura 4.10: Perfil de expressão gênica de *DNMT3B* em em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de acordo com o estadiamento do tumor. Representação gráfica da expressão de RNAm de *DNMT3B* (RSEM-1) em 89 amostras de CEE e agrupadas de acordo com o estadiamento dos tumores. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do *software* RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Foram agrupadas 59 amostras em estágio I e II e classificadas como tumores em estágio inicial e 30 amostras em estágio III e IV foram agrupadas e classificadas como tumores em estágio avançado. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou sem informação sobre o estadiamento do tumor. Teste *Mann Whitney* * $p < 0,05$.

Tabela 4.9: Associação entre a expressão gênica de *DNMT3B* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Característica	Mediana DNMT3B (min-max)	<i>p</i>
Gênero		
Masculino	320,4 (48,81 - 787,3)	0,06
Feminino	216,9 (13,45 - 440,6)	
Tabagismo		
Tabagista ativo	322,9 (81,57 - 787,3)	0,43
Não e ex-tabagista	317,6 (13,45 - 2320)	
Etilismo		
Etilista ativo	289,6 (13,45 - 1051)	0,26
Não etilista	328,7 (133,8 - 750,1)	
Estadiamento		
I + II	282,8 (13,45 - 730,5)	0,04
III + IV	346,4 (81,01 - 975,1)	
Grau Histológico		
G1	267,4 (112,8 - 561,9)	0,19
G2	341,9 (48,81 - 787,3)	
G3	264,1 (106,3 - 975,1)	
Óbito		
Sim	266,3 (48,81 - 787,3)	0,41
Não	326,3 (13,45 - 1696)	

A análise de expressão de *SP1* nessa casuística demonstrou que há maior expressão deste gene em amostras de pacientes que se declararam não-etilistas ativos ($p= 0,03$) (Figura 4.11). Além disso, não foi observada a associação entre a expressão de *SP1* e nenhum outro dado clínico-patológico (Tabela 4.10).

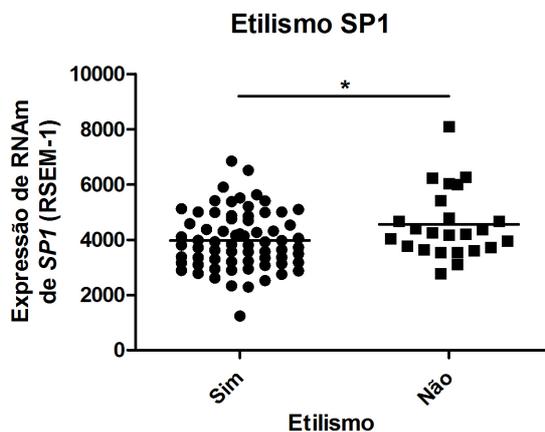


Figura 4.11: Perfil de expressão gênica de *SP1* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* de acordo com o hábito de ingerir bebidas alcoólicas. Representação gráfica da expressão de RNAm de *SP1* (RSEM-1) em 93 amostras de CEE e agrupadas de acordo com o hábito de consumir bebidas alcoólicas. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do *software* RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Foram incluídas 69 amostras de pacientes que se declararam etilistas e 24 amostras de pacientes que se declararam não-etilistas. Foram excluídas amostras consideradas *outliers* ou sem informação sobre o hábito do paciente de ingerir bebidas alcoólicas. Teste *t Student* * $p<0,05$.

Tabela 4.10: Associação entre a expressão gênica de *SP1* e as características clínico-patológicas dos 95 pacientes com carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) incluídos no banco de dados *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e avaliados nesse estudo.

Característica	Mediana SP1 (min-max)	P
Gênero		
Masculino	3923 (1234 - 8106)	0,46
Feminino	4228 (3106 - 6842)	
Tabagismo		
Tabagista ativo	3875 (2610- 6842)	0,93
Não e ex-tabagista	4044 (2286 - 6512)	
Etilismo		
Etilista ativo	3827 (1234 - 6842)	0,03
Não etilista	4228 (2773 - 8106)	
Estadiamento		
I + II	3976 (1234 - 8106)	0,91
III + IV	3768 (2286 - 6262)	
Grau Histológico		
G1	3570 (2937 - 5118)	0,43
G2	3954 (2610 - 6512)	
G3	4139 (2286 - 6262)	
Óbito		
Sim	3923 (1234 - 6842)	0,62
Não	3971 (2325 - 6512)	

Por fim, não foi observada nenhuma associação entre a expressões das *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* e a sobrevida dos pacientes (Figura 4.12).

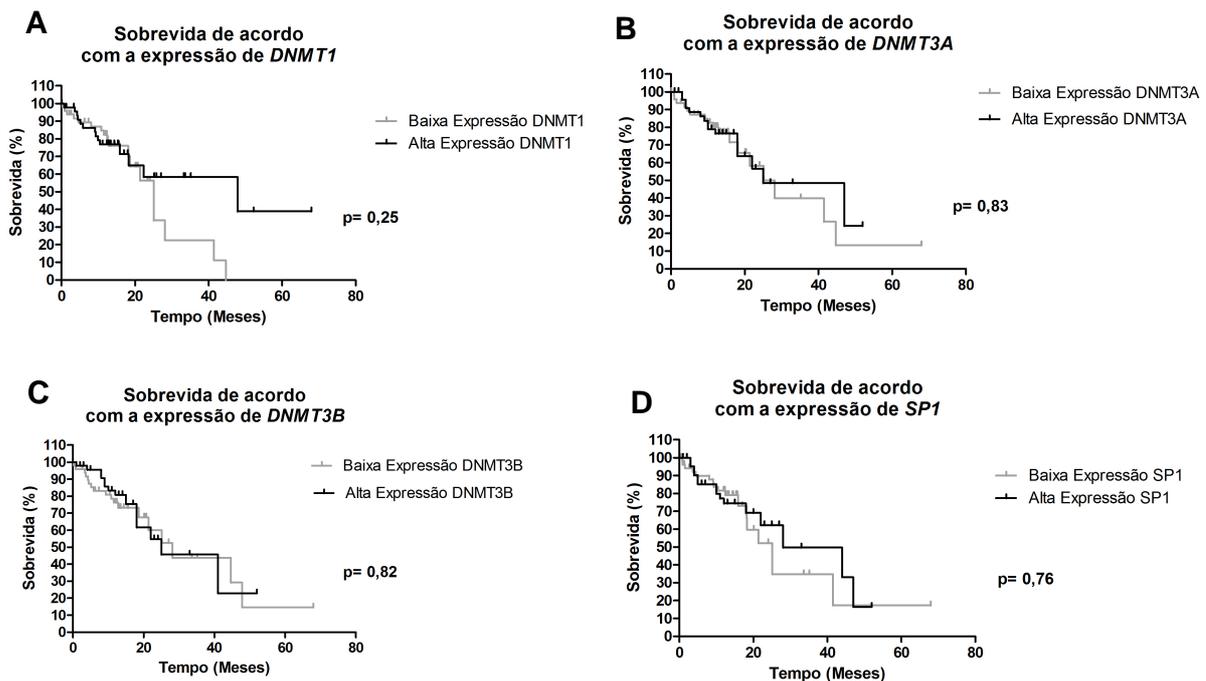


Figura 4.12: Sobrevida global dos pacientes com em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que tiveram seus dados depositados no *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*, de acordo com a expressão de RNAm de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1*. Representação gráfica, com curva de Kaplan-Meier, da sobrevivida global de pacientes provenientes do TCGA por um período de 68 meses. Os pacientes foram agrupados de acordo com a mediana das expressões gênicas de *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B), *DNMT3B* (C) e *SP1* (D). Os tumores que expressavam níveis de RNAm acima da mediana de expressão inseridos no grupo de “Alta Expressão” e os que expressavam níveis de RNAm abaixo da mediana de expressão inseridos no grupo “Baixa Expressão”. O perfil de expressão gênica a partir de dados gerados por RNA-seq são normalizados com a utilização do software RSEM-1 e são representados em unidades RSEM-1. Teste *Log-rank*.

4.2 AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *DNMT1*, *DNMT3A* E *DNMT3B* EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO (CEE) APÓS MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO E/OU ATIVIDADE DE p53 E SP1

4.2.1 Expressão basal de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* em linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 selvagem ou mutante

A expressão gênica basal das *DNMTs* e *SP1* foi avaliada em uma linhagem celular derivada de CEE que possui p53 selvagem ou p53 mutada, a fim de determinarmos se o perfil de expressão das *DNMTs*, de acordo com a presença ou ausência de mutação em *TP53*, seguia o observado nas amostras humanas de CEE avaliadas. A linhagem celular utilizada foi a TE-1, que possui uma mutação termo-sensível no códon 272 do gene *TP53*. Quando a célula é cultivada à 37°C, a proteína adquire uma conformação mutante, incapaz de se ligar ao DNA e, conseqüentemente, incapaz de levar à transativação de seus genes alvo. No entanto, quando a linhagem é cultivada à 32°C, p53 adquire uma conformação selvagem e ativa e é capaz de exercer sua função de transativação de genes (BARNAS C *et al*, 1997). Na linhagem TE-1 cultivada à 37°C, foram observados aumentos de 1,2 vezes, 1,6 vezes, 1,8 vezes e 2,0 vezes na expressão da *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e de *SP1*, respectivamente, em comparação aos níveis de expressão desses mesmos genes quando a linhagem foi cultivada à 32°C. Corroborando os dados de expressão gênica, houve uma maior expressão basal da proteína *DNMT1* e *SP1* na linhagem TE-1 cultivada à 37°C, conforme demonstrado na figura 4.13.

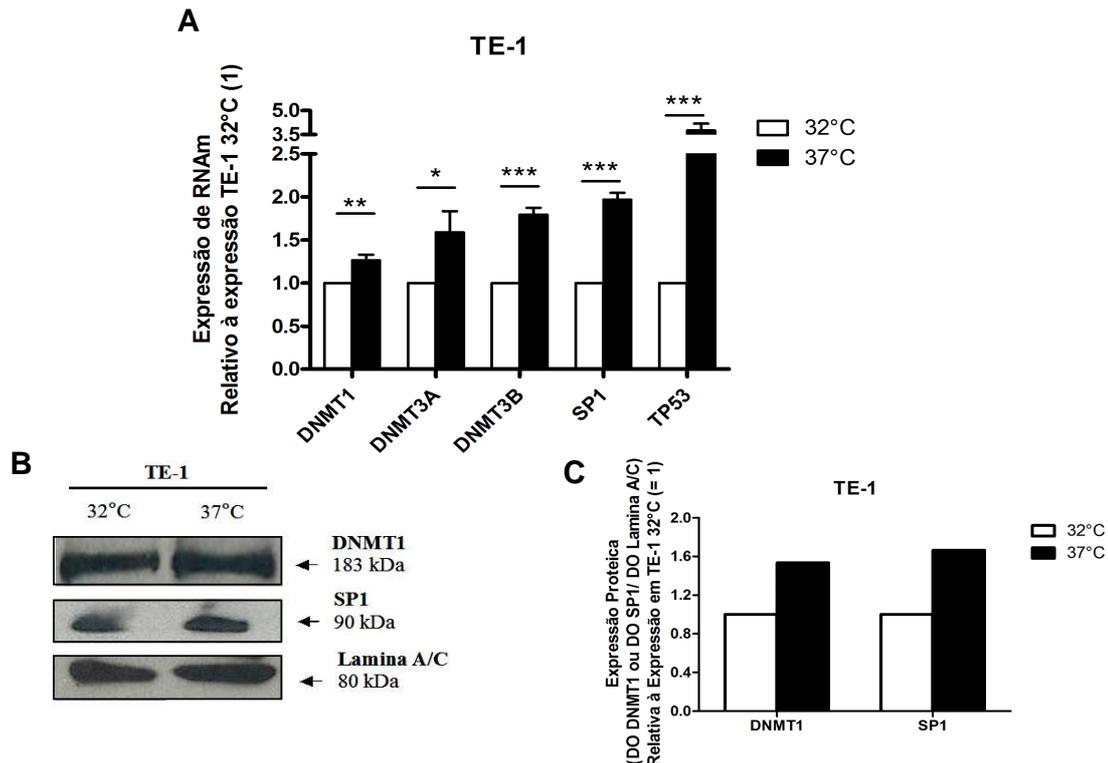


Figura 4.13: Perfil de expressão basal de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, de *SP1* e de *TP53* nas células TE-1 cultivadas à 37°C (p53 mutante), quando comparados aos níveis detectados nas células cultivadas à 32°C (p53 selvagem) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste *t Student* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica basal de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear das linhagens TE-1 cultivada à 32 ou 37°C. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1 cultivadas à 37°C, quando comparada à intensidade obtida nas células cultivadas à 32°C (=1).

Esses resultados mostram que a presença de mutação no gene *TP53* está associada a uma maior expressão de *SP1* e das *DNMTs*.

4.2.2 Avaliação do efeito da modulação da expressão e/ou atividade de SP1 sobre a expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

Levando em consideração o panorama anteriormente exposto, partimos para investigar o possível papel de SP1 na regulação das *DNMTs* em CEE.

4.2.2.1 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de SP1 sobre a expressão da DNMT1, DNMT3A, DNMT3B em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa

Para avaliar qual seria o efeito do aumento de expressão de SP1 sobre os níveis de RNAm das *DNMTs* em linhagens celulares derivadas de CEE e p53-deficientes, a transfecção com vetor de expressão de SP1 foi realizada na linhagem TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C. Em todos os experimentos nos quais foi realizada a modulação da expressão gênica por transfecção de vetor de expressão de SP1, foi avaliada, também, a taxa de morte celular, que poderia ter sido causada pelo agente de transfecção utilizado (Lipofectamina 2000), por marcação com anexina V e iodeto de propídio e leitura por citometria de fluxo. Nas células TE-13 e TE-1, cultivada à 37°C, não houve aumento significativo nas taxas de apoptose após a transfecção com o vetor de expressão (Figura 4.14).

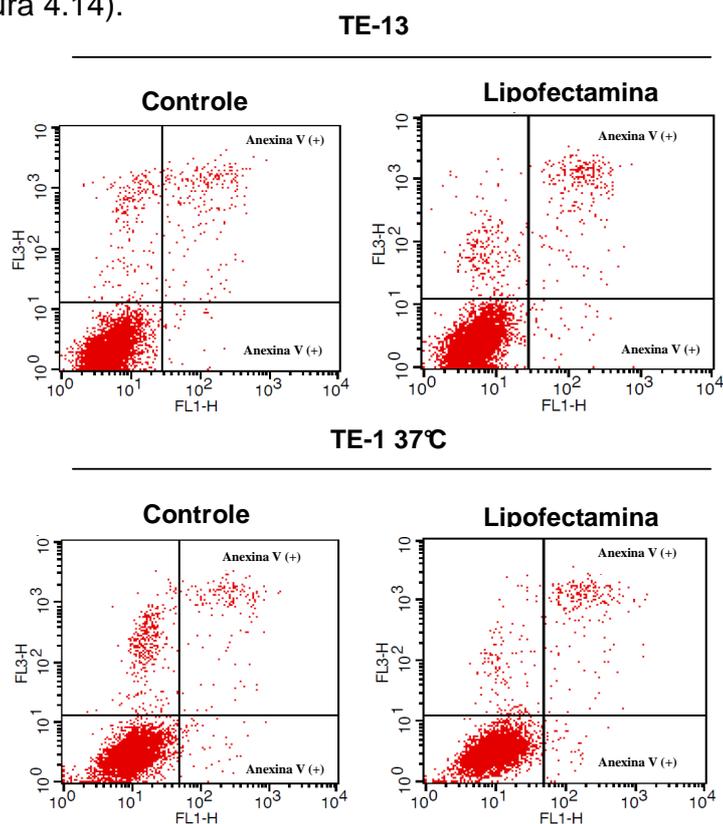


Figura 4.14: Análise do perfil de morte celular por apoptose nas linhagens celulares derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C. Dot plot representativo das células anexina V positivas após incubação com o agente transfectante Lipofectamina 2000, equivalente à transfecção com 1 µg do vetor de expressão, avaliado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com o agente transfectante por 24 horas. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com Anexina V; Eixo Y (Detector FL3-H) referente à marcação com Iodeto de Propídio.

A linhagem TE-13 é derivada de CEE e apresenta níveis muito baixos de expressão de RNAm de *TP53* e níveis indetectáveis da proteína codificada por esse gene (BARNAS C *et al*, 1997). Os resultados mostraram que, após o aumento da expressão de *SP1* na linhagem TE-13, conseqüente da transfecção de 0,25 µg de vetor de expressão, houve uma redução de 57% na expressão da *DNMT1*, 31% na expressão da *DNMT3A* e 24% na expressão da *DNMT3B*. Porém, quando as células foram transfectadas com 1,0 µg do vetor de expressão de *SP1*, observamos o aumento de 1,4 vezes na expressão da *DNMT1*, 2,1 vezes na expressão da *DNMT3A* e 1,6 vezes na expressão da *DNMT3B*. Além disso, foi demonstrado que após a transfecção com 1,0 µg do vetor de expressão de *SP1* houve o aumento na expressão proteica de *DNMT1*. Os níveis de RNAm e proteicos de *SP1* foram avaliados como controle da transfecção (Figura 4.15).

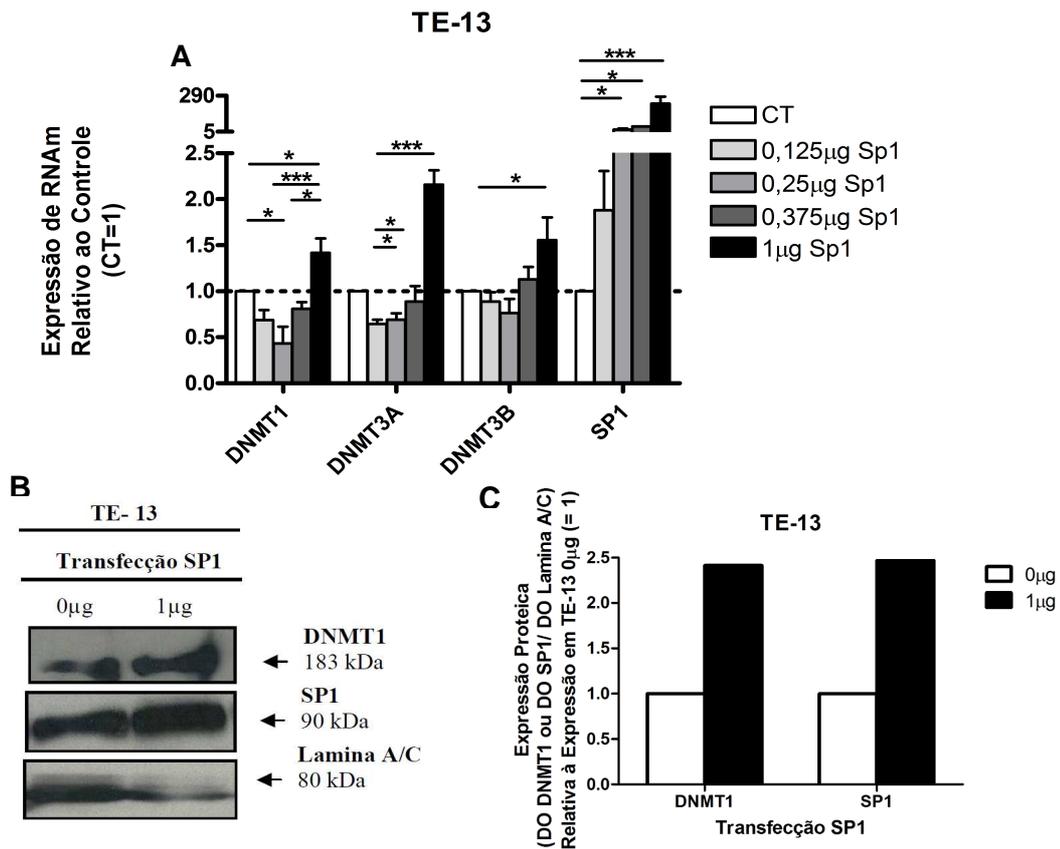


Figura 4.15: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção com vetor de expressão de SP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e de SP1 nas células TE-13 transfectadas com vetor de expressão de SP1, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-13 após transfecção com vetor de expressão de SP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-13 transfectadas com o vetor de expressão de SP1 (1 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

A fim de avaliar se o aumento da expressão de SP1 seria capaz de modular a expressão gênica das DNMTs em um outro modelo celular p53-deficiente, as células TE-1 cultivadas à 37°C, que expressam p53 mutado, foram, também, transfectadas com quantidades crescentes de um vetor de expressão de SP1. Para realização desse experimento, as quantidades do vetor de expressão de SP1 utilizadas foram: 0,1 µg, 0,2 µg, 0,3 µg e 1 µg. Os níveis de expressão das DNMTs, TP53 e SP1 foram avaliados, em seguida, pela técnica de RT-PCRq e estão representados na figura 4.16. Foi demonstrado um aumento dose dependente da expressão de DNMT1 de acordo com

as quantidades de vetor de expressão de SP1 (de 1,8 vezes e 2,0 vezes quando houve transfecção de 0,3 e 1,0 µg de vetor de expressão, respectivamente). Além disso, também observamos um aumento de 1,5 vezes na expressão da *DNMT3A* após a transfecção com 1 µg do vetor de expressão de SP1. Os níveis de RNAm e de proteína de SP1 foram avaliados como controle da transfecção. Além disso, os níveis de RNAm de *TP53* também foram avaliados no intuito de observar se os mesmos seriam modulados após a superexpressão de SP1 e não foi demonstrado variação estatisticamente significativa nessa análise. Por fim, a análise de expressão proteica demonstrou o aumento da expressão de DNMT1 após a transfecção de 0,3 µg do vetor de expressão de SP1.

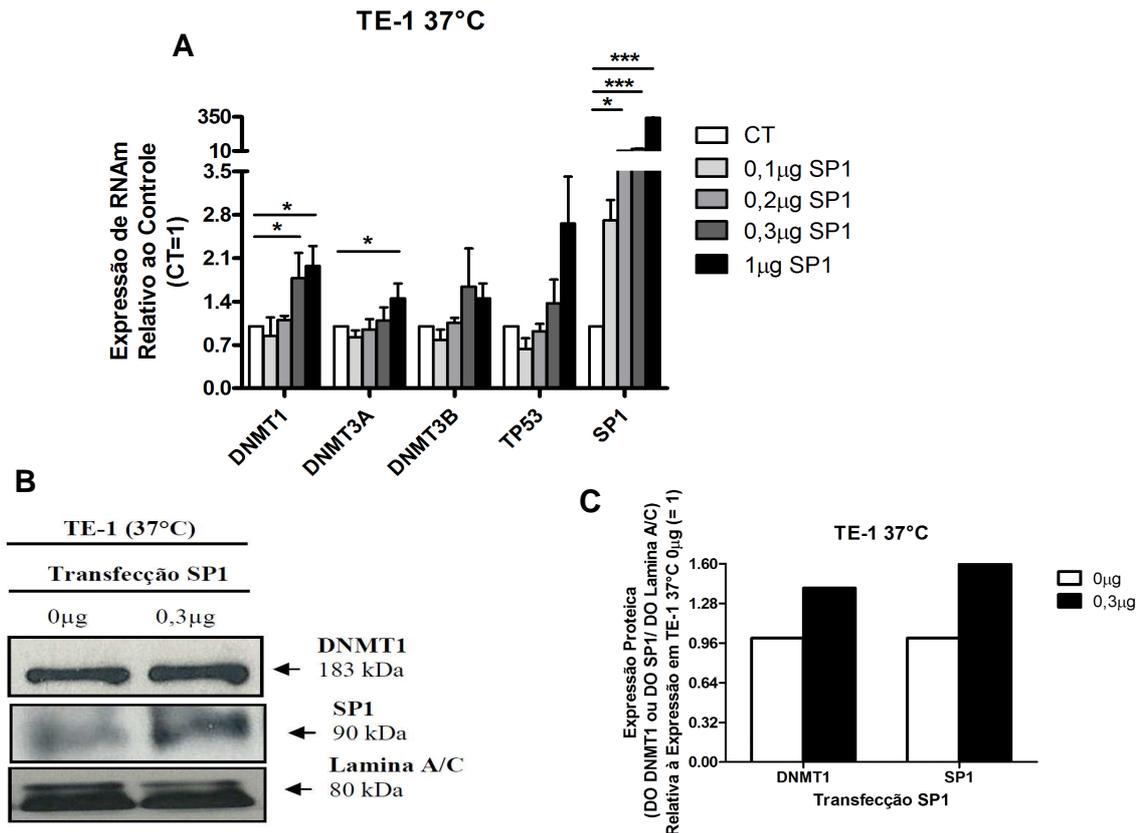


Figura 4.16: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 37°C, após transfecção com vetor de expressão de SP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TP53* e de *SP1* nas células TE-1, cultivada à 37°C, transfectadas com vetor de expressão de SP1, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 37°C, após transfecção com vetor de expressão de SP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do software *ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 37°C, transfectadas com o vetor de expressão de SP1 (0,3 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

4.2.2.2 Avaliação do efeito do silenciamento de SP1 sobre a expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa

O passo seguinte foi avaliar se o silenciamento de *SP1* seria capaz de levar a um fenômeno contrário ao observado com a superexpressão desse gene. Para isso, siRNA específico para *SP1* foi transfectado nas linhagens celulares de CEE p53-deficientes,

TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C. Inicialmente foi avaliado a eficiência da transfecção através da técnica de citometria de fluxo em que as células marcadas com o fluoróforo 6-FAM, que estava conjugado ao siSCR, foram quantificadas. Foi observado eficiência de transfecção de 73% na linhagem TE-13 e 90% na linhagem TE-1 cultivada à 37°C (Figura 4.17).

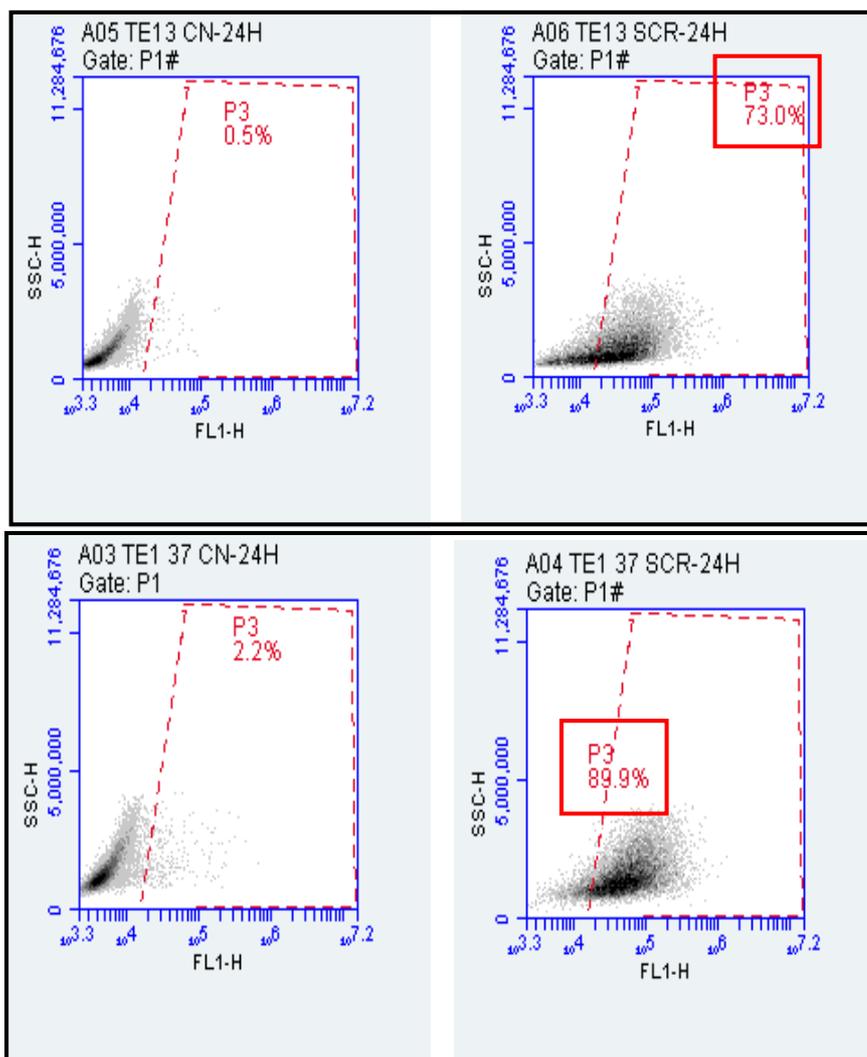


Figura 4.17: **Análise da eficiência de transfecção de siRNA por citometria de fluxo nas linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C.** Dot plot representativo da eficiência de transfecção de siSCR-FAM nas linhagens TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C. As células foram transfectadas com siSCR-FAM e permaneceram em cultura por 24 horas após a transfecção. Células que receberam o agente de transfecção, porém não receberam o siSCR-FAM foram consideradas como controle. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com FAM; Eixo Y (Detector SSC-H) referente à dispersão lateral de luz.

Na figura 4.18 estão representados os resultados obtidos após a avaliação da expressão gênica e proteica, avaliada por RT-PCRq e *western blotting*, respectivamente, das *DNMTs* e de *SP1* após o silenciamento de *SP1* na linhagem TE-13. Os níveis de RNAm e proteicos de *SP1* foram avaliados como controle da transfecção. Os resultados demonstraram a redução de 55% na expressão da *DNMT1*, 36% na expressão da *DNMT3A* e 39% na expressão da *DNMT3B*. Além disso, o silenciamento de *SP1* com siSP1 foi associado à redução dos níveis proteicos de *DNMT1* nessa linhagem celular.

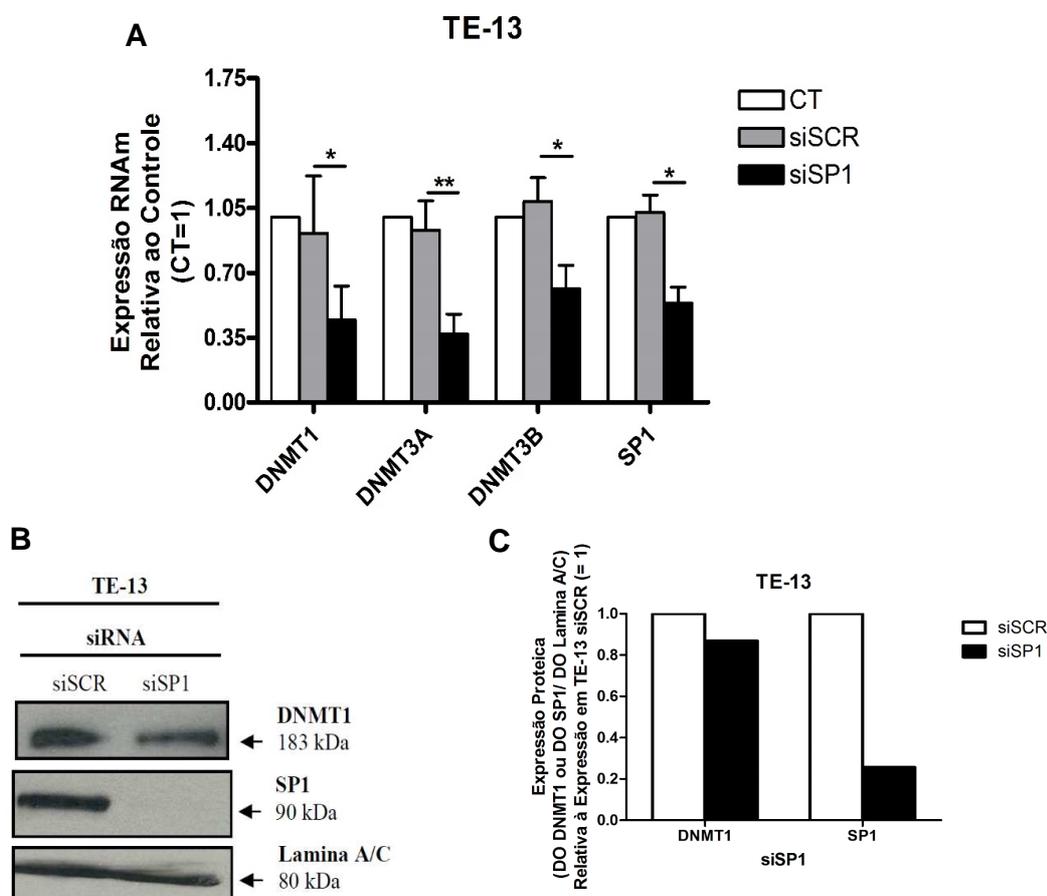


Figura 4.18: Perfil de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e *SP1* na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção com siSP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e de *SP1* nas células TE-13 transfectadas com siSCR e siSP1, quando comparados aos níveis detectados nas células não transfectadas ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de *DNMT1*, *SP1* e *Lamina A/C* (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-13 após transfecção com siSP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de *DNMT1* e *SP1*, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína *Lamina A/C*, nas células TE-13 transfectadas com siSP1, quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o siSCR (=1).

Ainda com o objetivo de avaliar o perfil de expressão das *DNMTs*, *TP53* e *SP1* após o silenciamento de *SP1* em modelos celulares p53-deficientes, a linhagem TE-1 cultivada à 37°C foi submetida ao silenciamento de *SP1* com a utilização de siRNA específico. Como controle experimental, os níveis de RNAm e proteicos de *SP1* foram avaliados. A redução dos níveis de expressão de *SP1* nessa linhagem culminou com a redução de 49% na expressão gênica de *DNMT1*. Além disso, os níveis de RNAm de *TP53* também foram avaliados no intuito de observar os mesmos seriam modulados após o silenciamento de *SP1*, mostrando que não houve diferença significativa após o silenciamento. Por fim, observamos que houve redução dos níveis proteicos de *DNMT1* (Figura 4.19).

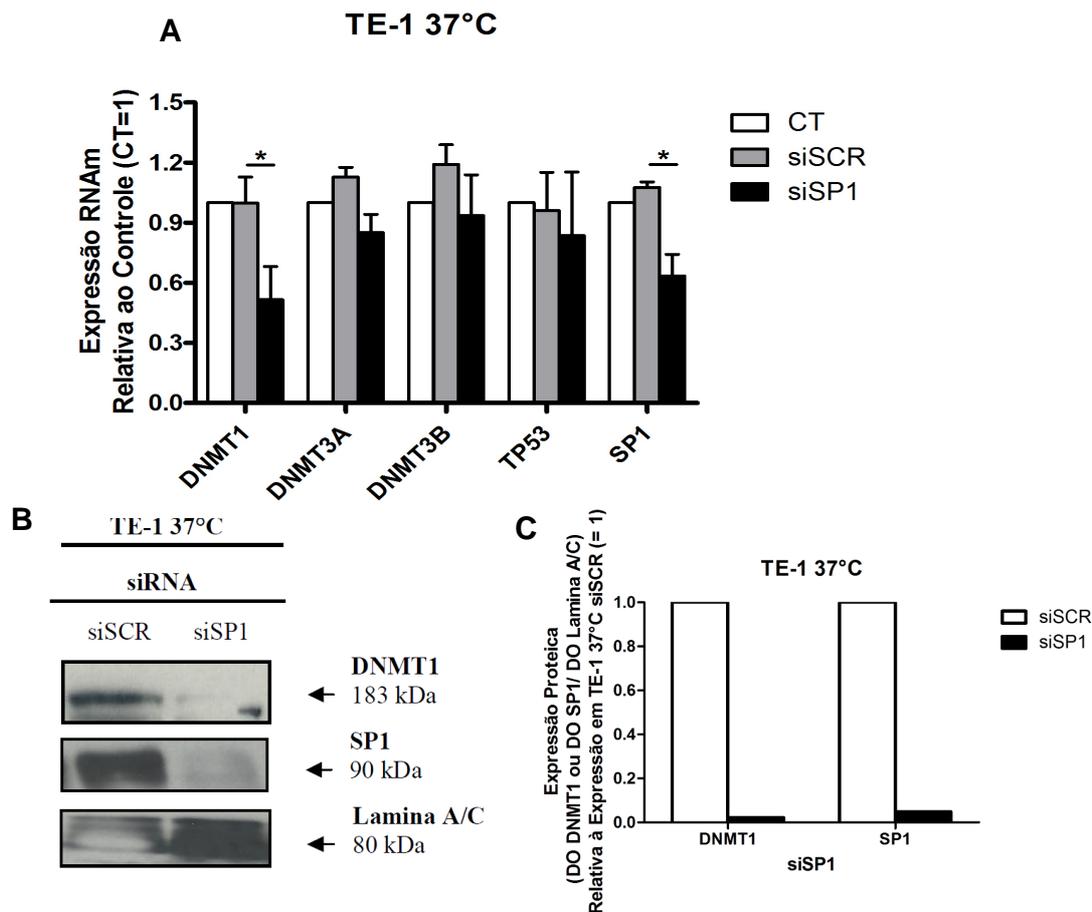


Figura 4.19: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 37°C após transfecção com siSP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TP53 e de SP1 nas células TE-1, cultivada à 37°C, transfectadas com siSCR e siSP1, quando comparados aos níveis detectados nas células não transfectadas ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 37°C, após transfecção com siSP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 37°C, transfectadas com siSP1, quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o siSCR (=1).

4.2.2.3 Avaliação do efeito da inibição da atividade de SP1 sobre a expressão das DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagens celulares de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa

Já é bem estabelecido que os sítios de ligação da proteína SP1 ao DNA são regiões ricas em dinucleotídeos G-C. A Mitramicina A é uma droga que se liga nos

dinucleotídeos G-C e impede a interação de SP1 às suas sequencias consenso no DNA, sendo considerada um inibidor da atividade desse fator de transcrição. A fim de avaliar o papel da atividade transcricional de SP1 na regulação da expressão das *DNMTs*, as linhagens celulares de CEE p53-inativo foram tratadas com Mitramicina A e, em seguida, tiveram a expressão gênica e proteica das *DNMTs* avaliadas por RT-PCRq e *Western blotting*, respectivamente. Inicialmente, foi feita a quantificação dos níveis de morte celular por marcação das células TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C com Anexina V e Iodeto de propídio e leitura em citometria de fluxo marcadas. Os resultados estão demonstrados na figura 4.20.

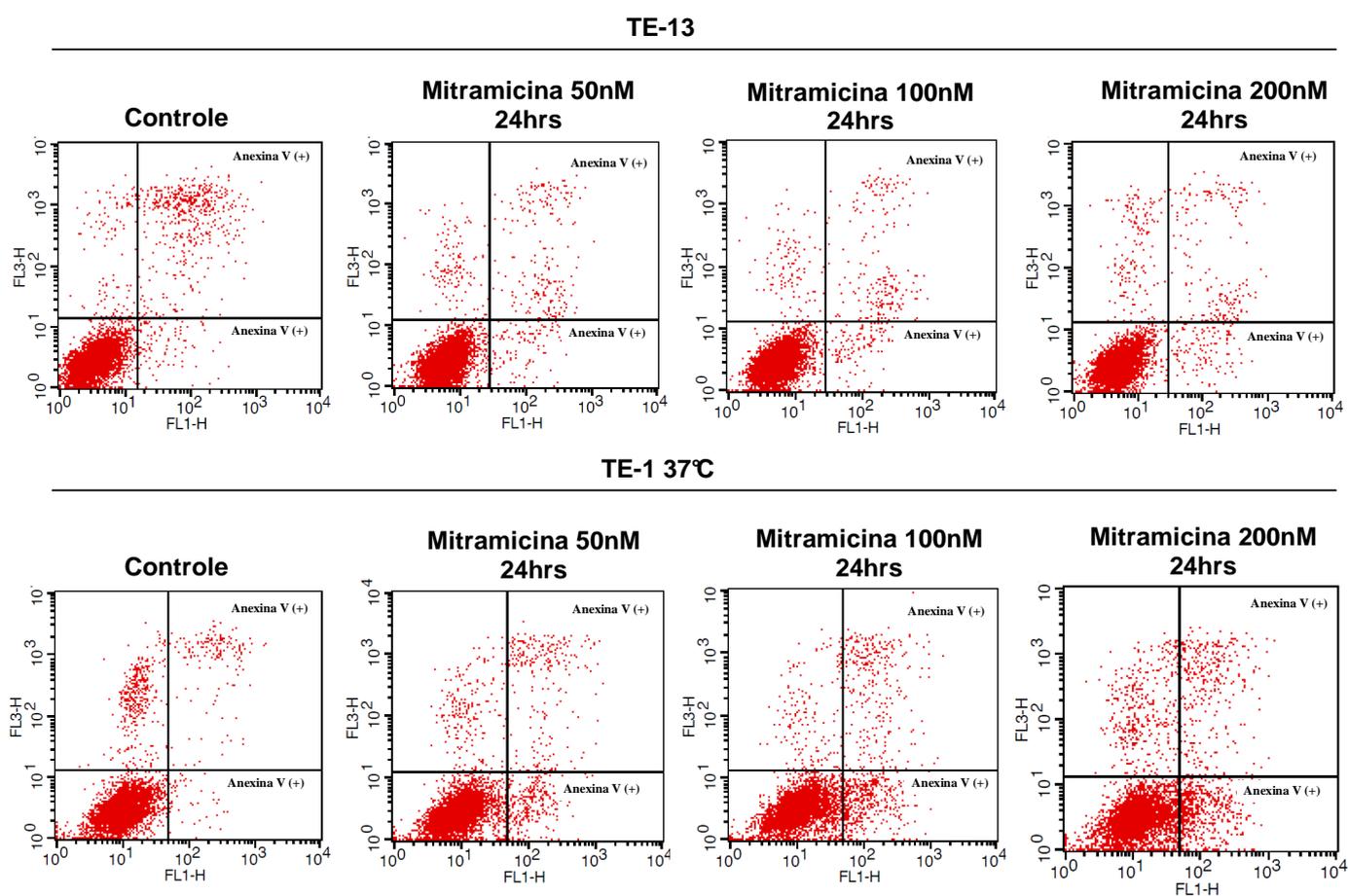


Figura 4.20: Análise do perfil de morte celular por apoptose nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C após tratamento com Mitramicina A. Dot plot representativo das células anexina V positivas após incubação com Mitramicina A nas concentrações de 50nM, 100nM e 200nM, diluída em meio de cultura RPMI, avaliado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com a Mitramicina A por 24 horas. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com Anexina V; Eixo Y (Detector FL3-H) referente à marcação com Iodeto de Propídio.

A linhagem celular TE-13, que não expressa p53, foi tratada com Mitramicina A, nas doses de 50nM, 100 nM e 200 nM por 24 horas e foi observada uma redução significativa na expressão de RNAm das *DNMTs* após o tratamento com todas as doses avaliadas. Especificamente, a dose de 200 nM de Mitramicina A levou à maior redução na expressão dos genes avaliados, sendo esta de 90% na expressão de *DNMT1*, de 91% na expressão de *DNMT3A* e de 80% na expressão de *DNMT3B* em 80%. De forma concordante, houve também uma redução significativa na expressão proteica de DNMT1 quando esta linhagem foi tratada com 200 nM de Mitramicina A (Figura 4.21).

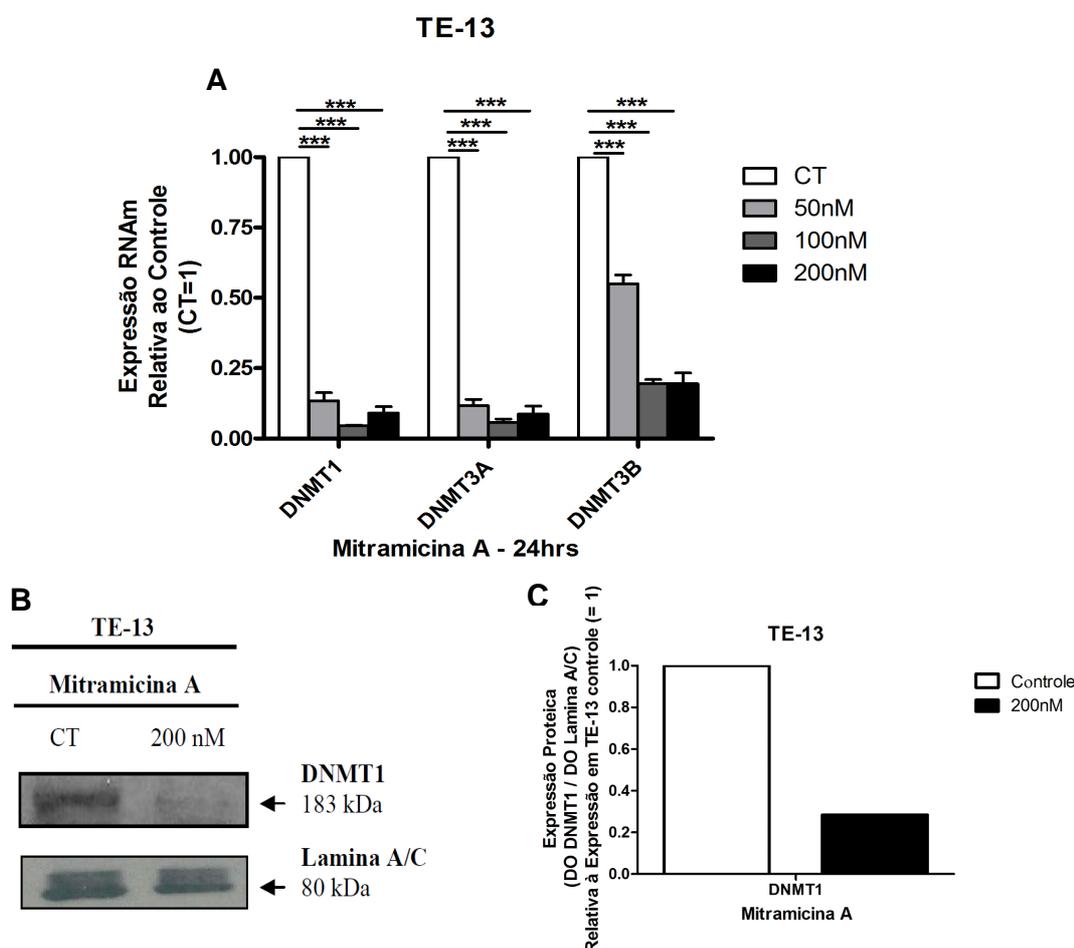


Figura 4.21: Perfil de expressão de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após tratamento com Mitramicina A. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* nas células TE-13 tratadas com Mitramicina A, quando comparados aos níveis detectados nas células não tratadas (Controle) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de *DNMT1* e *Lamina A/C* (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-13 após tratamento com Mitramicina A. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de *DNMT1*, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína *Lamina A/C*, nas células TE-13 tratadas com Mitramicina A, quando comparada à intensidade obtida nas células não tratadas (=1).

Posteriormente, a linhagem TE-1 cultivada à 37°C, apresentando a maior parte da p53 na conformação mutante, foi, também, submetida ao tratamento com Mitramicina A nas concentrações 50 nM, 100 nM e 200 nM. Os resultados mostraram que houve redução de 78% na expressão da *DNMT1*, 70% na expressão da *DNMT3A* e 81% na expressão da *DNMT3B* quando foi utilizado 200 nM de Mitramicina A. As outras doses testadas também foram capazes de reduzir significativamente a expressão de RNAm das *DNMTs*. Além disso, os níveis de RNAm de *TP53* também foram avaliados no intuito de observar os mesmos seriam modulados após a inibição da atividade de SP1, revelando resultados semelhantes aos observados para a expressão gênica das *DNMTs*. Quando foi realizada a avaliação da expressão proteica de DNMT1 por *western blotting*, o mesmo efeito foi observado após o tratamento com Mitramicina A: redução da expressão (Figura 4.22).

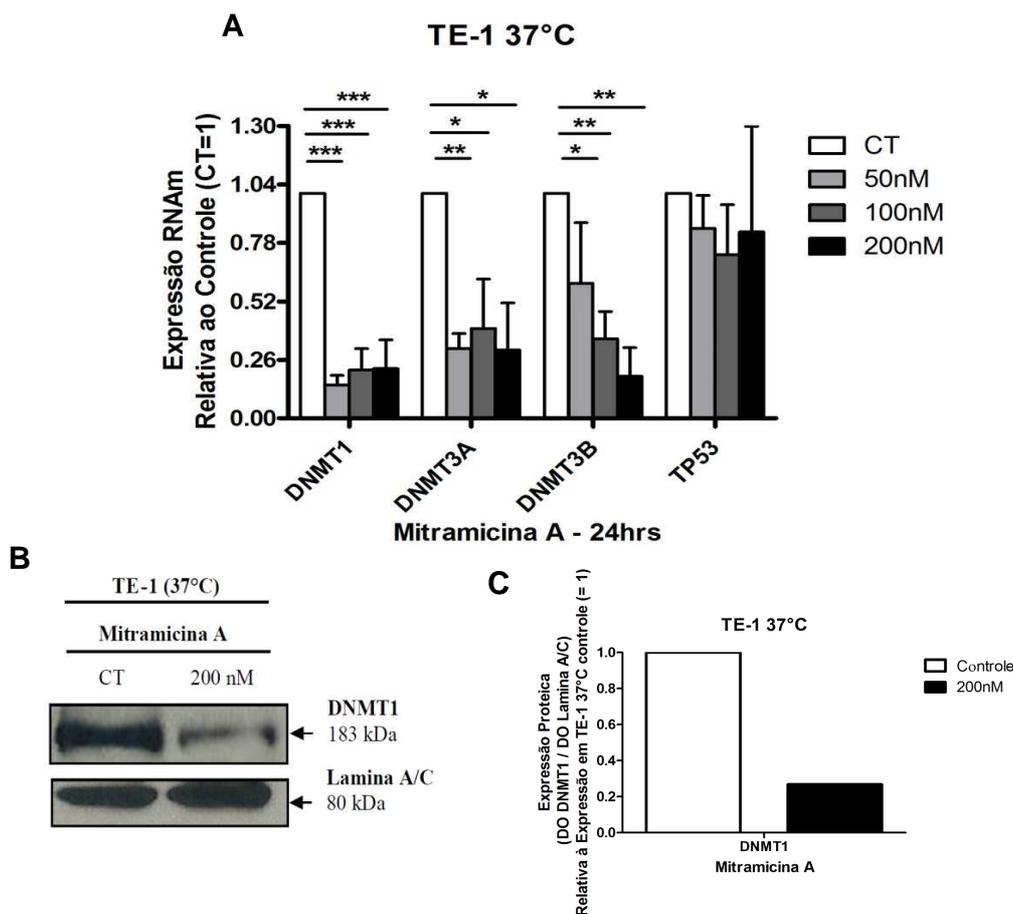


Figura 4.22: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 37°C, após tratamento com Mitramicina A. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e TP53 nas células TE-1, cultivadas à 37°C, tratadas com Mitramicina A, quando comparados aos níveis detectados nas células não tratadas (Controle) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como housekeeping gene. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $p<0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por western blotting com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 37°C, após tratamento com Mitramicina A. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1, avaliado por densitometria com a utilização do software ImageJ e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivadas à 37°C, tratadas com Mitramicina A, quando comparada à intensidade obtida nas células não tratadas (=1).

Os resultados obtidos a partir da modulação da expressão e/ou atividade de SP1 indicam que, na ausência de p53 selvagem, a proteína SP1 parece regular a expressão das DNMTs positivamente.

4.2.2.4 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de SP1 sobre a expressão das DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa

A fim de comparar o impacto do aumento dos níveis de SP1 na expressão das DNMTs em células que expressam a p53 selvagem com o que foi observado em células que não expressam p53 (TE-13) ou apresentam a proteína mutante (TE-1 cultivada à 32°C), a linhagem celular TE-1 cultivada à 32°C foi transfectada com quantidades crescentes do vetor de expressão para SP1. De forma similar ao que foi realizado nas linhagens celulares TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C, foi avaliado, como controle experimental, se a taxa de morte seria significativamente induzida pelo agente transfectante utilizado, nesse modelo celular. A quantidade de células em apoptose foi avaliada pela marcação das células com anexina V e iodeto de propídio e leitura por citometria de fluxo. Conforme demonstrado na figura 4.23, não foi observado aumento do número de células em apoptose após a adição do agente de transfecção na quantidade utilizada para transfecção de 1 µg do vetor de expressão.

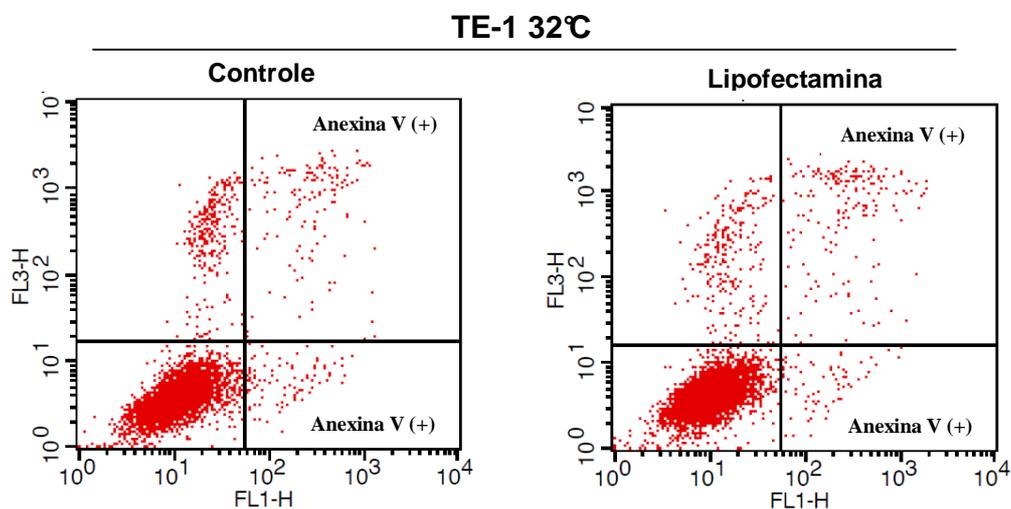


Figura 4.23: **Análise do perfil de morte celular por apoptose na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1 cultivada à 32°C**. Dot plot representativo das células anexina V positivas após incubação com o agente transfectante Lipofectamina 2000, equivalente à transfecção com 1 µg do vetor de expressão, avaliado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com o agente transfectante por 24 horas. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com Anexina V; Eixo Y (Detector FL3-H) referente à marcação com Iodeto de Propídio.

Para induzir o aumento de expressão de SP1 na linhagem celular TE-1 cultivada à 32°C, as quantidades de vetor de expressão de SP1 utilizadas foram 0,1 µg, 0,2 µg e 0,3 µg. Foi observada a redução de 52% nos níveis de expressão de *TP53*, 61% nos níveis de expressão da *DNMT1*, 77% nos níveis de expressão da *DNMT3A* e 52% nos níveis de expressão da *DNMT3B*, quando a linhagem foi transfectada com 0,3 µg do vetor de expressão. Semelhantemente ao observado na análise de expressão gênica, foi demonstrado a redução na expressão de DNMT1 e p53 após o aumento dos níveis de expressão de SP1 na linhagem TE-1 cultivada à 32°C (Figura 4.24). Os níveis de RNAm e proteicos de SP1 foram avaliados como controle da transfecção e os níveis de expressão de *TP53* foram avaliados a fim de determinarmos se a modulação da expressão de SP1 poderia acarretar alterações nos níveis de expressão gênica de *TP53*.

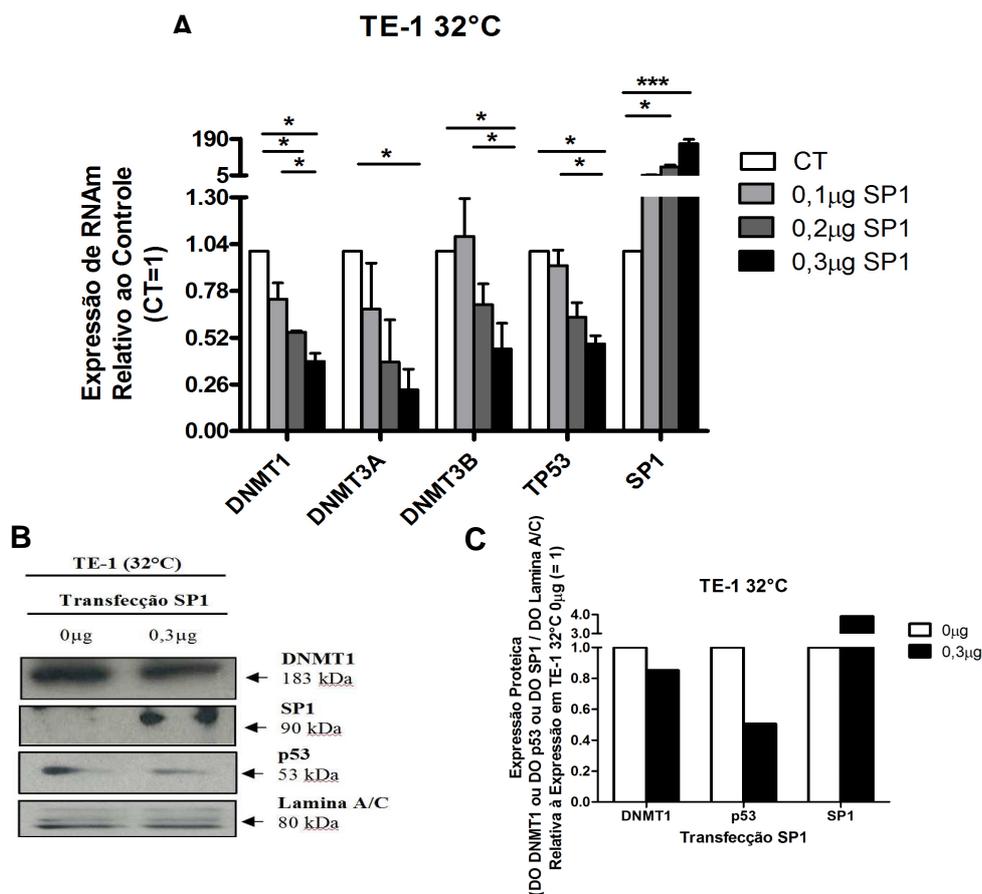


Figura 4.24: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, p53 e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com vetor de expressão de SP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TP53* e de *SP1* nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com vetor de expressão de SP1, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com vetor de expressão de SP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliada por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com o vetor de expressão de SP1 (0,3 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

Uma vez que a linhagem celular TE-1 expressando p53 selvagem é cultivada à temperatura não fisiológica de 32°C, o mesmo experimento foi realizado na linhagem celular derivada de carcinoma colorretal HCT-116, que expressa p53 selvagem, como um controle experimental, para confirmar se os resultados obtidos seriam reproduzidos em uma outra linhagem celular p53 que expressa p53 ativa. Os níveis de RNAm das *DNMTs* foram determinados por RT-PCRq, enquanto que os níveis proteicos de DNMT1 foram determinados por *western blotting*. De maneira similar ao observado na

linhagem TE-1 cultivada à 32°C, o aumento da expressão de SP1 foi associado à redução de 54% dos níveis de RNAm da *DNMT1*, redução de 39% dos níveis de RNAm da *DNMT3A* e redução de 19% dos níveis de RNAm da *DNMT3B*. Também foi demonstrado a redução dos níveis proteicos de DNMT1 após superexpressão de SP1 na linhagem HCT-116. Os níveis de RNAm e proteicos de SP1 foram avaliados como controle da transfecção e os níveis de expressão de *TP53* foram avaliados a fim de determinarmos se a modulação da expressão de SP1 poderia acarretar alterações nos níveis de expressão gênica de *TP53* (Figura 4.25).

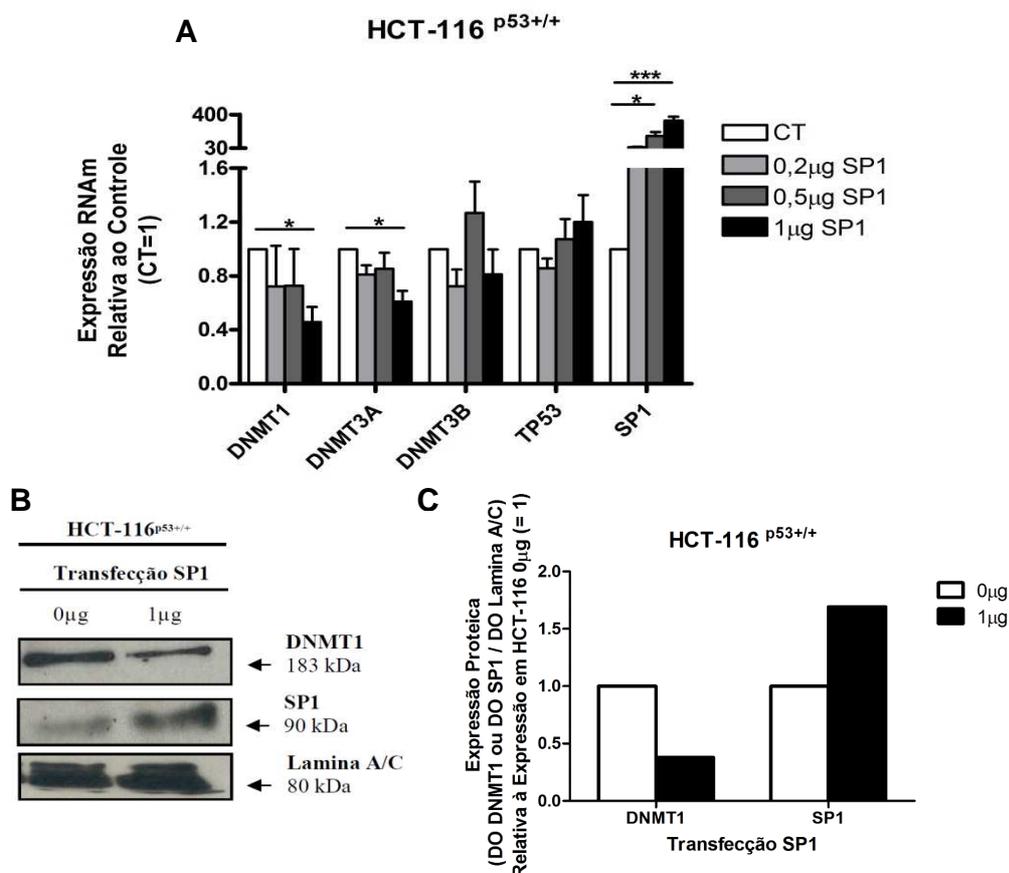


Figura 4.25: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116, após transfecção com vetor de expressão de SP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TP53* e de *SP1* nas células HCT-116 transfectadas com vetor de expressão de SP1, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem HCT-116, após transfecção com vetor de expressão de SP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C nas células HCT-116 transfectadas com o vetor de expressão de SP1 (1 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

4.2.2.5 Avaliação do silenciamento de *SP1* sobre a expressão das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em linhagem celular derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa *p53* ativa

Em seguida, conforme realizado anteriormente para as linhagens TE-1 cultivada à 37°C e para a linhagem TE-13, a expressão de *SP1* foi inibida pelo uso de siRNA específico e a expressão gênica das DNMTs foi avaliada por RT-PCRq e a expressão proteica de DNMT1 por *western blotting*. A análise da eficiência de transfecção realizada por quantificação, por citometria de fluxo, de células marcadas com o fluoróforo FAM, conjugado ao siSCR (siSCR-FAM), evidenciou que a eficiência da transfecção nessa linhagem foi de 98,6%, conforme demonstrado na figura 4.26.

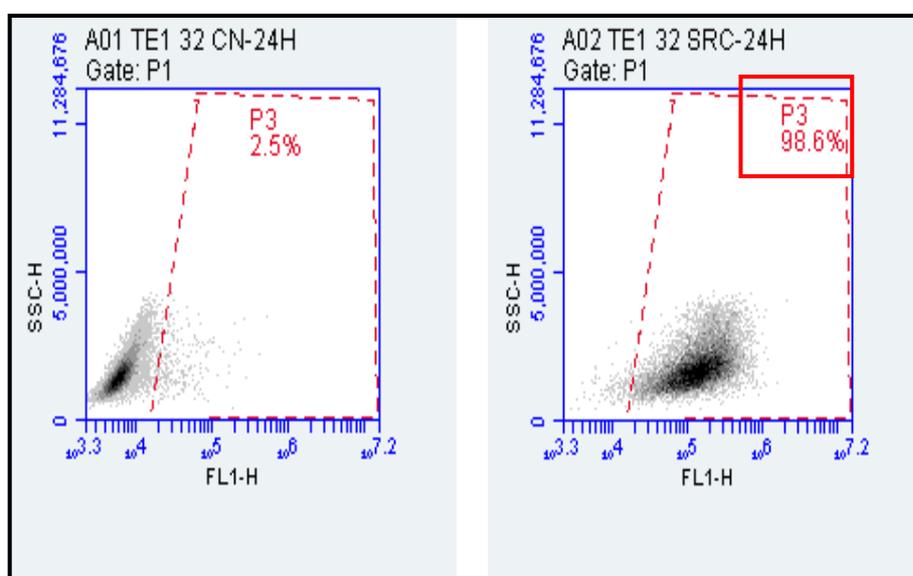


Figura 4.26: **Análise da eficiência de transfecção de siRNA por citometria de fluxo na linhagem derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1 cultivada à 32°C.** Dot plot representativo da eficiência de transfecção de siSCR-FAM na linhagem TE-1 cultivada à 32°C. As células foram transfectadas com siSCR-FAM e permaneceram em cultura por 24 horas após a transfecção. Células que receberam o agente de transfecção, porém não receberam o siSCR-FAM foram consideradas como controle. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com FAM; Eixo Y (Detector SSC-H) referente à dispersão lateral de luz.

Após o silenciamento de *SP1*, foi observado um aumento de 1,4 vezes na expressão da *DNMT1*, 1,7 vezes na expressão da *DNMT3A* e 1,4 vezes na expressão da *DNMT3B*. Os níveis de RNAm de *TP53* também foram avaliados no intuito de observar os mesmos seriam modulados após o silenciamento de *SP1*, revelando que o

mesmo não foi capaz de modular a expressão gênica de *TP53*. Do mesmo modo que o observado nos níveis de expressão gênica, o silenciamento de SP1 foi associado ao aumento dos níveis de expressão proteica de DNMT1 (Figura 4.27). Os níveis de RNAm e proteicos de SP1 foram avaliados como controle do silenciamento de SP1.

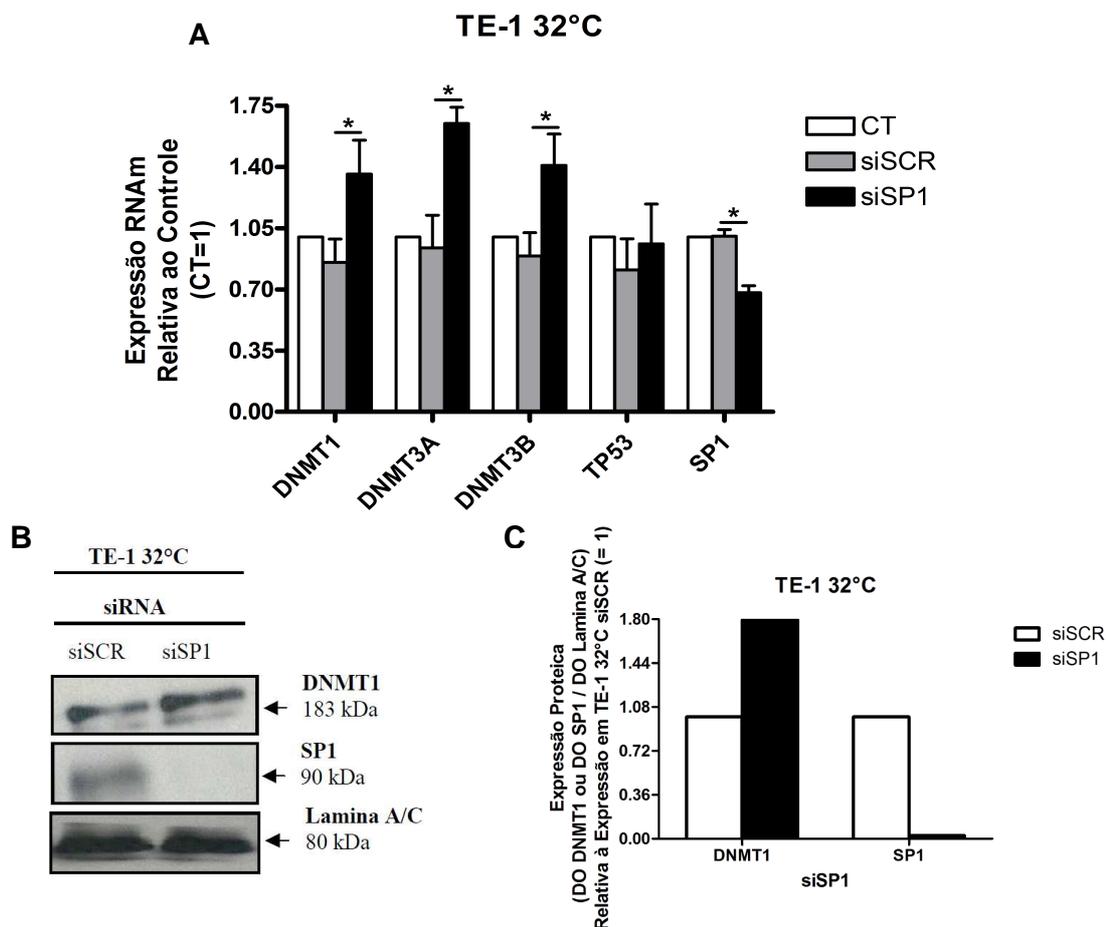


Figura 4.27: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C após transfecção com siSP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TP53* e de *SP1* nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com siSCR e siSP1, quando comparados aos níveis detectados nas células não transfectadas ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com siSP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com siSP1, quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o siSCR (=1).

O silenciamento de *SP1* também foi realizado na linhagem celular HCT-116 a fim de avaliarmos se os efeitos observados na expressão das DNMTs se deu pela diferença na temperatura de cultivo, como explicado anteriormente. Inicialmente a eficiência da transfecção foi avaliada por citometria de fluxo após quantificação das células siSCR-FAM positivas. Nessa linhagem celular, a eficiência da transfecção foi de 77% (Figura 4.28).

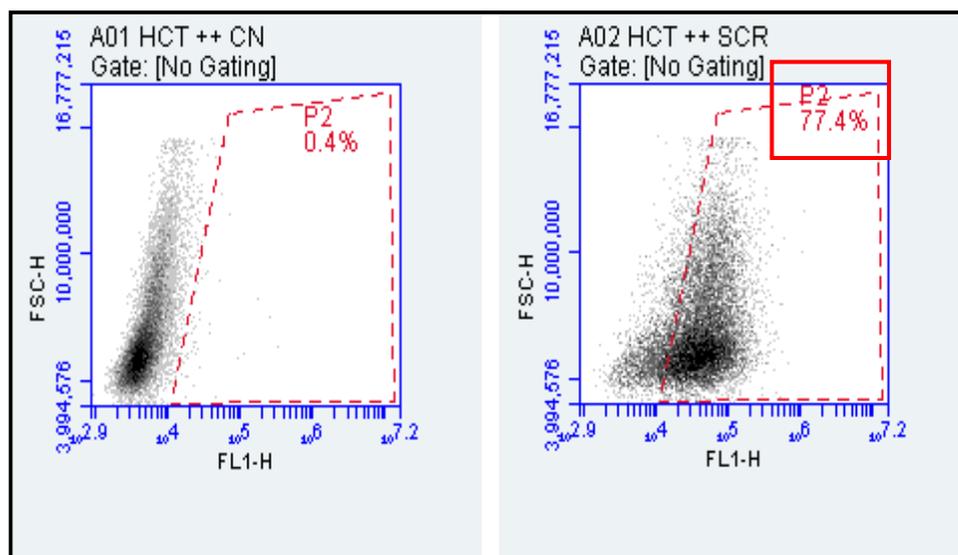


Figura 4.28: **Análise da eficiência de transfecção de siRNA por citometria de fluxo na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116.** Dot plot representativo da eficiência de transfecção de siSCR-FAM na linhagem HCT-116. As células foram transfectadas com siSCR-FAM e permaneceram em cultura por 24 horas após a transfecção. Células que receberam o agente de transfecção, porém não receberam o siSCR-FAM foram consideradas como controle. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com FAM; Eixo Y (Detector SSC-H) referente à dispersão lateral de luz.

Assim como o observado na linhagem TE-1 cultivada à 32°C, o silenciamento de *SP1* culminou com o aumento estatisticamente significativo de 1,2 vezes na expressão de *DNMT1*. Além disso, o silenciamento de *SP1*, nessas condições, não foi capaz de modular a expressão gênica de *TP53*. O aumento da expressão proteica nesse modelo celular, após silenciamento de *SP1*, também foi observado por *western blotting*. Os níveis de RNAm e proteicos de *SP1* foram avaliados como controle do silenciamento de *SP1* e os níveis de expressão de *TP53* foram avaliados a fim de determinarmos se o silenciamento de *SP1* poderia acarretar alterações nos níveis de expressão gênica de *TP53* (Figura 4.29).

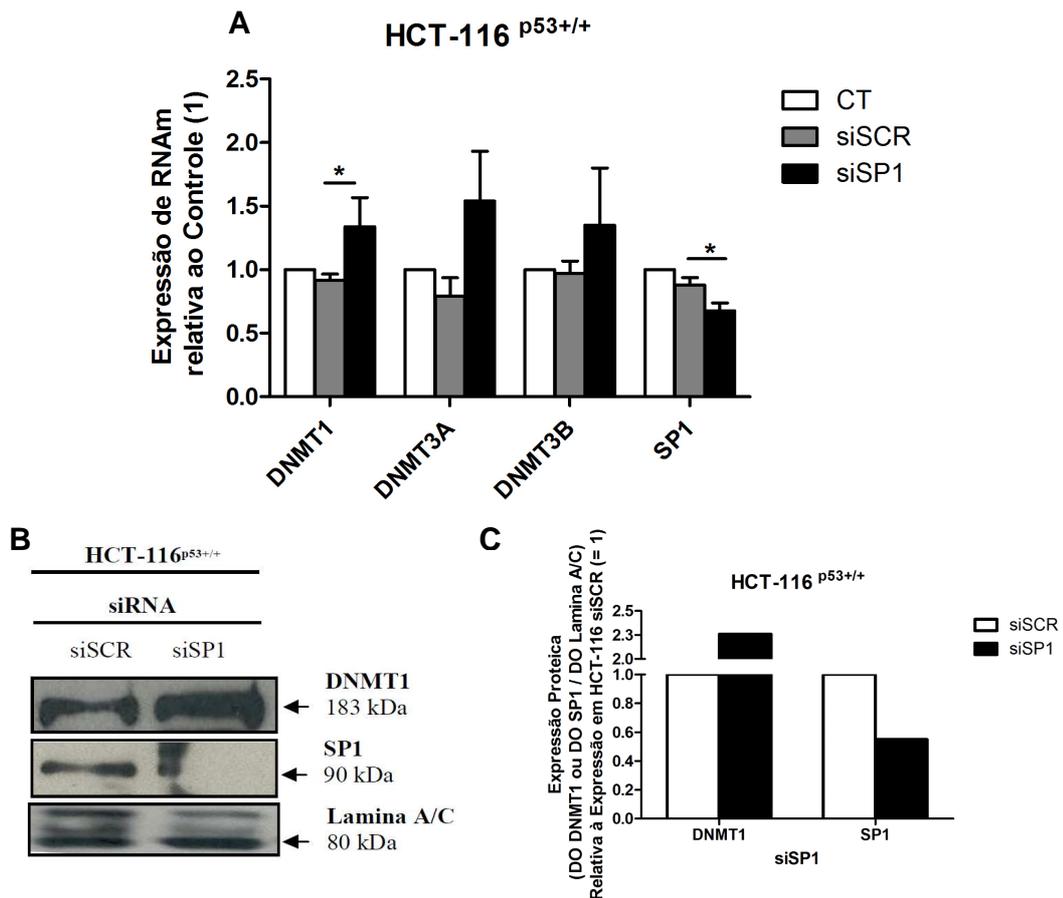


Figura 4.29: Perfil de expressão basal de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e SP1 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116 após transfecção com siSP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e de SP1 nas células HCT-116 transfectadas com siSCR e siSP1, quando comparados aos níveis detectados nas células não transfectadas ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$. (B) Expressão proteica basal de DNMT1, SP1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem HCT-116 após transfecção com siSP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células HCT-116 transfectadas com siSP1, quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o siSCR (=1).

4.2.2.6 Avaliação do efeito da inibição da atividade de SP1 sobre a expressão das DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa

Consecutivamente, com o objetivo de avaliar os efeitos da inibição da atividade de SP1 na expressão das DNMTs em linhagem com TP53 selvagem, a linhagem TE-1 cultivada à 32°C foi submetida a tratamento com Mitramicina A, o inibidor da atividade transcricional de SP1. As concentrações de Mitramicina A utilizadas foram 50 nM, 100

nM e 200 nM, por 24 horas, e, em seguida a expressão gênica e proteica das DNMTs foi avaliada por RT-PCRq e *Western Blotting*, respectivamente. Entretanto, antes de avaliar o efeito do tratamento com a Mitramicina A sobre a expressão das DNMTs, foi avaliado o nível de apoptose nas células por citometria de fluxo, como um controle experimental, após marcação das células com anexina V e iodeto de propídio. Os resultados estão demonstrados na figura 4.30.

TE-1 32°C

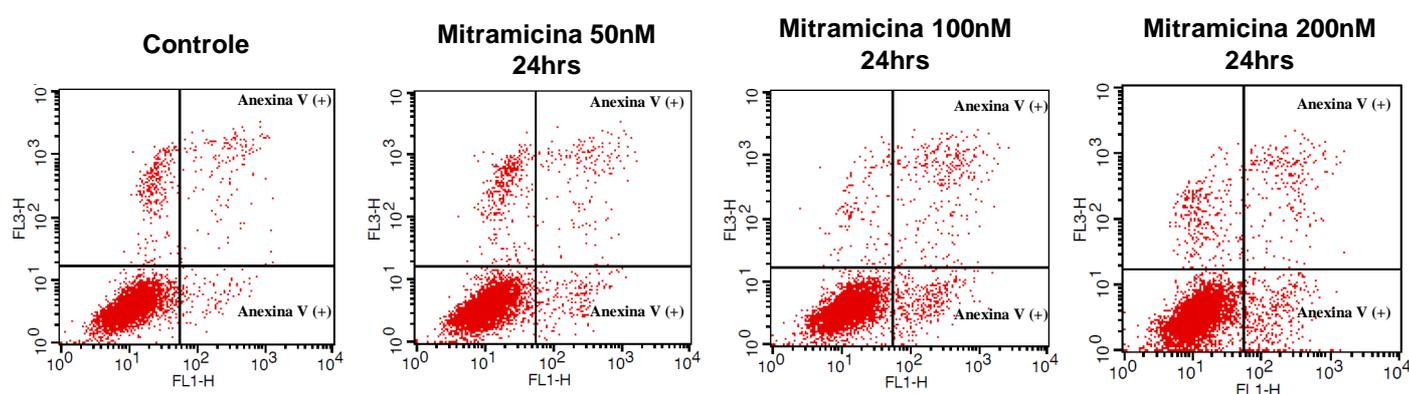


Figura 4.30: Análise do perfil de morte celular por apoptose na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1 cultivada à 32°C após tratamento com Mitramicina A. Dot plot representativo das células anexina V positivas após incubação com Mitramicina A nas concentrações de 50nM, 100nM e 200nM, diluída em meio de cultura RPMI, avaliado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com a Mitramicina A por 24 horas. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com Anexina V; Eixo Y (Detector FL3-H) referente à marcação com Iodeto de Propídio.

A figura 4.31 mostra que, ao contrário do observado após o silenciamento de *SP1*, a inibição da interação de *SP1* com o DNA utilizando 200 nM de Mitramicina A por 24 horas levou a redução de 53% na expressão gênica da *DNMT1* e da *DNMT3A* e 58% na expressão da *DNMT3B* e o aumento de 2,2 vezes na expressão de *TP53*. Os níveis de expressão de *TP53* foram avaliados a fim de determinarmos se a inibição da atividade transcricional poderia acarretar alterações nos níveis seus de expressão gênica. Semelhantemente ao observado nos níveis de expressão gênica, o tratamento com a Mitramicina A foi capaz de levar à redução dos níveis proteicos de *DNMT1*.

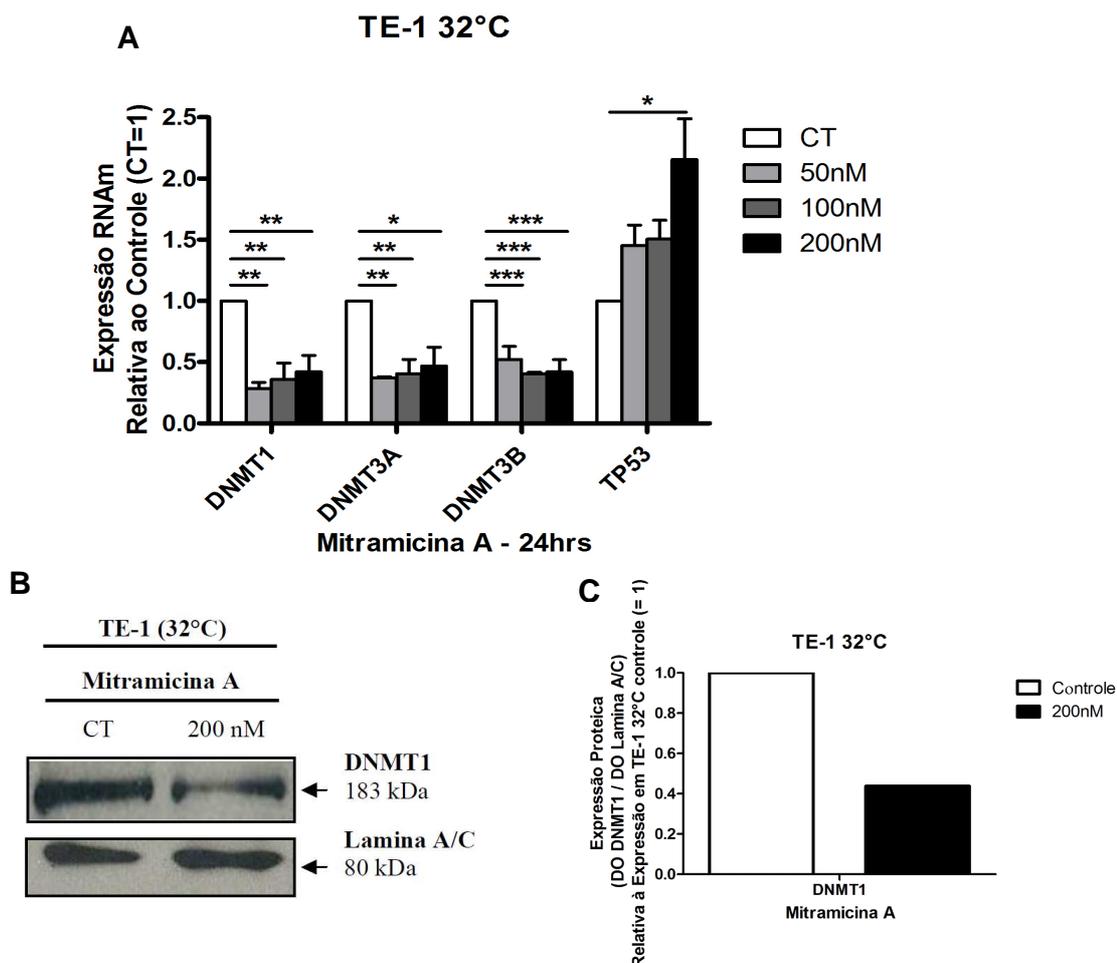


Figura 4.31: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após tratamento com Mitramicina A. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e TP53 nas células TE-1, cultivadas à 32°C, tratadas com Mitramicina A, quando comparados aos níveis detectados nas células não tratadas (Controle) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $<0,05$; ** $<0,01$; *** $p<0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 32°C, após tratamento com Mitramicina A. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivadas à 32°C, tratadas com Mitramicina A, quando comparada à intensidade obtida nas células não tratadas (=1).

Em conjunto, esses últimos dados sugerem que o aumento da expressão de SP1 leva a uma diminuição da expressão de TP53 e, também, das DNMTs. No entanto, a inibição da ligação desse fator de transcrição às suas seqüências consenso no DNA, representada pelo tratamento com Mitramicina A, também resulta na diminuição da expressão gênica das DNMTs.

4.2.3 Avaliação do efeito da modulação da expressão de p53 sobre a expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

Tendo sido demonstrada a modulação diferencial da expressão das DNMTs por SP1 na presença ou ausência de p53 selvagem, partimos para avaliar um possível papel de p53 na regulação da expressão das DNMTs.

4.2.3.1 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de p53 sobre a expressão da DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressa p53 ativa

Com o objetivo de avaliar o efeito da superexpressão de *TP53* sobre a expressão de RNAm e proteína das *DNMTs*, a indução da sua expressão foi realizada, primeiramente, através da transfecção de um vetor de expressão de p53 na linhagem celular TE-13. A avaliação dos níveis de RNAm das *DNMTs*, bem como de *SP1* e *TP53* por RT-PCRq. A superexpressão de *TP53* nesse modelo celular resultou, inicialmente em uma redução dos níveis de expressão das *DNMTs*, entretanto, após a transfecção de 1 µg do vetor de expressão, no aumento de 1,5 vezes na expressão de RNAm da *DNMT1*, 1,8 vezes no aumento da expressão da *DNMT3A* e 1,3 vezes no aumento da expressão da *DNMT3B*. No entanto, após a transfecção de 2 µg do vetor de expressão, os níveis de expressão gênica das *DNMTs* retornaram a níveis de expressão semelhantes ao observado no controle e foi observado uma redução nos níveis de RNAm de *SP1*. Além disso, a transfecção de 2 µg do vetor de expressão de p53 resultou na redução de 25% na expressão de *SP1*. A análise de expressão proteica de DNMT1 também foi realizada após a transfecção de 1 µg do vetor de expressão de p53 nas células TE-13 e a expressão proteica foi avaliada pela técnica de *western blotting*. A expressão proteica da DNMT1 seguiu o mesmo padrão de expressão do RNAm, com um aumento da expressão da proteína DNMT1 após a transfecção do vetor de expressão de p53. Os níveis de RNAm e proteicos de p53 foram avaliados como controle da superexpressão de p53. A avaliação da expressão de *SP1* foi realizada a

fim de avaliarmos se p53 seria capaz de modular os níveis de SP1 presentes na célula (Figura 4.32).

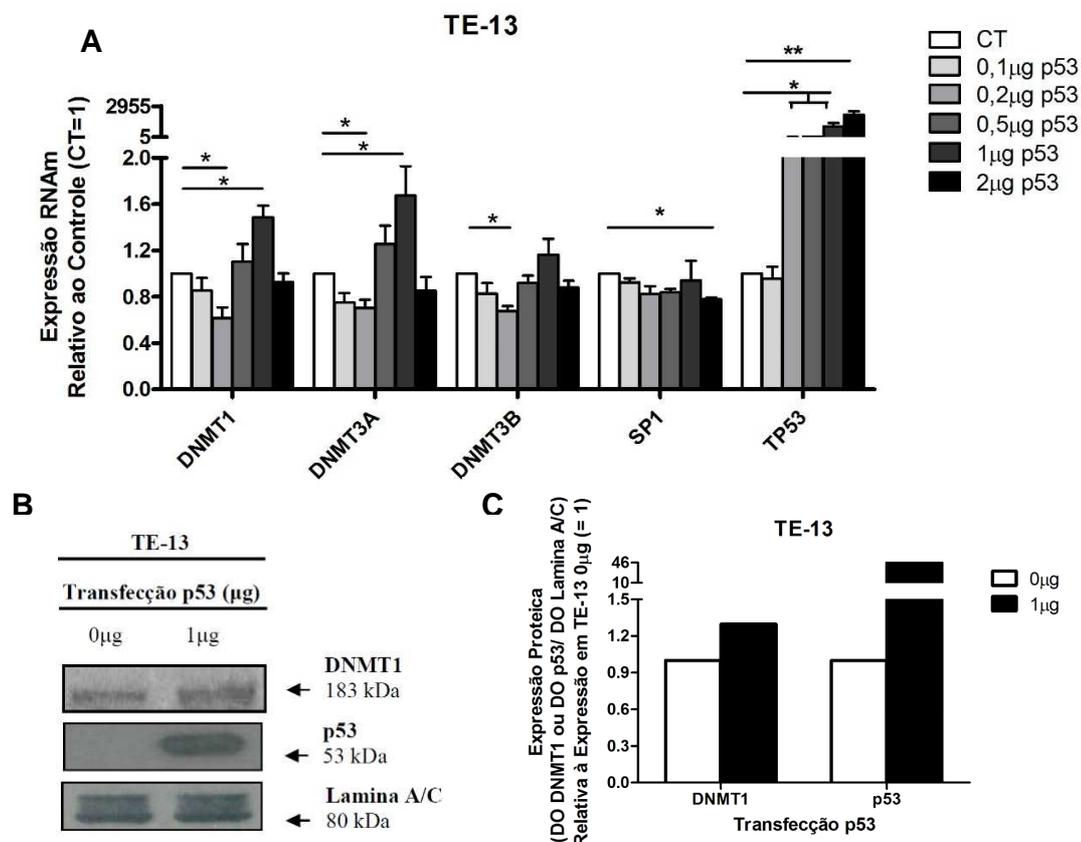


Figura 4.32: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção com vetor de expressão de p53. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* e de *TP53* nas células TE-13 transfectadas com vetor de expressão de p53, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (B) Expressão proteica de DNMT1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-13 após transfecção com vetor de expressão de p53. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e p53, avaliada por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-13 transfectadas com o vetor de expressão de p53 (1 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

4.2.3.2 Avaliação do efeito do aumento dos níveis de p53 sobre a expressão da DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa

A etapa seguinte foi avaliar, então, qual seria o efeito da superexpressão de p53 em uma na linhagem celular que expressa p53 selvagem. O modelo utilizado foram as

células TE-1 cultivadas à 32°C. Essas células foram transfectados 0,05 µg, 0,1 µg, 0,125 µg, 0,15 µg, 0,3 µg e 0,5 µg de vetor de expressão de p53 e observamos que houve um aumento crescente na expressão de RNAm das *DNMTs*, sendo que na maior quantidade de DNA do vetor de expressão transfectada houve o aumento de 1,6 vezes na expressão da *DNMT1*, 1,4 vezes na expressão da *DNMT3A* e 1,6 vezes na expressão da *DNMT3B*, quando aos níveis de RNAm foram avaliados por RT-PCRq. Utilizando o mesmo modelo, a análise de expressão proteica de DNMT1 também foi realizada após a transfecção do vetor de expressão de p53 nas células TE-1 cultivada à 32°C e a expressão proteica foi avaliada pela técnica de *western blotting*. A expressão proteica da DNMT1 seguiu o mesmo padrão de expressão do RNAm, com um aumento da expressão da proteína DNMT1 após a transfecção de 0,15 µg do vetor de expressão de p53. Os níveis de RNAm e proteicos de p53 foram avaliados como controle da superexpressão de p53. A avaliação da expressão de SP1 foi realizada a fim de avaliarmos se p53 seria capaz de modular os níveis de SP1 presentes na célula e nessas condições não houve variação significativa nos níveis de *SP1* após modulação da expressão de p53 (Figura 4.33).

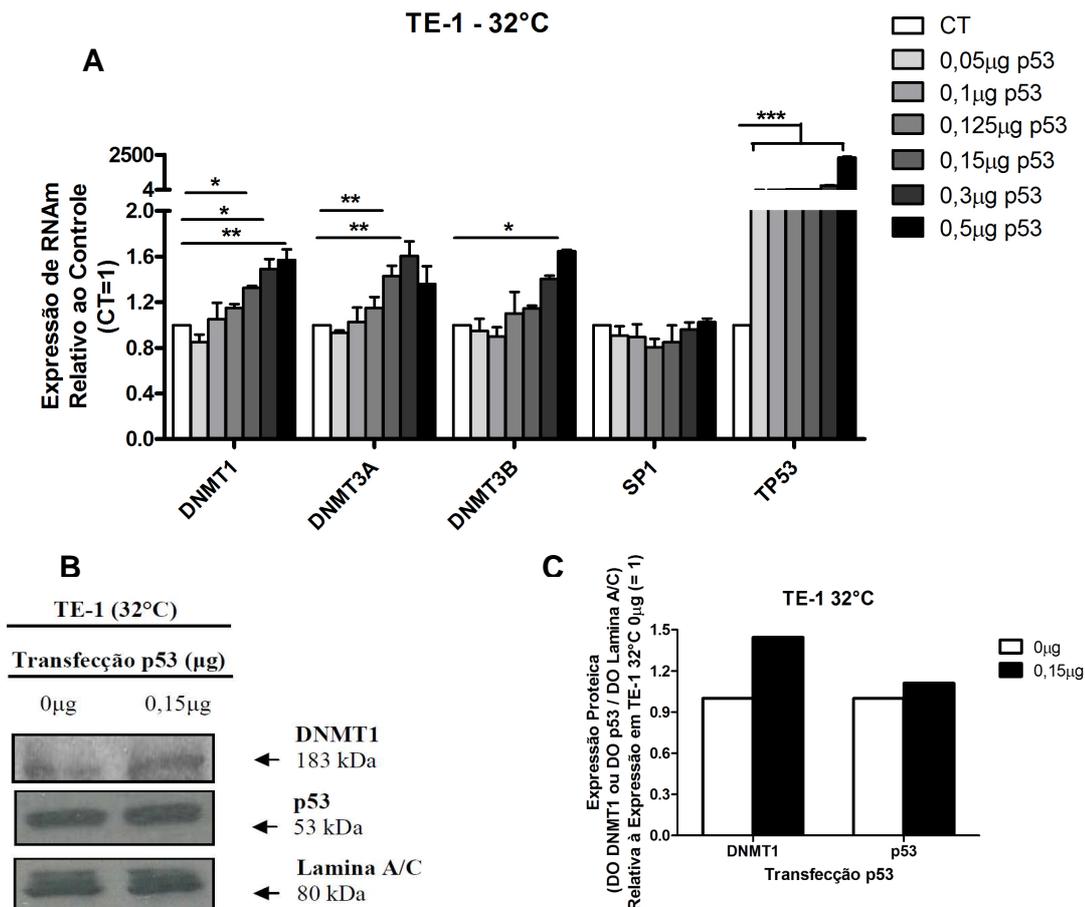


Figura 4.33: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com vetor de expressão de p53. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *SP1* e de *TP53* nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com vetor de expressão de p53, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com vetor de expressão de p53. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e p53, avaliada por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com o vetor de expressão de p53 (0,15 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

Com o objetivo de avaliar se a modulação da expressão das *DNMTs* após o aumento da expressão de *TP53* seria específico do modelo cultivado à 32°C, a transfecção com vetor de expressão de p53 foi realizado também na linhagem celular HCT-116, como um controle experimental, conforme anteriormente explicado. Quantidades crescentes de DNA do vetor de expressão de p53 foram transfectadas nas

células HCT-116 e, após a transfecção de 0,5 µg do vetor de expressão foi observado um aumento de 2,1 vezes na expressão de RNAm da *DNMT1* e 1,5 vezes na expressão da *DNMT3A*. Quando a linhagem foi submetida à transfecção com 1 µg do vetor de expressão para p53, foi observado a redução de 28% na expressão da *DNMT3B* e 41% na expressão de SP1, quando a análise foi feita em relação ao controle. Além disso, a avaliação da expressão proteica após superexpressão de 0,5 µg de p53 foi associado ao aumento da expressão proteica de DNMT1, indo de acordo com os resultados obtidos na análise de expressão gênica (Figura 4.34). Semelhante aos experimentos anteriores, os níveis de RNAm e proteicos de p53 foram avaliados como controle da superexpressão de p53. A avaliação da expressão de SP1 foi realizada a fim de avaliarmos se p53 seria capaz de modular os níveis de SP1 presentes na célula, e nessas condições experimentais, a superexpressão de p53 foi correlacionada com redução na expressão de *SP1*.

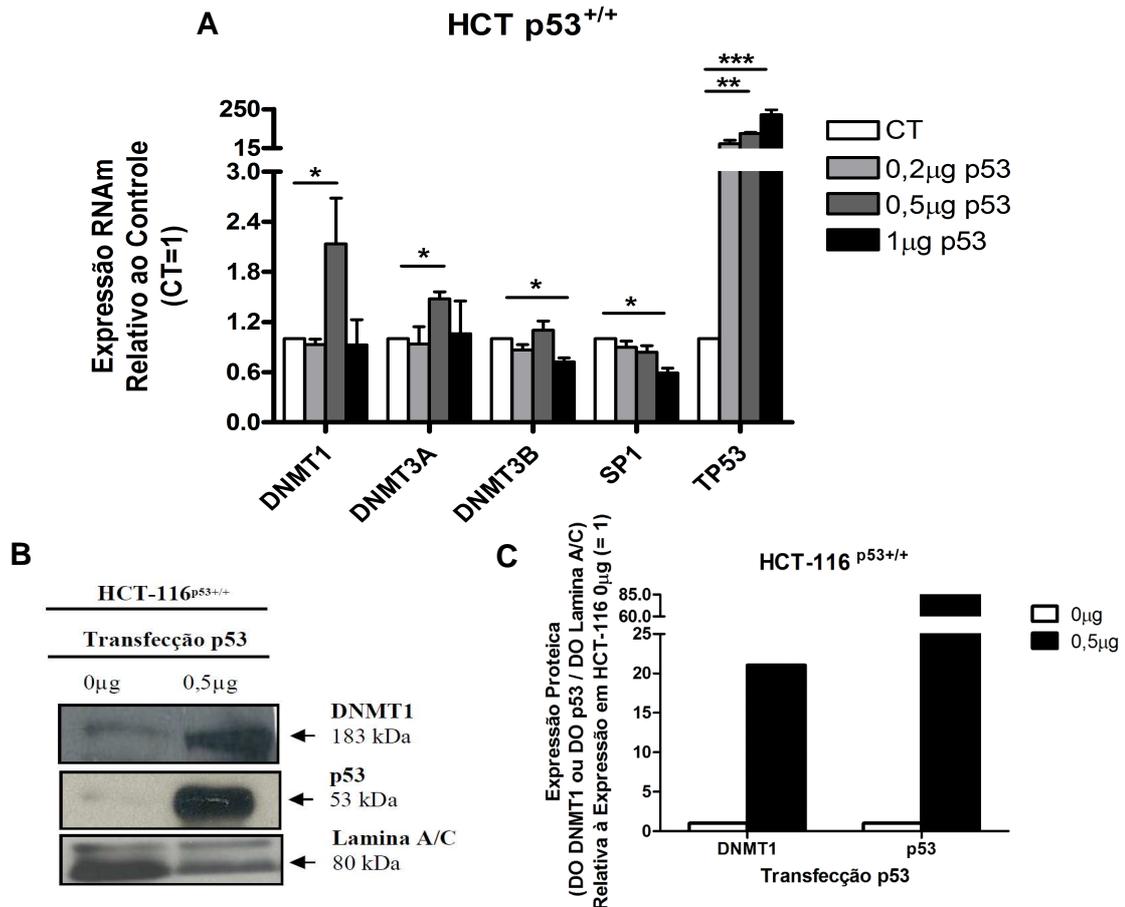


Figura 4.34: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116 após transfecção com vetor de expressão de p53. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *SP1* e de *TP53* nas células HCT-116, transfectadas com vetor de expressão de p53, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem HCT-116, após transfecção com vetor de expressão de p53. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e p53, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células HCT-116 transfectadas com o vetor de expressão de p53 (0,5 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

Ainda com o objetivo de avaliar o efeito do aumento dos níveis de p53 na expressão das DNMTs em linhagens celulares que expressam p53 selvagem, uma outra estratégia experimental foi utilizada. A fim de induzir o aumento de expressão de p53 endogenamente, a linhagem celular TE-1 cultivada à 32°C, foi submetida a tratamento genotóxico com o agente alquilante do DNA metil metano sulfonato (MMS). O tratamento foi realizado adicionando 1mM de MMS por 3h, 6h e 24h ao meio de cultura das células. Para averiguar se o tratamento genotóxico estaria induzido

aumento exacerbado nas taxas de morte celular, foi realizada a análise dos níveis de apoptose após o tratamento nas células através da marcação das mesmas com anexina V e iodeto de propídio e leitura das células marcadas por citometria de fluxo. Os resultados estão demonstrados na figura 4.35.

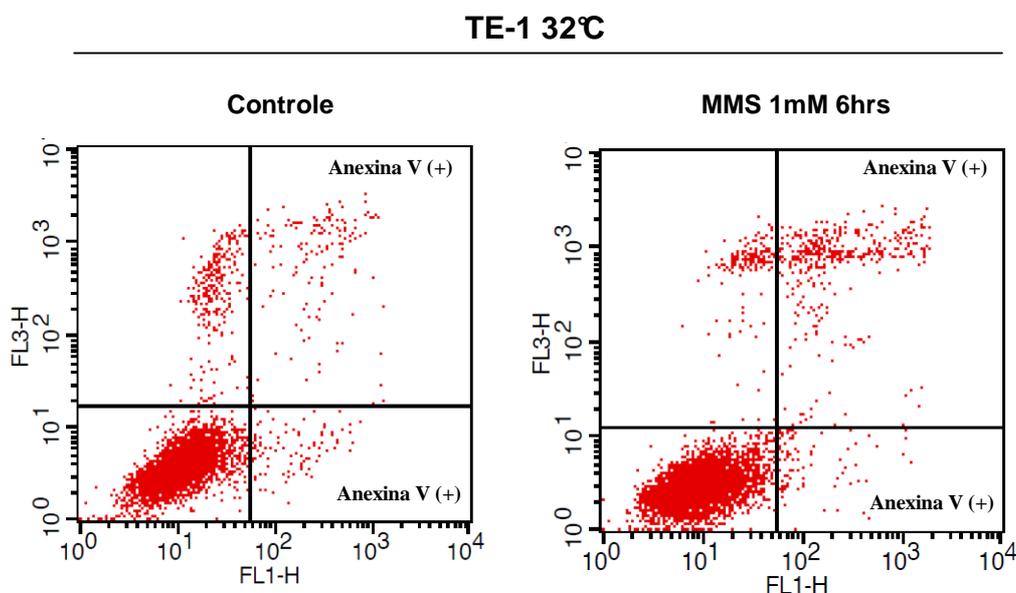


Figura 4.35: Análise do perfil de morte celular por apoptose na linhagem ceular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1 cultivada à 32°C após tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS) 1mM. Dot plot representativo das células anexina V positivas após incubação com MMS 1mM, diluída em meio de cultura RPMI, avaliado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com o MMS por 6 horas. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com Anexina V; Eixo Y (Detector FL3-H) referente à marcação com Iodeto de Propídio.

Após o tratamento com MMS, os níveis de expressão de RNAm e proteína das DNMTs foram avaliados, respectivamente, por RT-PCRq e *western blotting*. Foi observado um aumento de expressão das três *DNMTs* após 6 horas de exposição ao MMS 1mM. Em relação ao controle, foi observado o aumento de 2,4 vezes na expressão da *DNMT1* após 6 horas de tratamento, 2,8 vezes na expressão da *DNMT3A* e 3,5 vezes na expressão da *DNMT3B*, conforme demonstrado na figura 4.34. Além disso, após a análise de expressão proteica foi possível demonstrar o aumento da expressão de DNMT1 após o tratamento desta linhagem com o MMS (Figura 4.36). Os níveis de RNAm e proteicos de p53 foram avaliados como controle experimental, uma vez que a proteína p53 é ativada por estresse genotóxico. Foi observado o aumento de 2,5 vezes na expressão de *TP53* após o tratamento com MMS 1mM. A avaliação da

expressão de SP1 foi realizada a fim de avaliarmos se p53 seria capaz de modular os níveis de SP1 presentes na célula.

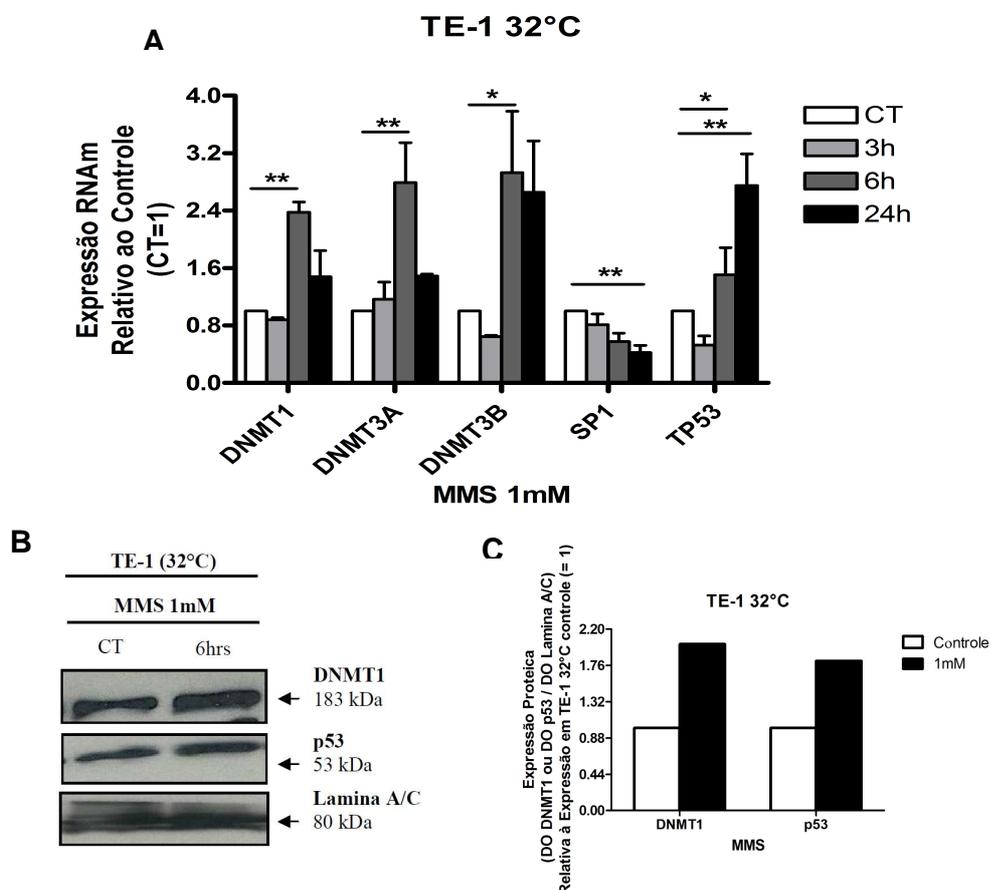


Figura 4.36: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C, após tratamento com Metil Metano Sulfonato (MMS). (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *SP1* e de *TP53* nas células TE-1, cultivada à 32°C, tratadas com MMS 1mM, quando comparados aos níveis detectados nas células não tratadas (Controle) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (B) Expressão proteica de DNMT1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 32°C, após tratamento com MMS 1mM. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e p53, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 32°C, tratadas com MMS 1mM, quando comparada à intensidade obtida nas células não tratadas (Controle) (=1).

4.2.3.3 Avaliação do efeito do silenciamento de *TP53* sobre a expressão das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressa p53 ativa

Com o objetivo de avaliar se o silenciamento do gene *TP53* seria capaz de reverter os efeitos observados com a superexpressão desse gene na expressão das DNMTs, as células TE-1, cultivadas à 32, foram transfectadas com siRNA específico para *TP53* e, em seguida, tiveram seus níveis de RNAm quantificados pela técnica de RT-PCRq. Os níveis de RNAm e proteicos de p53 foram avaliados como controle do silenciamento de p53. A avaliação da expressão de SP1 foi realizada a fim de avaliarmos se p53 seria capaz de modular os níveis de SP1 presentes na célula. Na figura 4.37 está representada a modulação observada na expressão de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* na linhagem TE-1 cultivada à 32°C (p53 selvagem), após o silenciamento de *TP53*. Houve uma diminuição de 53% na expressão da *DNMT1*, 22% na expressão da *DNMT3A* e 25% na expressão da *DNMT3B*. Além disso, a avaliação da expressão proteica por *western blotting* mostrou que o silenciamento de p53 resultou na redução da expressão da DNMT1.

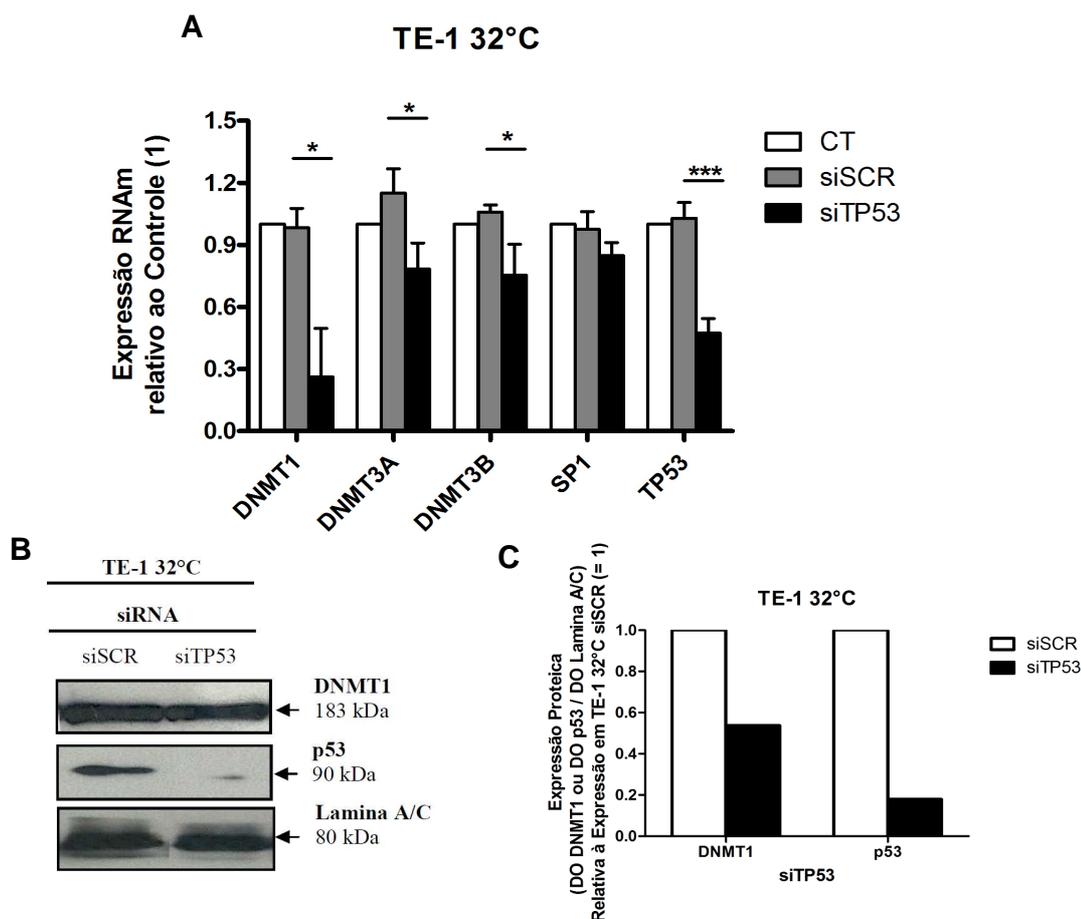


Figura 4.37: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-1, cultivada à 32°C após transfecção com siTP53. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, SP1 e de TP53 nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com siSCR e siTP53, quando comparados aos níveis detectados nas células não transfectadas ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-1, cultivada à 32°C, após transfecção com siTP53. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e p53, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-1, cultivada à 32°C, transfectadas com siTP53, quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o siSCR (=1).

A fim de confirmar os resultados obtidos na linhagem TE-1 cultivada à 32°C, a linhagem HCT-116 foi submetida ao silenciamento de TP53 com a utilização de siRNA específico. Os níveis de RNAm e proteicos de p53 foram avaliados como controle do silenciamento de p53. A avaliação da expressão de SP1 foi realizada a fim de avaliarmos se p53 seria capaz de modular os níveis de SP1 presentes na célula. Os resultados descritos na figura 4.38 mostram que o silenciamento de TP53 nesta

linhagem resultou na redução da expressão gênica e proteica das DNMTs. Foi observado uma redução de 46% na expressão de RNAm da *DNMT1* e uma redução de 20% na expressão de RNAm da *DNMT3B* e o aumento de 1,3 vezes na expressão de *SP1*. Além disso, a análise de expressão proteica de DNMT1, por *western blotting*, demonstrou a redução da expressão desta após o silenciamento de *TP53*.

Esses resultados demonstram que a redução dos níveis de p53 resulta na redução dos níveis das DNMTs, o que comprova os resultados obtidos após a superexpressão de p53.

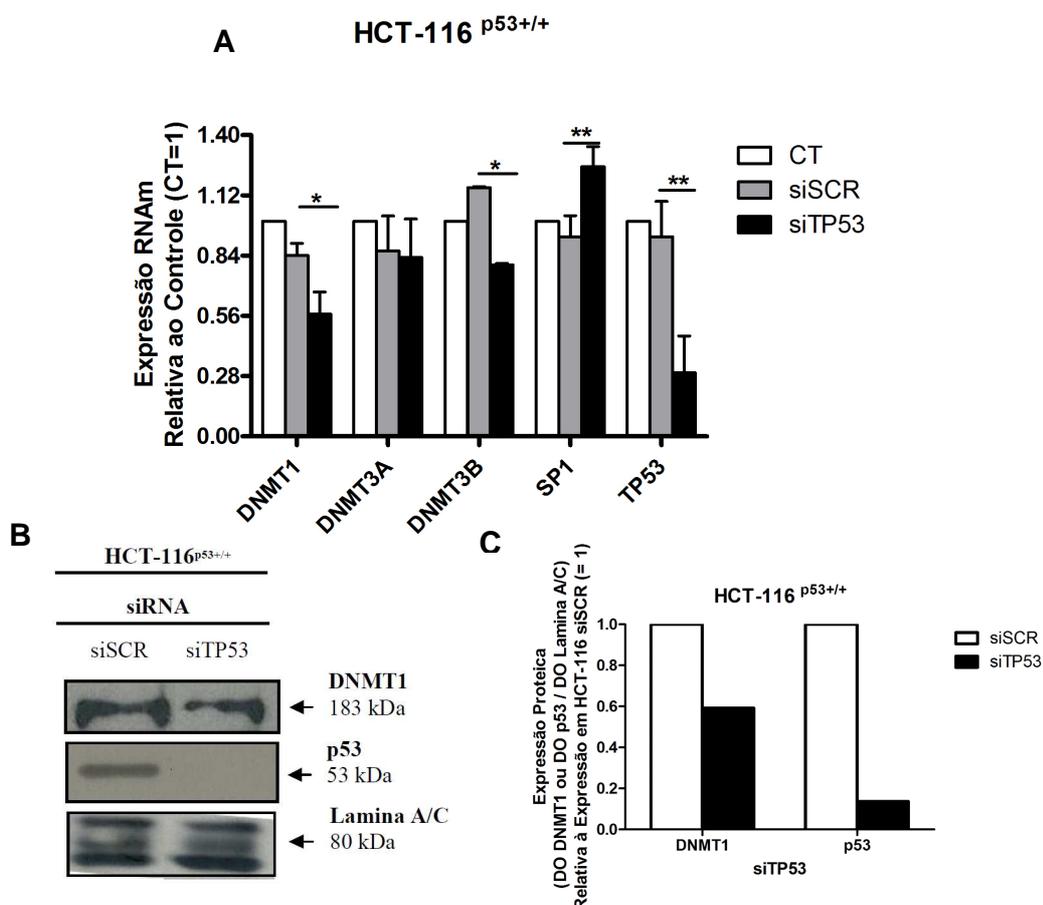


Figura 4.38: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B e p53 na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT-116 após transfecção com siTP53. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *SP1* e de *TP53* nas células HCT-116, transfectadas com siSCR e siTP53, quando comparados aos níveis detectados nas células não transfectadas ($2^{-\Delta\Delta CT}$). *GAPDH* foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (B) Expressão proteica de DNMT1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem HCT-116 após transfecção com siTP53. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1 e p53, avaliada por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células HCT-116 transfectadas com siTP53, quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o siSCR (=1).

4.2.4 Avaliação do efeito da modulação concomitante da expressão de p53 e SP1 sobre a regulação da expressão de DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em linhagem derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

Uma vez que os resultados obtidos até o momento demonstram que há uma interação entre a modulação da expressão de p53 e SP1 nos efeitos observados sobre a expressão das DNMTs, o passo seguinte foi avaliar o efeito do aumento concomitante dos níveis de p53 e SP1 sobre a expressão dessas enzimas. Para isso, a linhagem TE-13, que não expressa p53, foi transfectada com vetor de expressão de p53 e com quantidades crescentes do vetor de expressão de SP1. A avaliação dos níveis de p53 e SP1 foram avaliados como controle experimental. Após a transfecção, os níveis de RNAm das *DNMTs* foram avaliados por RT-PCRq. Foi utilizada uma quantidade fixa de DNA do vetor de expressão de p53 (1 µg) e quantidades crescentes do vetor de expressão de SP1 (0,25 µg e 0,5 µg). A transfecção do vetor de expressão de p53 (CTp53) induziu o aumento de 1,8 vezes na expressão da *DNMT1*, 1,7 vezes na expressão da *DNMT3A* e 2 vezes na expressão da *DNMT3B*. Entretanto, a transfecção concomitante de 1 µg de vetor de expressão de p53 com 0,25 e 0,5 µg do vetor de expressão de SP1 foi capaz de reverter esse fenômeno. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos quando foi avaliado a expressão proteica de DNMT1 (Figura 4.39).

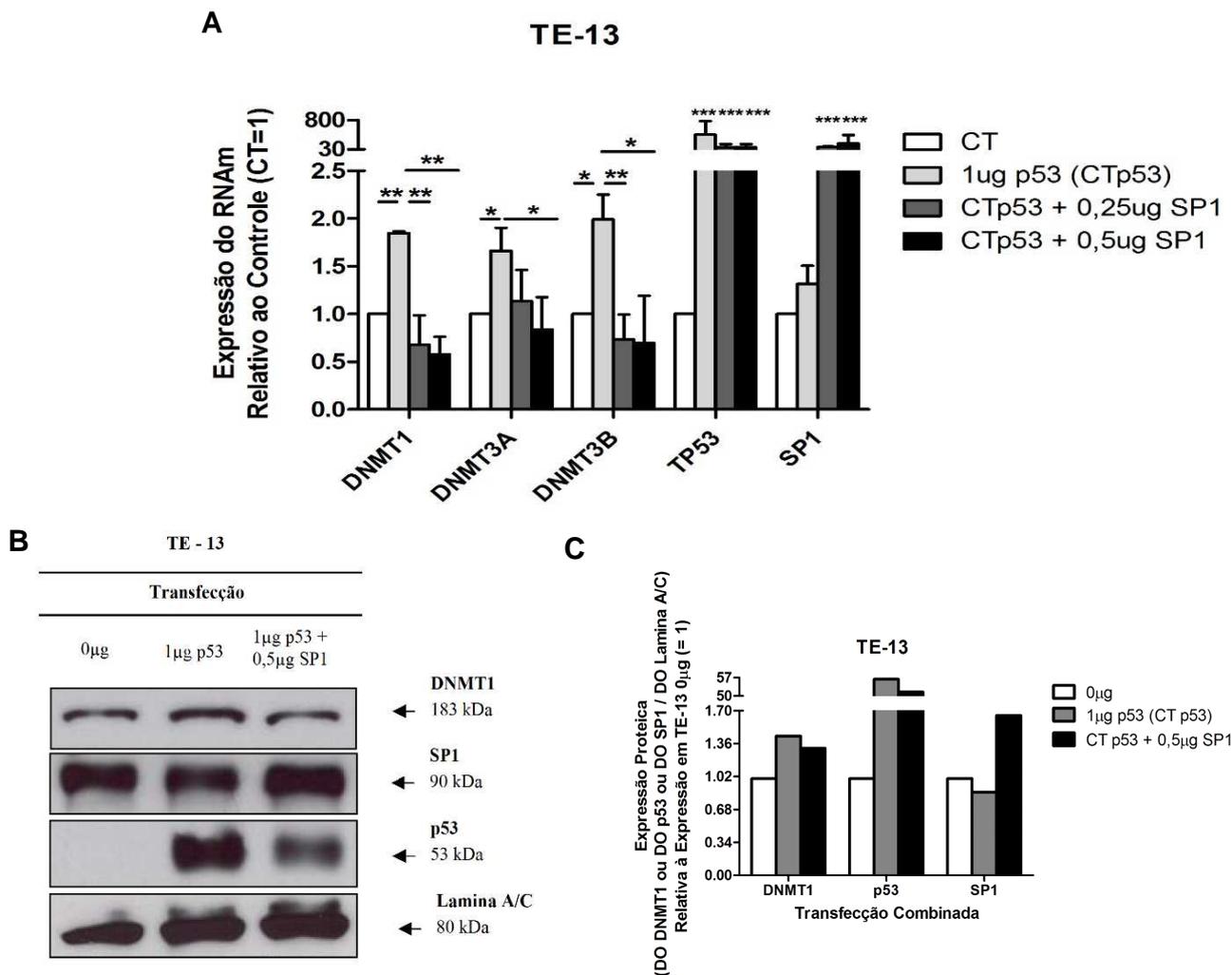


Figura 4.39: Perfil de expressão de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, p53 e SP1 na linhagem celular de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 após transfecção concomitante de vetor de expressão de p53 e SP1. (A) Gráfico representativo dos níveis relativos de expressão de RNAm, avaliado por RT-PCRq, de DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TP53 e de SP1 nas células TE-13 transfectadas com vetor de expressão de p53 e transfectadas com vetor de expressão de p53 e SP1, quando comparados aos níveis detectados nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) ($2^{-\Delta\Delta CT}$). GAPDH foi utilizado como *housekeeping gene*. Gráfico representativo de três experimentos independentes. Teste ANOVA * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (B) Expressão proteica de DNMT1, SP1, p53 e Lamina A/C (controle de carregamento), avaliada por *western blotting* com a utilização de anticorpos específicos, após extração das proteínas da fração nuclear da linhagem TE-13 após transfecção com vetor de expressão de p53 e transfectadas com vetor de expressão de p53 e SP1. (C) Gráfico representativo do cálculo da intensidade das bandas proteicas de DNMT1, p53 e SP1, avaliado por densitometria com a utilização do *software ImageJ* e, normalizado pela intensidade adquirida na densitometria das bandas correspondentes à proteína Lamina A/C, nas células TE-13 transfectadas com o vetor de expressão de p53 (1 µg) e transfectadas com vetor de expressão de p53 (1 µg) e SP1 (0,5 µg), quando comparada à intensidade obtida nas células transfectadas com o vetor vazio (0µg) (=1).

Juntos, esses dados sugerem que p53 e SP1 atuam conjuntamente na regulação da expressão das DNMTs e que os efeitos observados na modulação da expressão do RNAm desses genes estão associados aos níveis de expressão de p53 e de SP1 na

célula. Dessa forma, variações nos níveis dessas proteínas podem desencadear efeitos antagônicos sobre a expressão das *DNMTs*.

4.2.5 Avaliação da interação das proteínas p53 e SP1 com os promotores gênicos de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

Uma vez que os resultados obtidos até o momento apontam para uma possível regulação transcricional das *DNMTs* por SP1 e/ou p53 em CEE, o passo seguinte foi analisar a possível interação desses fatores de transcrição com as regiões promotoras de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*.

4.2.5.1 Avaliação *in silico* da presença de elementos responsivos à p53 e SP1 na região promotora dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*

O primeiro passo foi, então, avaliar se havia regiões consenso para ligação de p53 e SP1 na região promotora dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*. Para isso, foi realizada uma análise *in silico*, com ferramentas de bioinformática. A busca por elementos responsivos para os referidos fatores de transcrição nos promotores das *DNMTs* foi realizada utilizando três diferentes *softwares* de predição (*MatInspector-Genomatix*, *TFBind* e *PROMO*) e foram considerados para as futuras análises os sítios mais prevalentes encontrados. Levando em consideração apenas os elementos que apareciam em, pelo menos dois dos *softwares* utilizados, foram detectados 2 elementos responsivos à p53 e 4 elementos responsivos à SP1 na região promotora de *DNMT1* (Figura 4.40). No promotor de *DNMT3A* foi observado a presença de 2 elementos responsivos à p53 e 1 elemento responsivo à SP1 (Figura 4.41) e na região promotora de *DNMT3B* foi observado a presença de 1 elemento responsivo à p53 e 4 elementos responsivos à SP1 (Figura 4.42). Em seguida, foi avaliado o nível de conservação dos diferentes elementos responsivos à SP1 e p53 no promotor das *DNMTs* em diferentes espécies (*Homo sapiens*, *Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Pongo abelii*, *Macaca mulatta*, *Callithrix jacchus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus* e *Canis familiaris*).

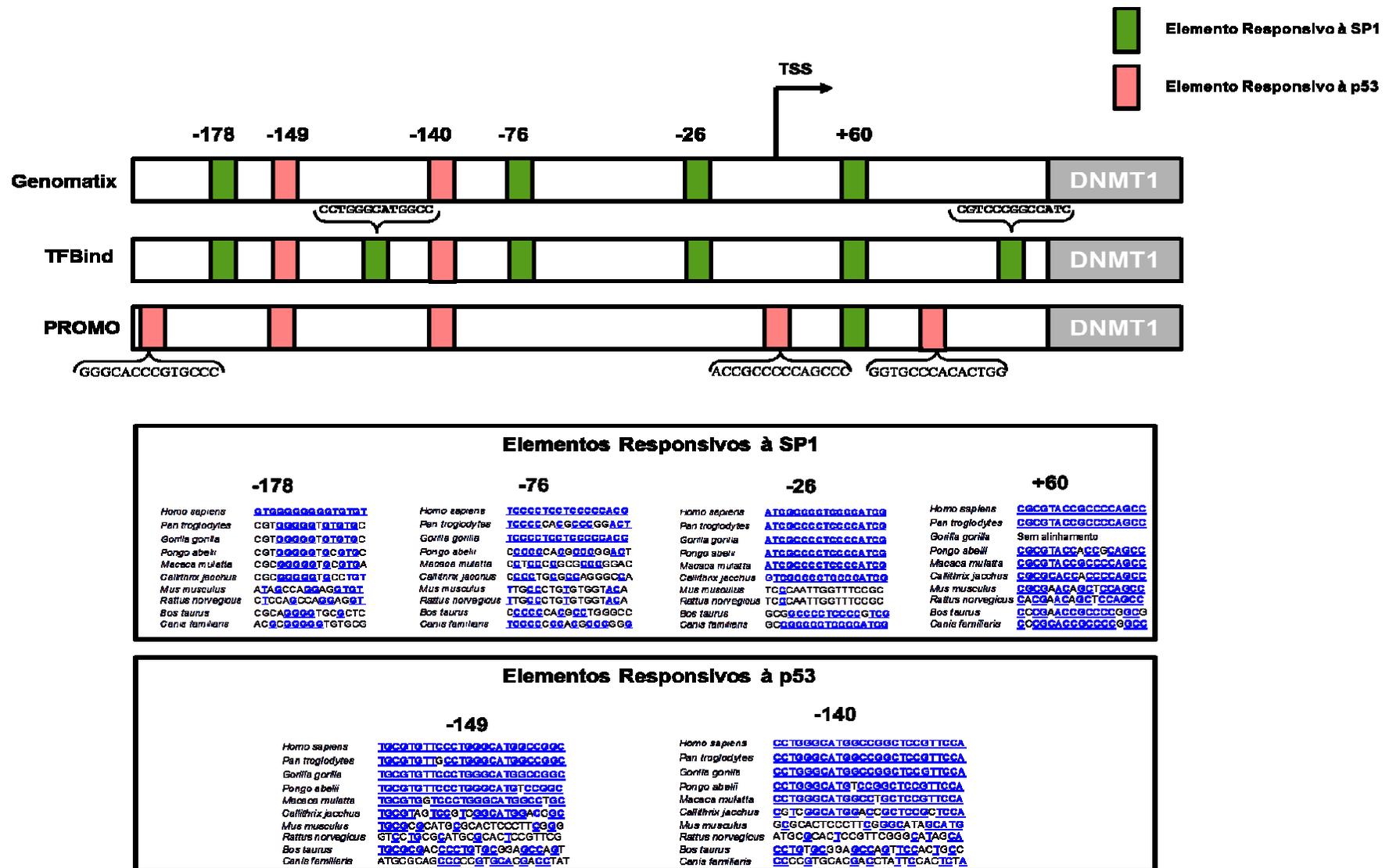
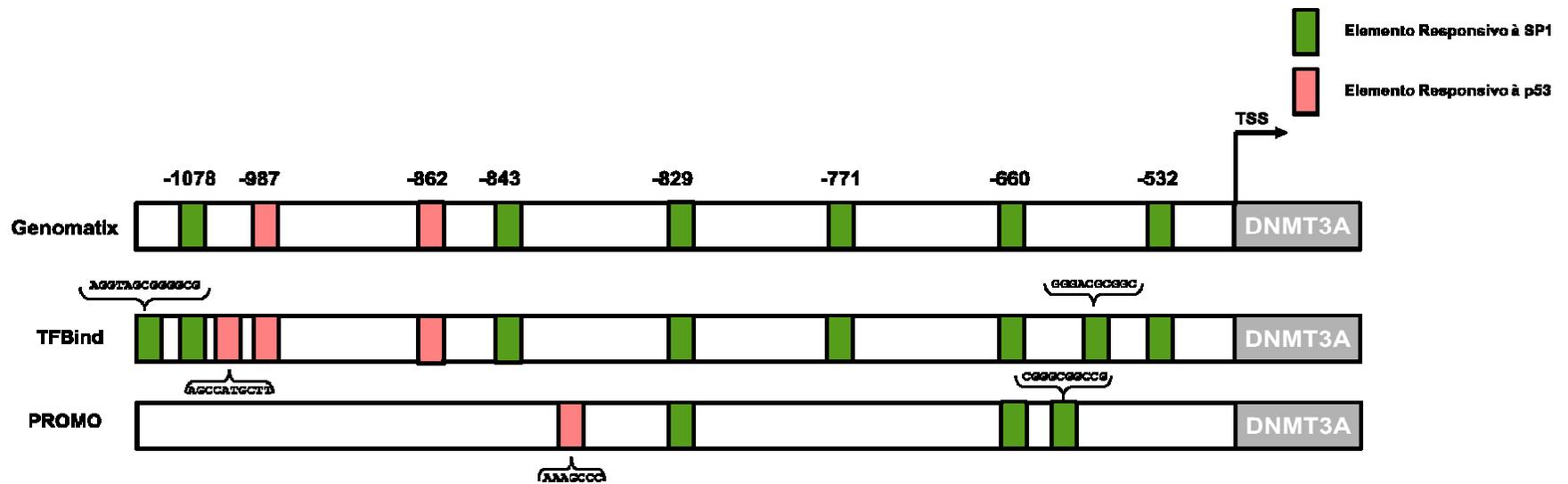


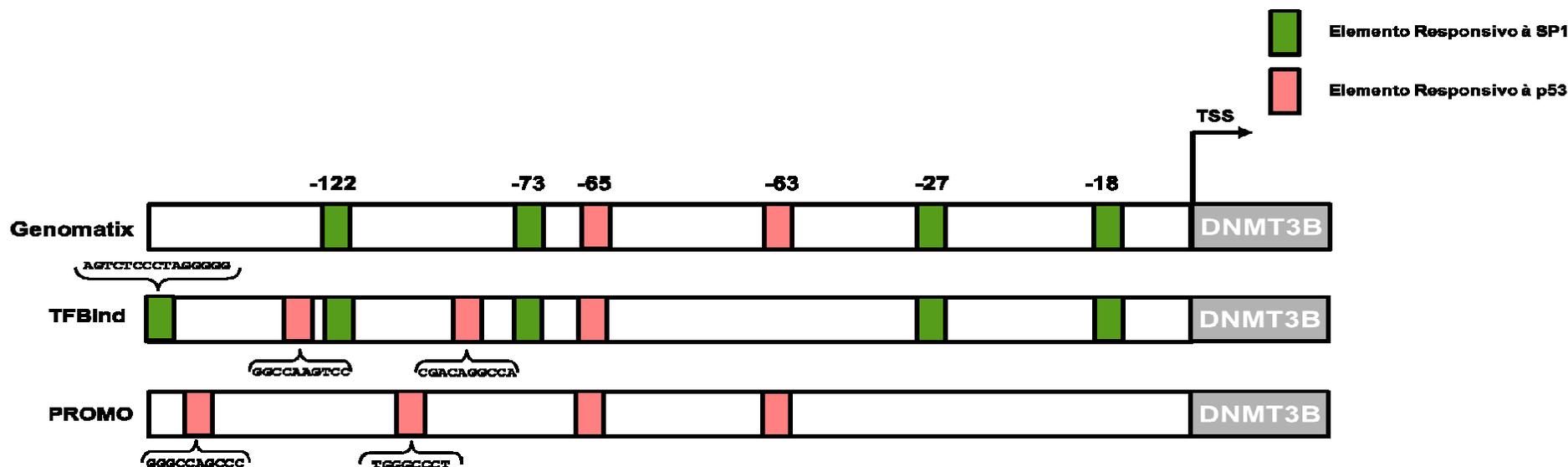
Figura 4.40: Predição dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT1*. Análise de predição dos elementos responsivos à p53 (quadrados rosa) e responsivos à SP1 (quadrados verde) com a utilização dos software *MatInspector-Genomatix*, *TFBind* e *PROMO*. Os elementos responsivos identificados por mais de um software foram avaliados quanto ao nível de conservação em diferentes espécies através de ferramentas de ortologia do *Ensembl*. TSS: Sítio de início da transcrição.



Elementos Responsivos à SP1						
-1078	-843	-829	-771	-660	-532	
<i>Homo sapiens</i> GGCGAGCGGGGGCCG	<i>Homo sapiens</i> GGGGCCCGGGCCGGGT	<i>Homo sapiens</i> GGTCGTGGCGGTCCGG	<i>Homo sapiens</i> CGCCGGGGCGGGGGCCG	<i>Homo sapiens</i> CGCGGGGGCGGGGGCCG	<i>Homo sapiens</i> GAAGCCCGGGCCGGAGG	
<i>Pan troglodytes</i> GGCCGGAAGCCATCCAA	<i>Pan troglodytes</i> GGGGCCCGGGCCGGGT	Sem alinhamento	<i>Pan troglodytes</i> CGCTGTGGCGGGCTA	<i>Pan troglodytes</i> CGCGGGGGCGGGGGCCG	<i>Pan troglodytes</i> GAAGCCCGGGCCGGAGG	
<i>Gorilla gorilla</i> GGCCGAGGGCGGGGGCCG	<i>Gorilla gorilla</i> GGGGCCCGGGCCGGGT	<i>Gorilla gorilla</i> GGTCGGGGCGGGTCCGG	Sem alinhamento	<i>Gorilla gorilla</i> CGCGGGGGCGGGGGCCG	<i>Gorilla gorilla</i> Sem alinhamento	
<i>Pongo abelii</i> Sem alinhamento	<i>Pongo abelii</i> Sem alinhamento	<i>Pongo abelii</i> Sem alinhamento	<i>Pongo abelii</i> Sem alinhamento	<i>Pongo abelii</i> Sem alinhamento	<i>Pongo abelii</i> Sem alinhamento	
<i>Macaca mulatta</i> GGCCGAGGGCGGGGGCCG	<i>Macaca mulatta</i> GGGGCCCGGGCCGGGT	<i>Macaca mulatta</i> GGTCGGGGCGGGTCCGG	<i>Macaca mulatta</i> CGCTGTGGCGGGCTCG	<i>Macaca mulatta</i> GAGGGCGGGCGGGGGCCG	<i>Macaca mulatta</i> GGAGCCCGGGCCGGAGG	
<i>Callithrix jacchus</i> Sem alinhamento	<i>Callithrix jacchus</i> Sem alinhamento	<i>Callithrix jacchus</i> Sem alinhamento	<i>Callithrix jacchus</i> Sem alinhamento	<i>Callithrix jacchus</i> Sem alinhamento	<i>Callithrix jacchus</i> Sem alinhamento	
<i>Mus musculus</i> GGCAGGTGCCCGGCCG	<i>Mus musculus</i> CCGGCCCGAGGCGCGC	<i>Mus musculus</i> AGTCGGGGCGGGCGGG	<i>Mus musculus</i> CGCCGGGGCGGGGGCCG	<i>Mus musculus</i> CGCGGGGGCGGGGGCCG	<i>Mus musculus</i> GAAGCCCGGGCCGGAGG	
<i>Rattus norvegicus</i> Sem alinhamento	<i>Rattus norvegicus</i> Sem alinhamento	<i>Rattus norvegicus</i> Sem alinhamento	<i>Rattus norvegicus</i> Sem alinhamento	<i>Rattus norvegicus</i> Sem alinhamento	<i>Rattus norvegicus</i> Sem alinhamento	
<i>Boe taurus</i> GGCCGAGGGCGGGGTGGC	<i>Boe taurus</i> CGGGCCCGCGAGCGGT	<i>Boe taurus</i> GGTCGGGGCGGGTCCGG	<i>Boe taurus</i> CGCCGGGGCGGGGGCCG	<i>Boe taurus</i> Sem alinhamento	<i>Boe taurus</i> Sem alinhamento	
<i>Canis familiaris</i> GGCCGAGGGCGGGGGCCG	<i>Canis familiaris</i> CAAGCCCGAGCGAGGGT	<i>Canis familiaris</i> GGTCGGGGCGGGTCCGG	<i>Canis familiaris</i> CGCCGGGGCGGGGGCCG	<i>Canis familiaris</i> Sem alinhamento	<i>Canis familiaris</i> Sem alinhamento	

Elementos Responsivos à p53	
-987	-862
<i>Homo sapiens</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Homo sapiens</i> AGAAGTGTACAGCGGACATGTGGTG
<i>Pan troglodytes</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Pan troglodytes</i> AGAAGTGTACAGCGGACATGTGGTG
<i>Gorilla gorilla</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Gorilla gorilla</i> AGAAGTGTACAGCGGACATGTGGTG
<i>Pongo abelii</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Pongo abelii</i> AGAAGTGTACAGCGGACATGTGGTG
<i>Macaca mulatta</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Macaca mulatta</i> AGAAGTGTACAGCGGACATGTGGTG
<i>Callithrix jacchus</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Callithrix jacchus</i> AGAAGTGTACAGCGGACATGTGGTG
<i>Mus musculus</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Mus musculus</i> GGAAGTTAGACGACATGTGGTG
<i>Rattus norvegicus</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Rattus norvegicus</i> GGAAGTTAGACGACATGTGGTG
<i>Boe taurus</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Boe taurus</i> AGAAGTTAGACGACATGTGGTG
<i>Canis familiaris</i> GGAAACAAGTTGGAGACCAGGCCGCA	<i>Canis familiaris</i> AGAAGTTAGACGACATGTGGTG

Figura 4.41: Predição dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT3A*. Análise de predição dos elementos responsivos à p53 (quadrados rosa) e responsivos à SP1 (quadrados verde) com a utilização dos software *MatInspector-Genomatix*, *TFBind* e *PROMO*. Os elementos responsivos identificados por mais de um software foram avaliados quanto ao nível de conservação em diferentes espécies através de ferramentas de ortologia do *Ensembl*. TSS: Sítio de início da transcrição.



Elementos Responsivos à SP1

-122		-73		-27		-18	
<i>Homo sapiens</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Homo sapiens</i>	GGGTRAGRCGRRGCTTG	<i>Homo sapiens</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Homo sapiens</i>	GGAAGGGGTGGGTGGGA
<i>Pan troglodytes</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Pan troglodytes</i>	GGCTGAGCGCGGGCTTG	<i>Pan troglodytes</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Pan troglodytes</i>	GGAAGGGGTGGGTGGTA
<i>Gorilla gorilla</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Gorilla gorilla</i>	Sem alinhamento	<i>Gorilla gorilla</i>	Sem alinhamento	<i>Gorilla gorilla</i>	Sem alinhamento
<i>Pongo abelii</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Pongo abelii</i>	GGGTRAGRCGRRGCTTG	<i>Pongo abelii</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Pongo abelii</i>	GGAAGGGGTGGGTGGGA
<i>Macaca mulatta</i>	AGTAAAGGAGTGAAGCA	<i>Macaca mulatta</i>	GGGTRAGRCGRRGCTTG	<i>Macaca mulatta</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Macaca mulatta</i>	GGAAGGGGTGGGTGGGA
<i>Callithrix jacchus</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Callithrix jacchus</i>	GGGTRAGRCGRRGCTTG	<i>Callithrix jacchus</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Callithrix jacchus</i>	GGAAGGGGTGGGTGGGA
<i>Mus musculus</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Mus musculus</i>	GGCTGGGCTGGGGCTTG	<i>Mus musculus</i>	TTAATGAAATGAAGGGAA	<i>Mus musculus</i>	GAAAGGAAAGAAAGAA
<i>Rattus norvegicus</i>	CTGAGTGGCAGGCCAAG	<i>Rattus norvegicus</i>	GGCTGGGCTGGGGCTTG	<i>Rattus norvegicus</i>	TTAATGAAAGGACAGAGG	<i>Rattus norvegicus</i>	GAAAGGACAGAGGAA
<i>Bos taurus</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Bos taurus</i>	TTAATGGGCGGGCTTG	<i>Bos taurus</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Bos taurus</i>	GGAAGGGGTGGGTGGGA
<i>Canis familiaris</i>	AGGAGGGGAGTGAAGCA	<i>Canis familiaris</i>	GGGTRAGRCGRRGCTTG	<i>Canis familiaris</i>	TTTGGGGGAGGGAGGGGG	<i>Canis familiaris</i>	GGAAGGGGTGGGTGGGA

Elementos Responsivos à p53

-65		-63	
<i>Homo sapiens</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Homo sapiens</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Pan troglodytes</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Pan troglodytes</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Gorilla gorilla</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Gorilla gorilla</i>	Sem alinhamento
<i>Pongo abelii</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Pongo abelii</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Macaca mulatta</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Macaca mulatta</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Callithrix jacchus</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Callithrix jacchus</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Mus musculus</i>	TGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Mus musculus</i>	GTGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Rattus norvegicus</i>	TGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Rattus norvegicus</i>	GTGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Bos taurus</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Bos taurus</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG
<i>Canis familiaris</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG	<i>Canis familiaris</i>	GGGGGCTTGTCCTGCCATGGAGAG

Figura 4.42: Predição dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT3A*. Análise de predição dos elementos responsivos à p53 (quadrados rosa) e responsivos à SP1 (quadrados verde) com a utilização dos software *MatInspector-Genomatix*, *TFBind* e *PROMO*. Os elementos responsivos identificados por mais de um software foram avaliados quanto ao nível de conservação em diferentes espécies através de ferramentas de ortologia do *Ensembl*. TSS: Sítio de início da transcrição.

4.2.5.2 Avaliação da ligação de p53 e SP1 às suas respectivas regiões consenso no promotor da *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

Os efeitos sobre a expressão das DNMTs observados após a modulação de p53 e/ou SP1, junto com a detecção de elementos responsivos a esses fatores de transcrição nos promotores gênicos das *DNMTs* levantou o questionamento se essas proteínas poderiam interagir com a região promotora das *DNMTs*. Para isso foi, inicialmente, realizada a análise *in silico* de dados gerados pela técnica de ChIP-seq e depositados no banco de dados do *SRA-NCBI*, para avaliar se essa interação realmente ocorre. Os experimentos realizados e depositados na base de dados são referentes à imunoprecipitação de p53 na linhagem derivada de carcinoma colorretal HCT-116 após tratamento com radiação ionizante e na linhagem derivada de fibroblastos IMR90 após superexpressão de p53. Além disso, também foram avaliados experimentos referentes à imunoprecipitação de SP1 na linhagem HCT-116. Foram identificados picos significativos ($q\text{-valor} < 0,05$) na região promotora dos genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*, indicando uma interação das proteínas p53 e SP1 com essas regiões. No entanto, não foi observada a interação dessas proteínas com a região promotora da *DNMT3L*. Os resultados da análise estão descritos na figura 4.43, no qual a amplitude dos picos representa quantas vezes a região em questão está enriquecida (*Fold enrichment*) em relação ao controle (DNA não imunoprecipitado). Os picos em vermelho correspondem às sequências enriquecidas após a imunoprecipitação da proteína SP1, enquanto que os picos verdes correspondem às sequências enriquecidas após a imunoprecipitação da proteína p53. Como controle positivo experimental, foi também avaliada a interação das proteínas p53 e SP1 com a região promotora da *TDG*, gene sabidamente regulado por p53 (DA COSTA et al, 2012).

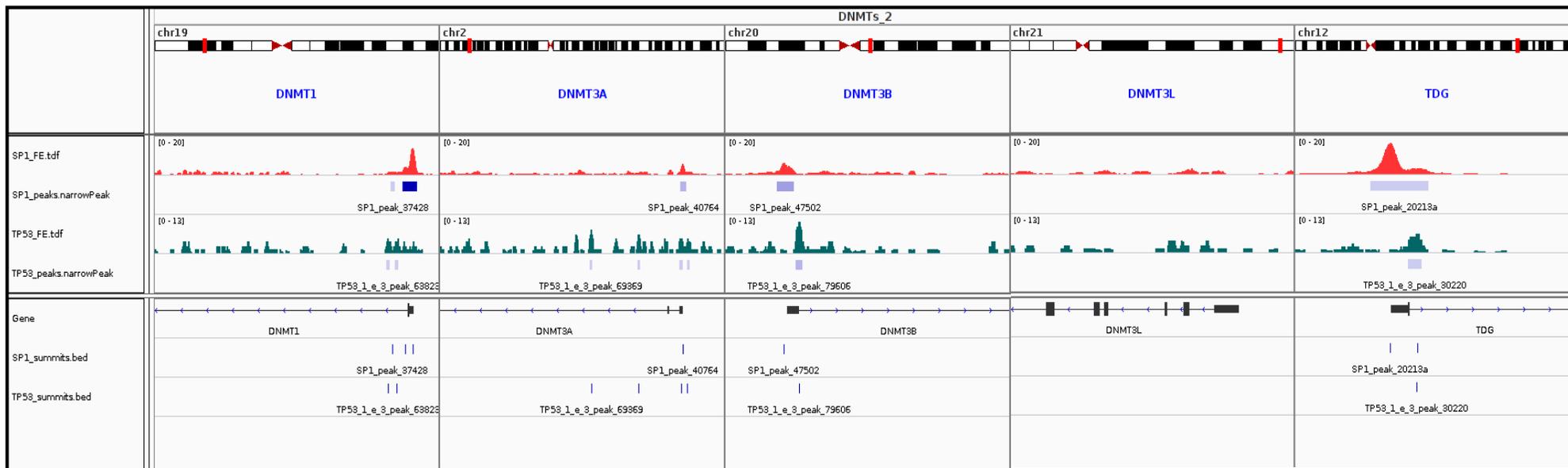


Figura 4.43: Análise *in silico* da interação de SP1 e p53 com a região promotora da *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L* e *TDG*, a partir de dados gerados por *ChIP-seq*. Figura esquemática da visualização dos enriquecimentos em relação ao controle determinados pela técnica de *ChIP-Seq* no programa IGV. Dados oriundos de experimentos de *ChIP-seq* depositados no banco de dados SRA-NCBI. Os picos decorrentes da interação das proteína SP1 e p53 são mostradas como faixas separadas, picos em vermelho e verde, respectivamente, com picos significativos identificados pela ferramenta MACS2 representadas como barras sólidas de intensidade variável da cor azul, de acordo com o aumento da significância estatística, por baixo dos picos identificados. A estrutura da região promotora dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *DNMT3L* e *TDG* é mostrada logo abaixo na faixa nomeada Gene, assim como os picos secundários identificados pelo programa, tanto para SP1, quanto para p53.

Em seguida, partimos para avaliar a interação de p53 e SP1 com a região promotora das *DNMTs*, sob condições experimentais específicas, utilizando a técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChIP). O ensaio de ChIP foi primeiramente realizado na linhagem TE-13 após transfecção ou de unicamente p53 ou de p53 e SP1 concomitantemente. Seguindo a imunoprecipitação realizada com anticorpos específicos para SP1 e p53, foi realizada a amplificação da região promotora de *DNMT1*, a partir do DNA imunoprecipitado, contendo os elementos responsivos à p53 e SP1. A amplificação da região promotora de *DNMT1* a partir do DNA imunoprecipitado significa que houve ligação da proteína utilizada para a imunoprecipitação com o promotor gênico, na condição experimental específica avaliada. A sequencia amplificada denominada região 1 compreende duas sequencias consenso para ligação de p53 (os sítios -149 e -140) e duas sequencias consenso para ligação de SP1 (os sítios -178 e -76) presentes no promotor da *DNMT1* e a sequencia amplificada denominada região 2, compreende apenas sequencias consenso para ligação de SP1 (sítios -26 e +60) presentes no mesmo promotor gênico (Figura 4.44A). Conforme pode ser observado na figura 4.44B, a amplificação da região 1 do promotor de *DNMT1* revelou que, na condição controle, onde não houve indução da expressão de p53 e SP1, a proteína SP1 presente em níveis endógenos foi capaz de interagir com seus elementos responsivos presentes nessa região. Após a indução da expressão de p53, foi detectada também a interação dessa proteína com seus elementos responsivos. Em seguida, após a transfecção concomitante de vetores de expressão para p53 e SP1, continuou havendo a ligação de SP1 aos seus elementos responsivos presentes na região 1 do promotor gênico de *DNMT1*, embora com menor afinidade, fato sugerido pela menor quantidade de DNA amplificado do que a detectada quando p53 foi transfectado sozinho, entretanto, a ligação de p53 parece ser perdida. A amplificação da região 2 do promotor de *DNMT1* apresentou resultados semelhantes aos observados na amplificação 1, no que diz respeito à ligação de SP1 ao promotor gênico em questão, e, conforme esperado devido à ausência de sequencias consenso para ligação de p53, não foi detectada ligação significativa de p53 em nenhuma das condições experimentais. A segunda condição experimental realizada para o ensaio de ChIP foi o tratamento das células TE-1 cultivadas à 32°C (p53 ativa) com o inibidor da atividade transcricional de SP1, mitramicina A. Para isso, as células foram tratadas com a Mitramicina A 100nM por 16 horas. As mesmas regiões 1 e 2 do promotor da *DNMT1* acima citadas, contendo elementos responsivos para

p53 e SP1, foram amplificadas. Os resultados demonstraram que mesmo em níveis endógenos, na condição controle, SP1 foi capaz de se ligar às suas regiões consenso contidas no promotor de *DNMT1*, em ambas as regiões avaliadas, e que o tratamento com mitramicina A foi capaz de desfazer essa ligação. De forma contrária, não foi detectada a ligação de p53 ao promotor de *DNMT1* na região 1, que contem sequencias consenso para sua ligação (Figura 4.44C). Vale ressaltar que o tratamento com a Mitramicina A levou à redução da expressão das DNMTs. Portanto, esses resultados sugerem que a ligação de SP1 ao promotor de *DNMT1* possui um papel fundamental na sua ativação transcricional e no recrutamento de p53 para esse promotor.

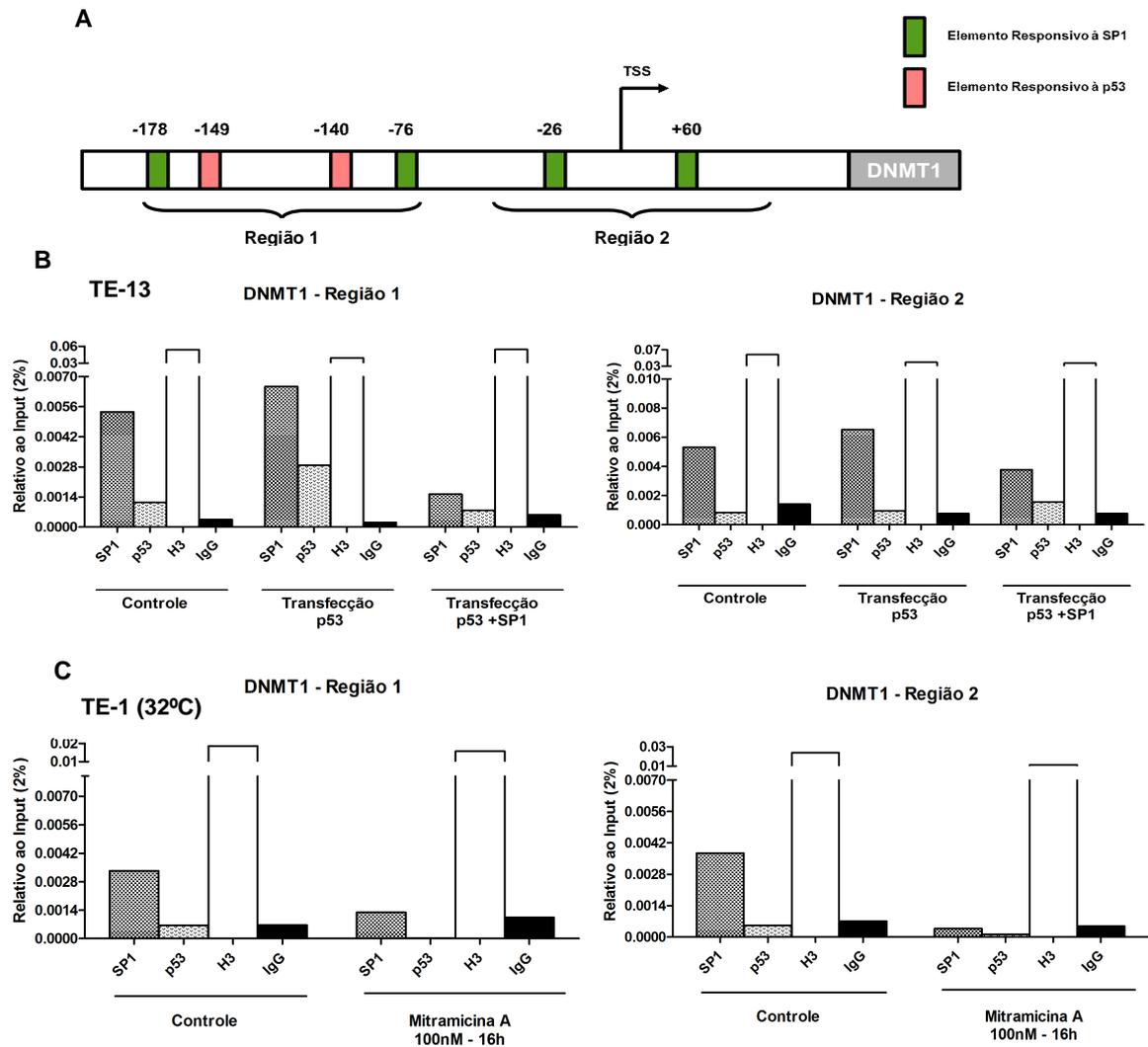


Figura 4.44: Avaliação da ligação de p53 e SP1 na região promotora da *DNMT1* nas linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 32°C. (A) Representação esquemática dos elementos responsivos à p53 e SP1 no promotor da *DNMT1*. A seta preta (TSS) indica o início da transcrição de *DNMT1*. Os elementos de resposta à p53 estão localizados à -149 e -140, enquanto que os elementos de resposta à SP1 estão localizados à -178, -76, -26 e +60 do TSS no promotor da *DNMT1*. (B) Gráfico representativo da amplificação do promotor da *DNMT1*, por PCRq, após transfecção concomitante de p53 (1µg) e SP1 (0,5µg) na linhagem TE-13 e realização de imunoprecipitação da cromatina. A cromatina fragmentada foi imunoprecipitada com anticorpo anti-p53 ou anti-SP1 ou anti-histona H3 (Controle positivo) ou anticorpo IgG (Controle negativo). Após imunoprecipitação de p53 ou SP1, o DNA purificado foi amplificado por PCRq utilizando iniciadores específicos (Região 1 e Região 2) para o promotor de *DNMT1*. Amplificação relativo à 2% do Input. (C) Gráfico representativo da amplificação do promotor da *DNMT1*, por PCRq, após tratamento com 100nM de Mitramicina A por 16 horas na linhagem celular TE-1, cultivada à 32°C, e realização de imunoprecipitação da cromatina. A cromatina fragmentada foi imunoprecipitada com anticorpo anti-p53 ou anti-histona H3 (Controle positivo) ou anticorpo IgG (Controle negativo). Após imunoprecipitação de p53 ou SP1, o DNA purificado foi amplificado por PCRq utilizando iniciadores específicos (Região 1 e Região 2) para o promotor de *DNMT1*. Amplificação relativo à 2% do Input. Input: DNA purificado antes da imunoprecipitação

4.2.6 Avaliação do efeito da modulação da expressão de SP1 e p53 sobre a atividade transcricional do promotor de *DNMT1* em linhagens derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

4.2.6.1 Avaliação do efeito da modulação de SP1 sobre a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa

Para avaliar se os efeitos observados sobre a expressão das DNMTs após a modulação de SP1 também são observados sobre a atividade transcricional de *DNMT1*, essa variável foi avaliada sob diferentes condições experimentais. Inicialmente, foi avaliado o efeito da superexpressão de SP1 sobre a atividade transcricional do promotor de *DNMT1* em linhagens celulares derivadas de CEE que não expressam p53 ativa, as células TE-13 e TE-1 (cultivada à 37°C). Ambas as linhagens foram transfectadas com 1 µg do vetor de expressão de SP1 ou a mesma quantidade do vetor vazio (pN3), como controle da superexpressão de SP1, além de terem sido transfectadas com 0,25 µg do sistema repórter *DNMT1*-luciferase do plasmídeo, e a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* foi mensurada através do ensaio de luciferase. A mesma quantidade do vetor vazio pGL4 (básico) foi utilizada como controle experimental. O sistema repórter *DNMT1*-luciferase contém a sequência completa do promotor de *DNMT1* (nucleotídeos -254 a +317) (LIN *et al*, 2010). A atividade de luciferase dependente do promotor de *DNMT1* foi significativamente induzida, com o aumento de 1,3 vezes e 1,45 vezes nas células TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C, respectivamente, após a transfecção com o vetor de expressão de SP1. Esses resultados foram de encontro aos obtidos nas análises de expressão das DNMTs após superexpressão de SP1 (Figura 4.45).

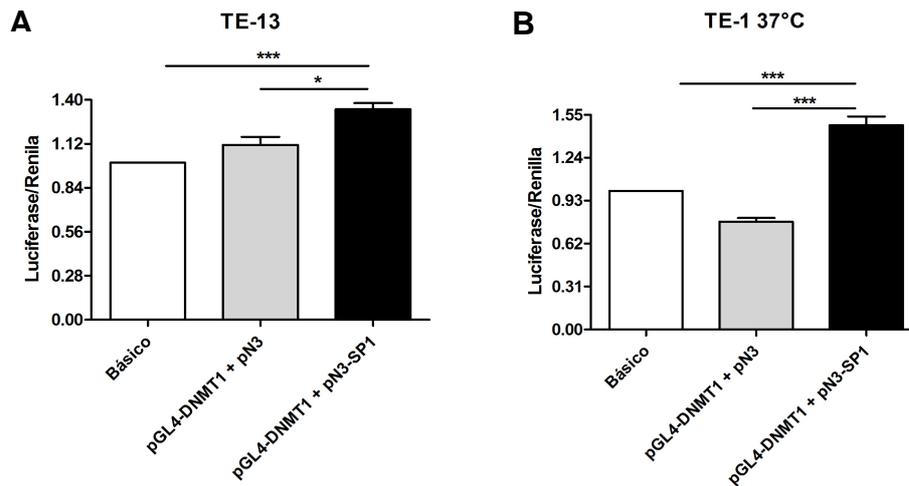


Figura 4.45: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão de SP1 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13 e TE-1, cultivada à 37°C.** Gráficos representativos da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* nas células TE-13 (A) e TE-1, cultivada à 37°C (B) após transfecção com 1 µg do vetor de expressão de SP1 (pN3-SP1) ou 1 µg do plasmídeo vazio (pN3), utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Em seguida, foi avaliado se o silenciamento de SP1 seria capaz de modular a atividade transcricional do promotor de *DNMT1* nas linhagens celulares derivadas de CEE p53-inativo. Para tal, as linhagens celulares foram silenciadas para *SP1*, através da utilização de siRNA específico, e transfectadas com 0,25 µg o sistema repórter DNMT1-luciferase em seguida ou a mesma quantidade do vetor controle pGL4 (básico). Corroborando os resultados obtidos na modulação da expressão das DNMTs, o silenciamento de SP1 foi capaz de reduzir 44% da atividade do promotor da *DNMT1* nas células TE-13 e 40% na linhagem TE-1 cultivada à 37°C (Figura 4.46).

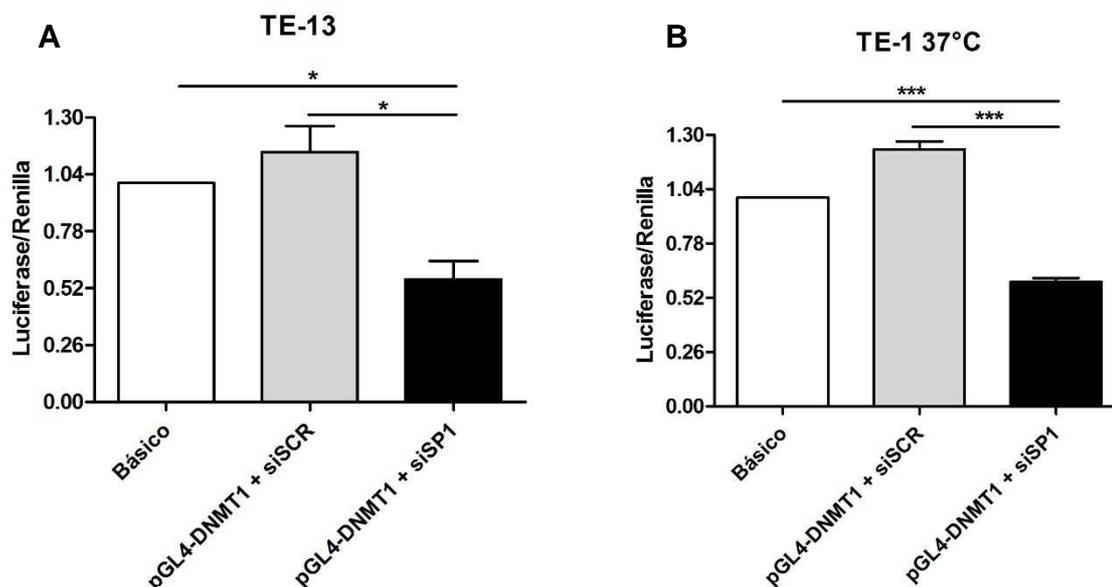


Figura 4.46: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após silenciamento de SP1 nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13 e TE-1, cultivada à 37°C.** Gráficos representativos da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* nas células TE-13 (A) e TE-1, cultivada à 37°C (B) após transfecção com siSP1 ou siSCR, utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.2.6.2 Avaliação do efeito da modulação de SP1 sobre a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressam p53 ativa

Para determinar se o promotor da *DNMT1* poderia ser ativado após a modulação de SP1 em modelos celulares p53-competente, a linhagem TE-1 cultivada à 32°C, foi submetida ao ensaio duplo da luciferase. As células foram submetidas à transfecção de 0,3 µg do vetor de expressão de SP1 ou de vetor vazio (pN3), usado como controle, e 0,25 µg do sistema repórter *DNMT1*-luciferase, contendo a sequência completa do promotor da *DNMT1* (nucleotídeos -254 a +317). A mesma quantidade do vetor vazio pGL4 (Básico) foi utilizada como controle. A atividade de luciferase dependente do promotor de *DNMT1* foi reduzida de forma estatisticamente significativa, em cerca de 15%, como observado nas análises de expressão das DNMTs sob as mesmas condições experimentais (Figura 4.47).

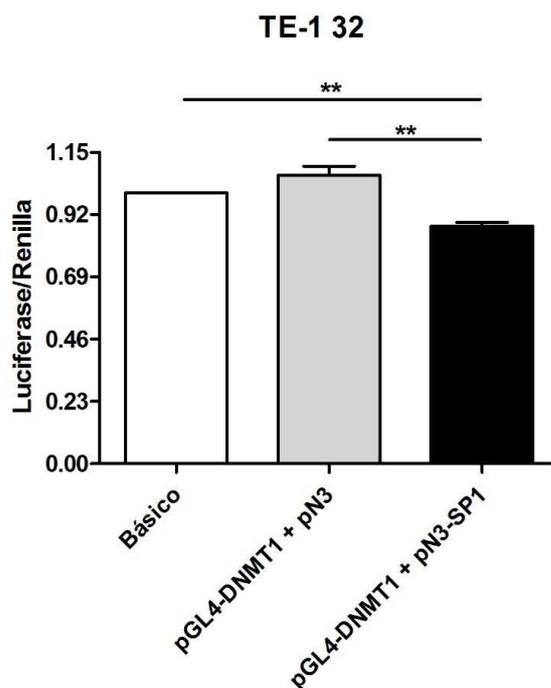


Figura 4.47: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão de SP1 na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1, cultivada à 32°C.** Gráficos representativos da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* na célula TE-1, cultivada à 32°C (B) após transfecção com 0,3 µg do vetor de expressão de SP1 (pN3-SP1) ou 0,3 µg do plasmídeo vazio (pN3), utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA **p<0,01.

Além disso, quando foi realizado o silenciamento de SP1 para avaliação da atividade do promotor de *DNMT1* nas células TE-1 cultivadas à 32°C pelo ensaio duplo de luciferase, foi observado um aumento estatisticamente significativo de 1,3 vezes na atividade do promotor da *DNMT1* (Figura 4.48).

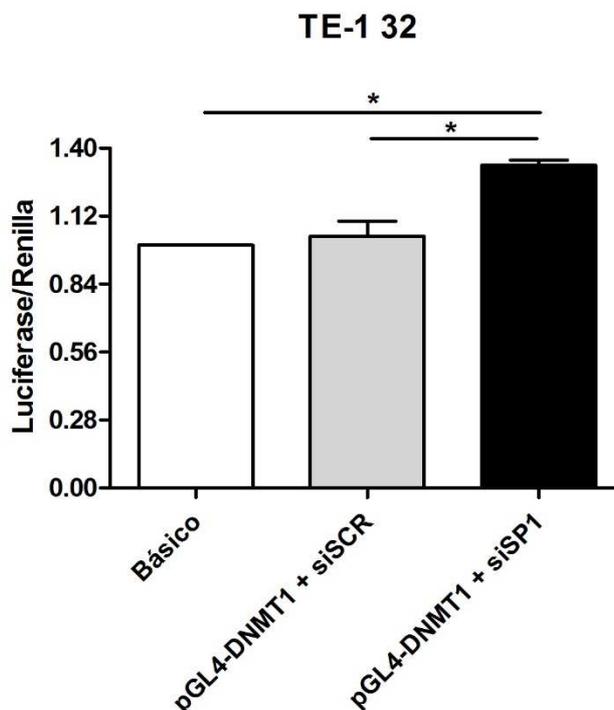


Figura 4.48: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após silenciamento de SP1 nas linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1, cultivada à 32°C.** Gráficos representativos da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* na célula TE-1, cultivada à 32°C (B) após transfecção com siSP1 ou siSCR, utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA * $p < 0,05$.

Portanto, esses resultados demonstram que SP1 é capaz de modular a atividade transcricional de *DNMT1* de forma positiva. No entanto, na presença de p53, essa ativação ocorre de forma oposta, conforme já havia sido anteriormente observado nas análises de expressão das DNMTs.

4.2.6.3 Avaliação do efeito da modulação de p53 sobre a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressam p53 ativa

Para determinar se o promotor da *DNMT1* poderia ser ativado após a modulação de p53, foi realizado o ensaio duplo da luciferase. Para tal, a linhagem TE-13, que não expressa p53, foi submetida à transfecção de quantidades crescentes de vetor de expressão de p53 (1 µg e 2 µg) ou do seu vetor vazio controle (pcDNA3), e de 0,25 µg do sistema repórter DNMT1-luciferase. A mesma quantidade do vetor vazio pGL4 foi transfectada como controle. A atividade da luciferase dependente do promotor de *DNMT1* foi significativamente induzida, com o aumento de 1,3 vezes, após a indução da expressão de p53 alcançada pela

transfecção de 1 µg de seu vetor de expressão. No entanto, o efeito contrário foi observado após a transfecção de 2 µg do vetor de expressão de p53, com a redução da atividade do promotor mensurada em 25%, quando comparado ao controle transfectado com o vetor vazio (pcDNA3) (Figura 4.49).

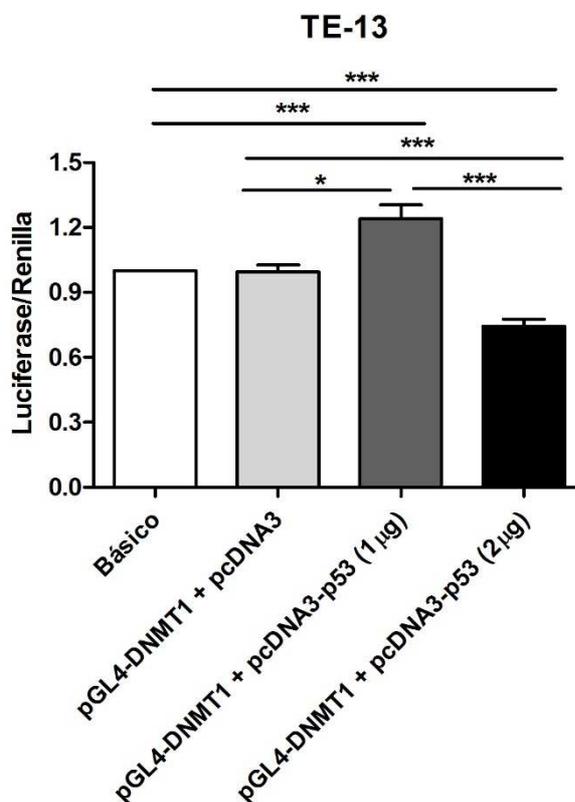


Figura 4.49: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão de p53 na linhagem celular derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13.** Gráficos representativos da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* nas células TE-13 após transfecção com 1 ou 2 µg do vetor de expressão de p53 (pcDNA3-p53) ou 2 µg do plasmídeo vazio (pcDNA3), utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA *p<0,05; ***p<0,001.

4.2.6.4 Avaliação do efeito da modulação de p53 sobre a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que expressam p53 ativa

O passo seguinte foi avaliar o efeito da modulação de p53 em células que expressam p53 selvagem sobre a atividade do promotor de *DNMT1*. Para tal, a linhagem celular TE-1 cultivada à 32°C foi inicialmente transfectada de com 0,5 µg

de vetor de expressão de p53 ou do seu vetor vazio controle (pcDNA3), e com 0,25 µg do sistema repórter DNMT1-luciferase. A mesma quantidade do vetor vazio pGL4 foi transfectada como controle. Foi observado o aumento de 1,3 vezes da atividade de luciferase dirigida pelo promotor de *DNMT1*. De forma contrária, o silenciamento de p53 neste modelo celular foi associado à redução da atividade do promotor da *DNMT1* (Figura 4.50). Esses resultados corroboram os resultados de avaliação da expressão gênica e proteica das DNMTs.

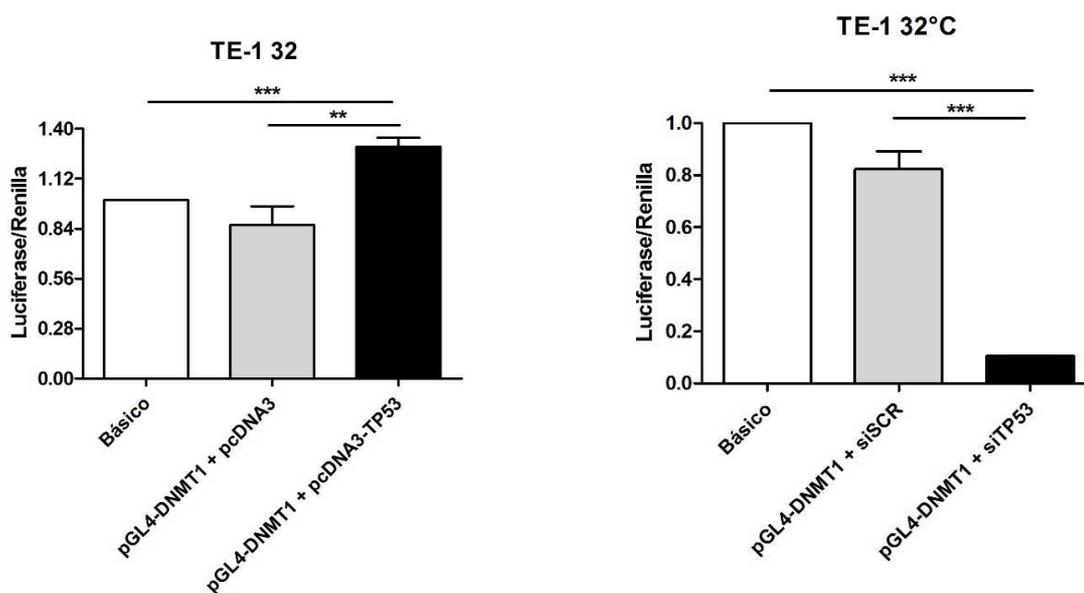


Figura 4.50: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão e silenciamento de p53 na linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago TE-1, cultivada à 32°C.** (A) Gráfico representativo da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* na célula TE-1, cultivada à 32°C (B) após transfecção com 0,5 µg do vetor de expressão de p53 (pcDNA3-p53) ou 0,5 µg do plasmídeo vazio (pcDNA3), utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. (B) Gráfico representativo da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* na célula TE-1, cultivada à 32°C (B) após transfecção com siTP53 ou siSCR, utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repórter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA *p<0,05; ***p<0,001.

4.2.6.5 Avaliação do efeito da modulação conjunta de p53 e SP1 sobre a atividade transcricional do promotor da *DNMT1* em linhagem celular derivada de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que não expressa p53 ativa

Por fim, foi avaliado se a indução da expressão de p53 e SP1 de forma conjunta seria capaz de modular a atividade transcricional do promotor da *DNMT1*. Com esse objetivo, a linhagem celular derivada de CEE TE-13, que não expressa

p53, foi transfectada ou unicamente com vetor de expressão para p53 (1 µg), com este em conjunto com o vetor de expressão de SP1 (0,5 µg) ou com vetor vazio, usado como controle (pcDNA3 e pN3). Além disso, em todas as condições experimentais também foi transfectado 0,25 µg do sistema-repóter DNMT1-luciferase às células. O vetor vazio pGL4 foi utilizado como controle (básico). A transfecção apenas do vetor de expressão de p53 resultou na indução da atividade no promotor da *DNMT1*, corroborando os resultados obtidos anteriormente. No entanto, quando além da indução da expressão de p53, foi realizada a superexpressão de SP1, os níveis de atividade transcricional do promotor de *DNMT1* foram similares aos observados nas células transfectadas com vetor vazio (pcDNA3 e pN3), utilizados como controle (Figura 4.51)

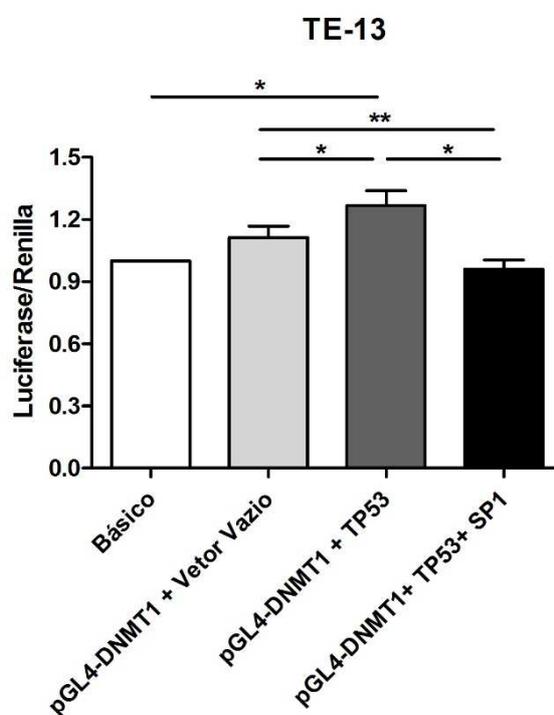


Figura 4.51: **Atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* após superexpressão concomitante de p53 e SP1 na linhagem celular derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago TE-13.** Gráficos representativos da atividade de luciferase dependente do promotor da *DNMT1* nas células TE-13 após transfecção com 1 µg do vetor de expressão de p53 (pcDNA3-p53) ou 1 µg do vetor de expressão de p53 (pcDNA3-p53) e 0,5 µg do vetor de expressão de SP1 (pN3-SP1) ou 1,5 µg do plasmídeo vazio (pcDNA3 e pN3), utilizado como controle, além da transfecção de 0,25 µg do sistema-repóter pGL4-DNMT1-luciferase. Os gráficos são relativos à média de 3 experimentos independentes e os valores são expressos da atividade de luciferase normalizada pela de renila e relativos à amostra controle, transfectada com o plasmídeo controle pGL4 (básico). Teste ANOVA *p<0,05; ***p<0,001.

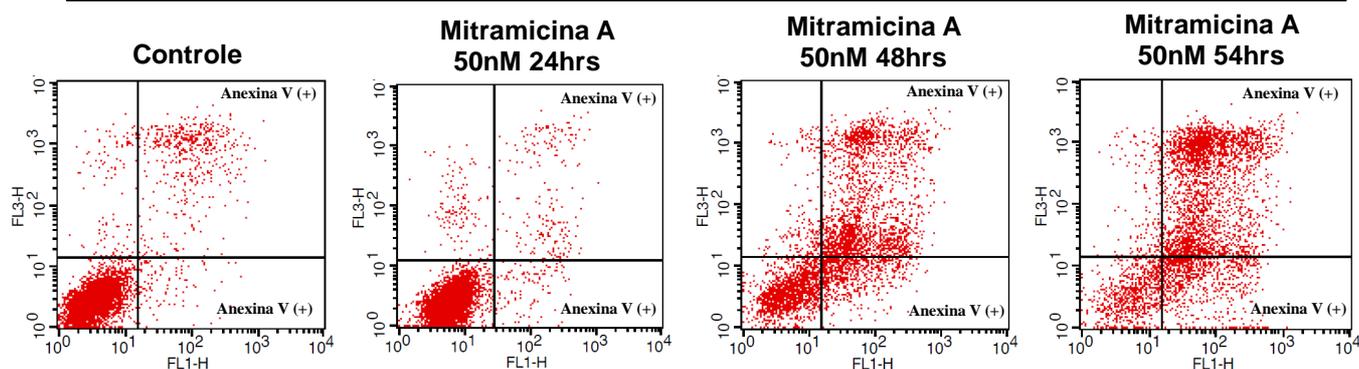
Esses resultados corroboram os resultados obtidos na avaliação da interação das proteínas p53 e SP1 com a região promotora da *DNMT1*, onde foi demonstrado

que, a superexpressão de p53 nesse modelo está associado à ligação de ambas as proteínas na região promotora de *DNMT1*. Entretanto, após a transfecção concomitante do vetor de expressão de p53 e SP1, a proteína p53 não é mais capaz de interagir com o promotor da *DNMT1*, enquanto que, a proteína SP1 perde a afinidade pelo promotor da *DNMT1* nos elementos responsivos -178 e -76. Por fim, esses resultados também vão de encontro aos resultados obtidos na análise da expressão gênica e proteica das DNMTs após superexpressão concomitante de p53 e SP1 em linhagem de CEE.

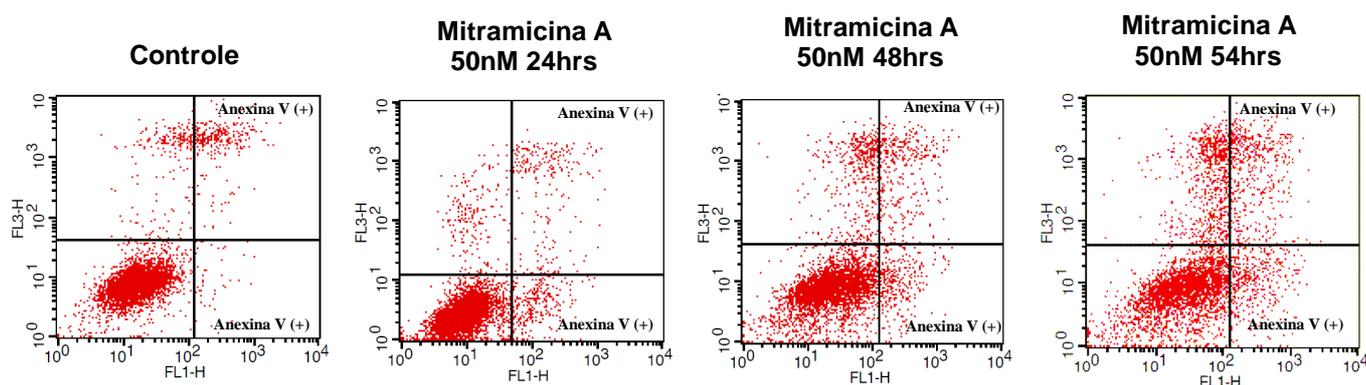
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE DNMT1, DNMT3A E DNMT3B SOBRE OS NÍVEIS DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA EM LINHAGENS CELULARES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO (CEE)

Com o objetivo de avaliar o efeito fenotípico acarretado pela diminuição da expressão das DNMTs avaliadas nos níveis de metilação global em CEE, as linhagens celulares TE-13 e TE-1, cultivadas à 32 e 37°C foram submetidas ao tratamento com Mitramicina A na concentração de 50nM por 24, 48 e 54 horas e os níveis de metilação global foram analisados através de pirosequenciamento de LINE-1. Para isso, foi avaliado o percentual de metilação em 2 ilhas CpG presentes na sequencia retrotransponível LINE-1. Vale lembrar que a Mitramicina A é um inibidor da atividade transcricional de SP1 e que o tratamento das células TE-13 e TE-1 (32° e 37°C) com esse composto resultou na redução significativa da expressão das DNMTs avaliadas (resultados anteriormente apresentados). Considerando a toxicidade do tratamento, como um controle, as células tratadas foram marcadas com anexina V e iodeto de propídio, e a leitura realizada por citometria de fluxo, para a avaliação das taxas de apoptose das células após o tratamento. A figura 4.52 descreve os resultados obtidos nessa análise, onde foi possível determinar que 8,9% das células TE-13 estavam em apoptose inicial, tardia ou necrose em 24h de tratamento, 68,5% após 48 horas de tratamento e 83% após 54 horas de tratamento. Para a linhagem celular TE-1 cultivada à 37°C, a porcentagem de células em apoptose inicial, tardia ou necrose foi de 13,9% em 24 horas de tratamento, 23,3% em 48 horas de tratamento e 35% em 54 horas de tratamento. Por fim, para a linhagem celular TE-1 foi cultivada à 32°C, a porcentagem de células em apoptose inicial, tardia ou necrose foi de 14,2% em 24 horas de tratamento, 16% em 48 horas de tratamento e 19% 54 horas de tratamento (Figura 4.52).

TE-13



TE-1 37°C



TE-1 32°C

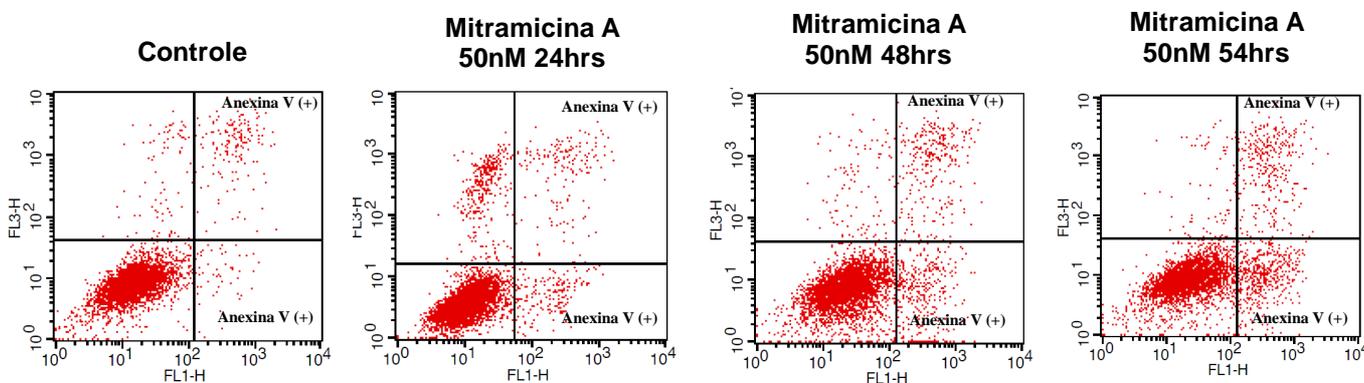


Figura 4.52: Análise do perfil de morte celular por apoptose nas linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) TE-13 e TE-1 cultivada à 37°C e 32°C após tratamento com Mitramicina A. Dot plot representativo das células anexina V positivas após incubação com Mitramicina A na concentração de 50nM, diluída em meio de cultura RPMI, avaliado por citometria de fluxo. As células foram incubadas com a Mitramicina A por 24, 48 e 54 horas. Eixo X (Detector FL1-H) referente à marcação com Anexina V; Eixo Y (Detector FL3-H) referente à marcação com Iodeto de Propídio.

Após 54 horas de tratamento com Mitramicina A, foi observada uma redução de cerca de 10% nos níveis de metilação de LINE-1 na linhagem celular TE-13. Para a linhagem TE-1 cultivada à 32°C ou 37°C, a redução no percentual de metilação de LINE-1 foi observada a partir de 48 horas de tratamento (Figura 4.53).

Esses resultados demonstram que a diminuição da expressão e/ou atividade das DNMTs é capaz de impactar nos níveis de metilação global do DNA.

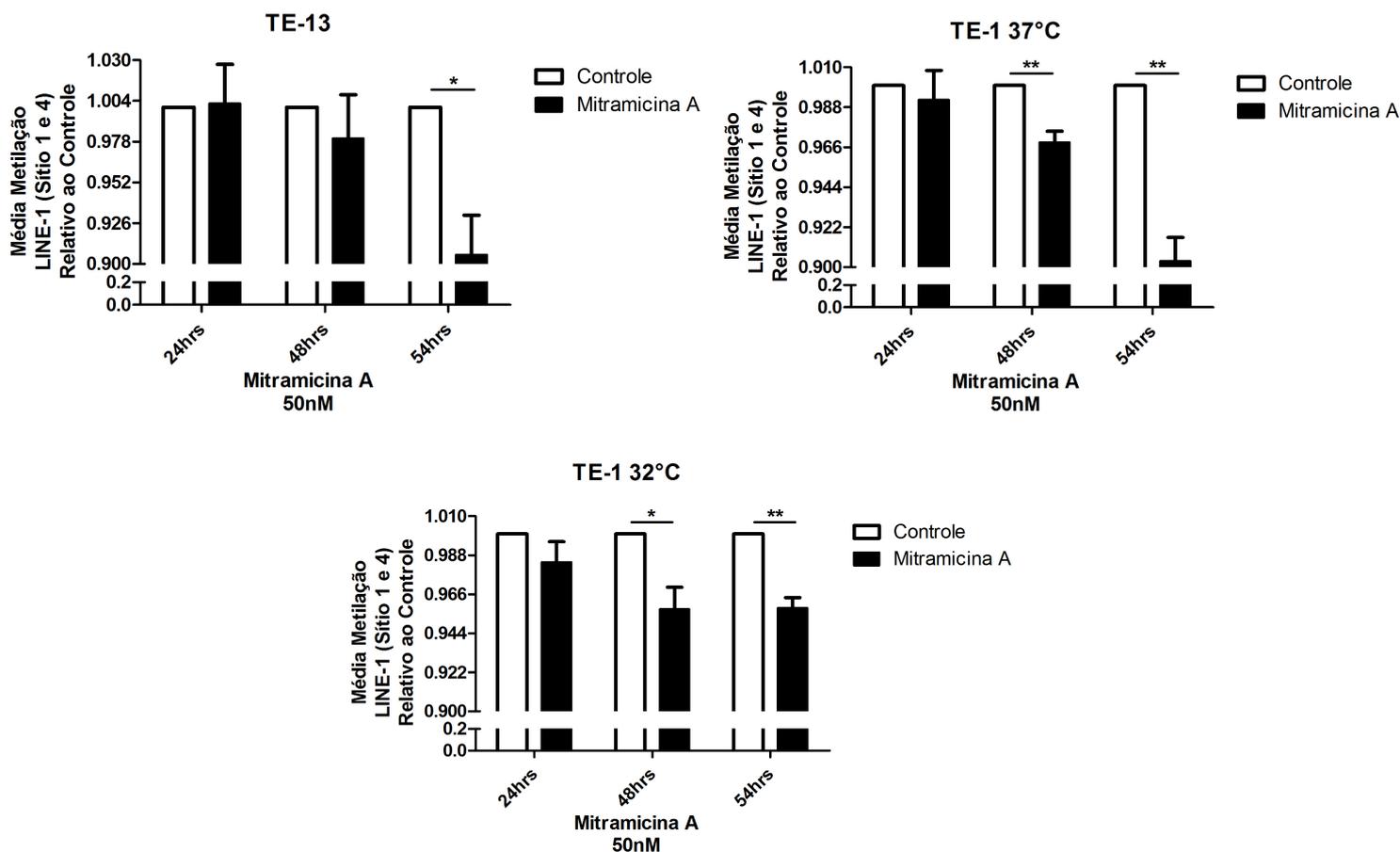


Figura 4.53: Análise do perfil de metilação de LINE-1 em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) tratadas com Mitramicina A. Análise da porcentagem de metilação em LINE-1, nos sítios CpG 1 e 4, avaliada por pirosequenciamento, nas linhagens celulares TE-13 e TE-1 (32°C e 37°C) após tratamento com 50 nM de Mitramicina A, diluída em meio de cultura RPMI. As células foram incubadas com a Mitramicina A por 54 horas. Os gráficos são representativos da média de metilação em LINE-1 nos sítios CpG 1 e 4. A análise da variação de metilação nas células tratadas foi feita em relação às células controle, não tratadas (1). Teste *t Student* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que *DNMT1* e *SP1* encontram-se superexpressos em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) que possuem mutação no gene *TP53*. Além disso, os experimentos realizados em linhagens celulares derivadas de CEE mostraram que *SP1* e *p53* participam da regulação transcricional das *DNMTs*, sendo capazes de se ligar ao promotor dos genes que codificam as *DNMTs* e ativar a transcrição destes. Entretanto, especificidades da interação entre *SP1* e *p53* na regulação transcricional das *DNMTs* podem desencadear efeitos distintos. *SP1* é capaz de transativar a expressão das *DNMTs* independente da presença de *p53*. No entanto, o aumento da expressão de *SP1*, em modelos celulares *p53* ativo, foi associado à redução da expressão de *p53* e das *DNMTs*. A proteína *p53*, por sua vez, pode ativar ou reprimir a expressão das *DNMTs*, e o efeito da interação desta proteína com seus elementos consenso no promotor desses genes é dependente dos níveis disponíveis de *p53* nas células. Além disso, nesse estudo foi observado que a diminuição da expressão das *DNMTs* foi capaz de levar a uma redução dos níveis de metilação global do DNA.

A metilação do DNA é a modificação epigenética mais bem caracterizada em mamíferos (SHARMA *et al* 2010). Em CEE, já foram descritas alterações no padrão de metilação em mucosa histologicamente normal adjacente ao CEE, o que caracteriza a relevância desse fenômeno biológico para a carcinogênese esofágica (LIMA *et al*, 2011). Sabendo que este mecanismo epigenético é diretamente regulado pela *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*, avaliamos o perfil de expressão de RNAm dessas enzimas tanto em amostras de CEE provenientes de pacientes matriculados e tratados no INCA, quanto em amostras de CEE provenientes de pacientes cujos dados de expressão gênica foram depositados no banco de dados do TCGA, de acordo com o status mutacional de *TP53*. Nos dois grupos amostrais foi observado a maior expressão de *DNMT1* em amostras com mutações no gene *TP53*, quando comparado ao grupo de amostras que não possuíam mutação nesse gene. Mutações em *TP53* são as alterações genéticas mais frequentes em CEE e parecem contribuir significativamente para a carcinogênese esofágica (MANDARD *et al*, 2000; GAO, 2014; SONG *et al*, 2014). Dessa forma, vale citar que nas amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA, a mutação em *TP53* foi encontrada em 68,6% dos casos, enquanto que, nas amostras de CEE depositadas no banco

TCGA, a frequência de mutações nesse gene foi de 90,5%. Considerando a análise dos dois grupos amostrais, 81,5% das amostras de CEE possuem mutações em *TP53* e superexpressão da *DNMT1*, quando comparadas a amostras que não possuem *TP53* mutado. Portanto, esses dados reforçam que mutações em *TP53* e superexpressão de *DNMT1* são características prevalentes em CEE. As mutações no gene *TP53* são mais frequentemente encontradas na região que corresponde ao domínio de interação da fosfoproteína codificada por esse gene com o DNA, o que perturba um dos principais mecanismos biológicos pelo qual p53 atua: a transativação de genes (BULLOCK *et al*, 2000; HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000). No entanto, embora a prevalência de mutações em p53 seja bem caracterizada em CEE, os mecanismos pelos quais as mutações nesta proteína contribuem para a desregulação da expressão gênica que são cruciais para o desenvolvimento do CEE ainda são pouco conhecidos. A associação entre mutações em *TP53* e a superexpressão da *DNMT1* sugere que a presença de mutações em *TP53* pode ser um mecanismo crucial no desbalanço da expressão dessas enzimas em CEE.

Esmiuçando as características epidemiológicas dos pacientes com CEE incluídos nesse estudo, observamos que a maior parte possuía menos de 60 anos, era do gênero masculino, tabagista (característica mais prevalente em amostras de CEE de pacientes matriculados no INCA) e etilista (característica mais prevalente em amostras de CEE oriundos do TCGA), demonstrando que os pacientes analisados representam o perfil epidemiológico geralmente detectado para esse tumor. Além disso, considerando a análise feita entre os dados de expressão gênica e os dados clínico-patológicos depositados no banco de dados do TCGA, foi demonstrada a associação entre a maior expressão da *DNMT1* e o tabagismo, sugerindo o papel desta enzima nas etapas iniciais da carcinogênese esofágica, uma vez que o tabagismo é um dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento no CEE (LIJINSKY, 1992; CASTELLSAGUÉ *et al*, 1999 e 2000). Esse tipo de associação já havia sido demonstrado em CEE por Wang e colaboradores. Os autores demonstraram a maior expressão proteica de DNMT1, avaliada por imuno-histoquímica, em amostras oriundas de pacientes tabagistas. Além disso, o tratamento da linhagem celular derivada de células normais do tecido esofágico com NNK (*4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone*), uma nitrosamina presente no tabaco, foi capaz de induzir o aumento da expressão de DNMT1 de maneira dose-dependente. Além disso, o tratamento da linhagem HET-1A resultou no aumento da proliferação celular e redução da apoptose, de maneira

dose dependente, demonstrando o efeito fenotípico da indução da expressão da DNMT1 após o tratamento com NNK (WANG *et al*, 2012). Em câncer de pulmão de não pequenas células, estudos também demonstraram a associação entre a maior expressão de DNMT1 e o tabagismo. Know e colaboradores demonstraram que o hábito de fumar aumentou em 4 vezes a chance de superexpressão de *DNMT1* em adenocarcinoma de pulmão não pequenas células, sugerindo que a superexpressão dessa DNMT possa ser causada pelo hábito de fumar. No entanto, nesse trabalho, não foi avaliado o perfil de expressão da *DNMT1* em tecido adjacente ao tumor (LIN *et al*, 2006; KWON *et al*, 2007).

Quando considerado os dados depositados no TCGA, observamos a maior expressão das *DNMT3A* e *DNMT3B* em tumores pouco diferenciados e em estadiamento mais avançado, respectivamente. O papel das DNMT3A e DNMT3B nas etapas da carcinogênese ainda é pouco conhecido, no entanto, já foi demonstrado a superexpressão dessas enzimas em tumores renais de células claras pouco diferenciados e em estadiamento mais avançados (LI *et al*, 2014). Entretanto, quando foi feita a análise de expressão gênica das *DNMTs* em amostras de pacientes diagnosticadas com CEE e tratados no INCA, foi observado a maior expressão das *DNMTs de novo* em tumores em estadiamentos iniciais. Esse tipo de associação pode ter sido encontrada por um viés de análise uma vez que apenas 11% dos tumores desta casuística pertenciam ao grupo de tumores em estádios iniciais. Além disso, não foi observada nenhuma associação entre a expressão de nenhuma das *DNMTs* e a sobrevida global dos pacientes.

Neste trabalho também foi observada a maior expressão *SP1* em amostras com mutações em *TP53*. Essa análise foi realizada nos mesmos grupos de amostras citados acima. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou essa associação em CEE. A proteína SP1 é superexpressa em uma variedade de tumores humanos e a superexpressão desta proteína tem sido associada a um maior potencial metastático e menor sobrevida dos pacientes (CHIEFARI *et al*, 2002; WANG *et al*, 2003; JIANG *et al*, 2008; GUAN *et al*, 2012; BEISHLINE *et al*, 2015). Além disso, a expressão de SP1 é induzida, em linhagens celulares, após o tratamento destas com extrato do cigarro (DI *et al*, 2012). Esses resultados podem sugerir o papel de SP1 nas etapas iniciais da carcinogênese. No entanto, a atribuição de SP1 nas etapas da carcinogênese esofágica tem sido pouco explorada, e menos ainda a possível participação de *TP53* nesse processo.

Além disso, nossos resultados mostraram a correlação entre as expressões de *SP1* e *DNMT1* nas amostras de CEE avaliadas com mutações em *TP53*. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou essa correlação em CEE. Ademais, de forma similar aos resultados obtidos nesse trabalho, em amostras humanas de carcinoma de pulmão também foi observado a associação entre as expressões proteicas de *DNMT1* e *SP1* (LIN *et al*, 2010). Esses resultados sugerem que *SP1* poderia participar da regulação da expressão das DNMTs, uma vez que, a maior parte das mutações em *TP53* ocorrem no domínio de interação com o DNA e levam à perda da capacidade de transativar genes (BULLOCK *et al*, 2000; HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000). Dessa forma, algum outro fator de transcrição deve participar do aumento da transativação, e consequente expressão, de *DNMT1* observado na presença de *p53* mutada nas amostras de CEE. O papel de *SP1* como regulador transcricional tem sido demonstrado em diferentes condições, como desenvolvimento tumoral. O envolvimento de *SP1* na indução da proliferação celular se dá, por exemplo, pela ativação da transcrição de *IGF1R* (*insulin-like growth factor 1 receptor*). O promotor de *IGF1R* possui 8 elementos de ligação a *SP1*, e esta proteína é essencial para a transcrição gênica de *IGF1R* (ZHUL *et al*, 2000). A expressão de *SP1* também é capaz de modular a expressão da gênica de *hTERT*, gene que codifica a telomerase. Em células normais, há o encurtamento dos telômeros durante a replicação do DNA. Quando os telômeros atingem um tamanho crítico, as células entram em senescência. Em células imortalizadas, os telômeros são mantidos por uma transcriptase reversa chamada telomerase. Muitos tumores superexpressam a telomerase. *SP1* é o regulador transcricional de *hTERT* e, portanto, é essencial para a manutenção do fenótipo replicativo das células tumorais. Wick e colaboradores determinaram que os 5 elementos responsivos à *SP1* no promotor de *hTERT* são responsáveis por mais de 90% da transcrição deste gene quando comparado ao promotor completo (WICK *et al*, 1999). Além disso, a regulação de *hTERT* por *Myc* depende dos elementos responsivos à *SP1* (KYO *et al*, 2000). Também já foi descrito o papel de *SP1* como regulador da expressão gênica das MMPs (*matrix metalloproteinases*). Qin e colaboradores descreveram que *SP1*, em associação com *SP3* e *AP-2*, é capaz de ativar a transcrição gênica de *MMP-2* em linhagens celulares de astrogliomas. Adicionalmente, a transfecção com vetor de expressão de *SP1* na linhagem de *Drosophila* SL-2, que não expressa endogenamente *SP1*, foi associado a uma maior ativação do promotor de *MMP-2*. Portanto, a modulação da expressão de *SP1* é capaz de ativar vias que irão conferir

um maior potencial replicativo, imortalidade celular e potencial metastático e, dessa forma, atuar nas diferentes etapas da carcinogênese.

Neste trabalho foi observado uma associação entre a maior expressão de SP1 e o hábito de fumar dos pacientes. No entanto, esse tipo de associação só foi encontrada em amostras de pacientes matriculados no INCA. Entretanto, nas amostras provenientes do banco de dados do TCGA, as análises mostraram que há associação entre a expressão de SP1 e o etilismo. Esse tipo de divergência pode ter sido causada pela própria exposição dos pacientes aos fatores etiológicos envolvidos na gênese desse tumor, uma vez que o hábito de fumar foi o mais prevalente entre os pacientes matriculados no INCA e o etilismo foi declarado por cerca de 70% dos pacientes. A associação entre tabagismo e a superexpressão de SP1 já têm sido descrita na literatura e o tratamento de linhagens celulares com o extrato do tabaco é capaz de aumentar a expressão de genes diretamente regulados por SP1 (DI *et al*, 2012; ZHANG *et al*, 2012; BROWN *et al*, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de indução da expressão de SP1 pelo etanol. Esses resultados sugerem, mais uma vez, o envolvimento de SP1 nas etapas iniciais da carcinogênese. Além disso, diferentemente dos resultados obtidos por Lin e colaboradores (LIN *et al*, 2011) após a análise em amostras de carcinoma de pulmão não pequenas células, não evidenciamos qualquer associação entre a expressão de SP1 e a sobrevida dos pacientes. Esses resultados sugerem que a superexpressão de SP1 seria um fenômeno que ocorre ainda nas etapas iniciais da carcinogênese esofágica. No entanto, outros trabalhos são necessários para esclarecer por quais mecanismos há o desbalanço na expressão de SP1 após a exposição aos fatores de risco, e quais as consequências fenotípicas desse fenômeno ao longo do desenvolvimento do CEE.

Os resultados obtidos com as análises *in vitro* realizadas neste trabalho demonstraram que SP1 e p53 são capazes de regular transcricionalmente as DNMTs em CEE e que há uma interação entre esses dois fatores de transcrição nesse processo. Os resultados obtidos nessa parte do estudo estão sumarizados em uma tabela (Tabela 5.1). A atuação conjunta de p53 e SP1 na regulação da expressão de diversos genes já foi demonstrada. O mecanismo de regulação de *p21* por p53 e SP1 é o mais bem estudado e, já foi demonstrado que, embora p53 seja um ativador da transcrição desse gene, essa regulação só é possível se SP1 interagir com seus elementos consenso no promotor de *p21*. Além disso, na ausência da proteína p53 ativa, SP1 se liga ao promotor de *p21* e recruta

modificadores de histonas associados à repressão gênica (DOETZLHOFER *et al*, 1999, KOUTSONDOUTS *et al*, 2004, KIM *et al*, 2014), sugerindo que é necessário a presença e atuação desses dois fatores de transcrição para a transativação de *p21*. Também já foi demonstrada a atuação conjunta de p53 e SP1 na regulação da expressão de *CK14*. No entanto, diferentemente do mecanismo de regulação da expressão de *p21*, a interação entre p53 e SP1 resulta na repressão da expressão da ativação transcricional de *CK14* e, na regulação da expressão desse gene, p53 não é capaz de se ligar à sua região promotora. Além disso, os autores demonstraram que na ausência de p53, SP1 não é capaz de reprimir o promotor de *CK14* (CAI *et al*, 2012), sugerindo, mais uma vez, que a presença de ambos os fatores de transcrição é fundamental para que essa regulação ocorra. Esses estudos demonstram que a regulação conjunta por p53 e SP1 pode ativar ou reprimir a expressão gênica e esse fenômeno pode variar de acordo com o gene regulado.

Neste estudo, inicialmente foi realizada a análise do perfil de expressão basal das DNMTs e de SP1 na linhagem celular TE-1, derivada de CEE, e que possui mutação termo-sensível em *TP53*. Os resultados mostraram, corroborando o perfil observado nas amostras humanas de CEE, a maior expressão DNMTs e SP1 nessas células quando cultivadas à temperatura onde ocorre a expressão de p53 mutante. Embora a mutação em p53 nessa linhagem seja no domínio de interação desta com o DNA, esses resultados mais uma vez sugeriram o papel da proteína p53 mutante na desregulação da expressão das DNMTs. Além disso, a superexpressão de SP1 foi de encontro à hipótese anteriormente levantada da sua participação nessa regulação.

A proteína SP1 é capaz de interagir com membros do complexo TFIID. Este complexo é composto pelas proteínas TBP (*TATA-binding protein*) e TAFs (*TBP-associated factors*). Este composto é o primeiro a se ligar ao promotor e são regulados por ativadores transcricionais. Portanto, a proteína SP1 faz parte do complexo de transcrição basal e participa do recrutamento de reguladores transcricionais (TORIGOE *et al*, 2003). A transfecção com vetor de expressão de SP1 nas linhagens celulares de CEE que não expressam p53 ativa foi associada ao aumento na expressão das DNMTs, o que pode sugerir o papel de SP1 na regulação transcricional das DNMTs independente de p53. Além disso, o silenciamento de SP1 com uso de siRNA específico, ou a inibição da interação de SP1 com seus elementos consenso no DNA, foram capazes de reduzir a expressão das DNMTs. Resultados semelhantes a esses já foram demonstrados após a

superexpressão de SP1 na linhagem p53 nula derivada de câncer de pulmão, H1299 (LIN *et al*, 2010). No entanto, os autores não avaliaram a expressão das DNMT3A e DNMT3B após modulação da expressão de SP1. Trabalhos têm demonstrado que a atividade transcricional de SP1 é potencializada pela interação desta proteína com p300. p300 possui atividade histona-acetiltransferase e a interação deste domínio de p300 com o domínio de interação com o DNA de SP1 favorece a interação de SP1 com o DNA. Entretanto, a ligação de SP1 com DNA promove a liberação de p300 do complexo proteico (SUZUKI *et al*, 2000; XIAO *et al*, 2000). Também já foi identificado que p300 é crucial para a ativação transcricional de *DNMT1* (TAN *et al*, 2009). Dessa forma, podemos sugerir que na ausência de p53 selvagem, p300 poderia ser o colaborador de SP1 na regulação transcricional das DNMTs. Vale ressaltar que nossos dados mostraram que, na ausência de p53, são necessárias quantidades elevadas de SP1 na célula para que a ativação transcricional ocorra. No entanto, nosso trabalho não demonstrou o papel de p300 na regulação transcricional das DNMTs em CEE, e outros trabalhos seriam necessários para avaliar essa hipótese.

A interação entre as proteínas p53 e SP1 pode formar complexos multiproteicos. Borellini e colaboradores mostraram a formação de heterocomplexos entre SP1 e p53, e que esses complexos estavam presentes em elementos consenso à p53 e SP1. Além disso, a formação do heterocomplexo foi dependente dos níveis proteicos de p53. Os autores também demonstraram que a proteína p53 mutante também é capaz de formar multicomplexos com SP1 e aumentar a afinidade deste com o DNA (BORELLINI *et al*, 1993). A interação entre p53 mutante e SP1 também foi descrita como a responsável pelo aumento dos níveis de *IGF1R* em linhagens de osteosarcoma (OHLSSON, *et al*, 1998). Neste trabalho foi descrito a superexpressão da *DNMT1* e *SP1* em amostras humanas de CEE com mutações no gene *TP53*. Além disso, a superexpressão de SP1 em um modelo p53-mutante resultou no aumento dos níveis de expressão das DNMTs. A associação entre mutações em *TP53* e superexpressão da *DNMT1* já havia sido demonstrado em amostras humanas de carcinoma de pulmão (LIN *et al*, 2010). Qiang e colaboradores demonstraram que o tratamento de um painel de linhagens celulares com PRIMA-1, um inibidor específico de p53 mutante, induziu a hipometilação global, o que foi associado à redução da expressão das *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* (QIANG *et al*, 2014).

Curiosamente, a transfecção com baixas quantidades do vetor de expressão de SP1 (0,25µg) na linhagem TE-13 foi associada à redução dos níveis de expressão gênica das *DNMTs*. Esse foi o primeiro trabalho que demonstrou que SP1 poderia atuar na regulação da expressão das *DNMTs* tanto como repressor quanto como ativador transcricional, dependendo dos níveis disponíveis dessa proteína na célula. O papel de SP1 como repressor transcricional já foi constatado (CONNOR *et al*, 2016). Sabe-se que SP1 é capaz de interagir com modificadores epigenéticos associados ao empacotamento da cromatina. A interação entre SP1 e HDAC1 foi demonstrada através de ensaio de co-imunoprecipitação e essa interação ocorre através do domínio de interação de SP1 com o DNA. Os autores demonstraram que a presença de SP1 é fundamental para a repressão da *TK* (*Thymidine kinase*) mediada por HDAC1. Além disso, já foi demonstrado a presença de SP1 no promotor de *p21* em células em fase proliferativa (DOETZLHOFER *et al*, 1999), o que demonstra que SP1 pode atuar como ativador ou repressor da expressão de SP1, o que é dependente da interação entre SP1 e HDAC1. A interação entre SP1 e DNMT1 também já foi demonstrada associada à repressão transcricional da *survivina* mediada por metilação no DNA (ESTÈVE *et al*, 2005). Portanto, a interação de SP1 com modificadores epigenéticos pode promover a ativação ou repressão da expressão gênica e o recrutamento destes parece depender dos níveis de SP1 disponíveis na célula.

O aumento dos níveis de expressão de SP1 também foi realizado em linhagens celulares de CEE expressando p53-ativa. Entretanto, diferente do observado nas linhagens p53-inativa, a superexpressão de SP1 foi correlacionada com a redução da expressão das *DNMTs*. De forma interessante, a redução da expressão das *DNMTs* foi acompanhada de menores níveis de expressão de *TP53* e da superexpressão de *MDM2* (resultados não mostrados), o que sugere que p53 participa da regulação da expressão das *DNMTs*. A literatura já tem demonstrado o papel de SP1 na modulação da expressão de *MDM2*. Um polimorfismo na região promotora de *MDM2* foi associado ao aumento da expressão desta, por potencializar sua transativação por SP1 e, como consequência da superexpressão de *MDM2*, os níveis de expressão de p53 foram reduzidos (KNAPPSKOG *et al*, 2011). Além disso, a interação de SP1 com os promotores P1 e P2 de *MDM2* foi demonstrada por Ohgami e colaboradores. Entretanto, o tratamento com Mitramicina A foi capaz de reverter essa interação (OHGAMI *et al*, 2010). A superexpressão de SP1 também resultou em maiores níveis proteicos de *MDM2* e p53 ubiquitinado em linhagens de

câncer de pulmão A549 (LIN *et al*, 2010). Portanto, esses resultados sugerem que, além de regular a expressão das DNMTs de forma direta, SP1 também pode interferir nessa regulação através da modulação dos níveis de RNAm de *TP53* de forma MDM2-dependente.

A superexpressão de p53 foi associada à maior expressão gênica das 3 *DNMTs* avaliadas e em todas as linhagens celulares de CEE avaliadas. Além disso, o silenciamento de *TP53* com o uso de siRNA foi capaz de reverter esse fenômeno. Este foi o primeiro trabalho que demonstrou que p53 é capaz de induzir a expressão das DNMTs. Embora tenha-se observado a presença da interação de p53 com o DNA, após sua ativação, conforme citado anteriormente, já foi descrito que a interação entre as proteínas SP1 e p53 resulta na maior afinidade de SP1 pelo DNA e esse mecanismo seria dependente dos níveis de p53 disponíveis (BORELLINI *et al*, 1993). Esse mecanismo poderia contribuir para o aumento da expressão das DNMTs após superexpressão de p53. Entretanto, quando foi induzido um aumento muito grande nos níveis de p53, alcançados pela transfecção de 2 µg de seu vetor de expressão, na linhagem celular que não expressa p53, foi observado uma diminuição da expressão das *DNMTs*, com níveis de RNAm comparáveis aos do controle não transfectado. Resultados semelhantes já haviam sido descritos em linhagens de câncer de pulmão. Lin e colaboradores demonstraram que a superexpressão de p53, após transfecção com do vetor de expressão de p53 na linhagem H1299 (p53 nula) resultou na redução da expressão da DNMT1.

A repressão de *MGMT* por p53 já foi reportada por Bocangel e colaboradores. Este gene tem sua transcrição regulada por SP1 e os autores mostraram que após a superexpressão de p53, a interação de SP1 com o promotor de *MGMT* em linhagens HCT-116 é perdida. Embora a interação estável entre as duas proteínas tenha sido demonstrada nessa linhagem, a superexpressão de p53 foi capaz de sequestrar SP1 do promotor de *MGMT*. Entretanto, a superexpressão de SP1 anulou o efeito inibitório de p53 sobre a atividade de SP1 (BOCANGEL *et al*, 2009). A repressão da transcrição gênica por p53 mediada pelo bloqueio da interação de SP1 com o DNA já foi demonstrada na regulação de outros genes, como *RECQ4* (SENGUPTA *et al*, 2005) e *VPF/VEGF* (PAL *et al*, 2001). Portanto, p53 já foi descrito como um regulador da atividade de SP1 mediante interação proteica e essa regulação é dependente dos níveis de p53. Entretanto, o mecanismo pelo qual p53 é capaz de reprimir a expressão das DNMTs em CEE não foi avaliada neste trabalho.

Nossos resultados demonstraram, também, que SP1 e p53 foram capazes de se ligar ao promotor da *DNMT1*. SP1 se liga ao promotor gênico de *DNMT1* mesmo em níveis basais, já p53 se liga após a indução de sua expressão nas células. Além disso, a indução da expressão concomitante desses dois fatores de transcrição resultou em uma diminuição da ligação de ambos ao promotor de *DNMT1*. Dois mecanismos poderiam contribuir para a perda de interação de ambas as proteínas com o promotor de *DNMT1*: interação entre p53 e SP1 e retirada do complexo proteico do promotor de *DNMT1* (SENGUPTA *et al*, 2005) e transativação de MDM2 por SP1 e consequente degradação de p53 (LIN *et al*, 2010; OHGAMI *et al*, 2010). Além disso, outro ponto interessante é que não houve interação de p53 ao promotor gênico em questão após o tratamento da linhagem celular p53-ativa com a Mitramicina A, que levou ao desligamento de SP1 do promotor de *DNMT1*, conforme esperado. Muito tem se discutido sobre o papel de SP1 como proteína âncora para o recrutamento, tanto da maquinaria de transcrição basal, quanto de fatores de regulação da expressão gênica, quer sejam ativadores ou repressores. Além disso a interação de SP1 com modificadores da cromatina, como DNMT1, HAC e HDAC1 já tem sido bem caracterizada e as proteínas que são recrutadas por SP1 podem contribuir para a regulação da expressão gênica por mecanismos genéticos e epigenéticos. Dessa forma, uma vez que nas duas situações avaliadas já havia ligação de SP1 ao promotor gênico em condições basais, enquanto que p53 só foi capaz de se ligar após indução de seus níveis, e que não houve ligação do mesmo quando SP1 foi desligado do promotor, podemos considerar a hipótese de que SP1 funcione como âncora para a ligação de p53 ao promotor de *DNMT1*. Além disso, vale citar que a redução da expressão das DNMTs após o tratamento com Mitramicina A foi observada independente da presença de p53 nas células (TE-1, 32°C), corroborando o fato de que a ligação de SP1 ao DNA funcione como uma âncora para a ligação de p53 e, possivelmente, seja essencial para a ativação transcricional das *DNMTs*.

Considerando avaliar o efeito da interação das proteínas p53 e SP1 com a região promotora da *DNMT1* sobre a atividade deste promotor, foi realizado o ensaio duplo da luciferase. A modulação da expressão tanto de SP1 quanto de p53 foi capaz de modular a atividade transcricional do promotor de *DNMT1*, da mesma forma como o fizeram na expressão gênica e proteica de DNMT1, corroborando, então, os resultados gerados nessas análises e demonstrando que SP1 e p53 são capazes de ativar transcionalmente *DNMT1*. A regulação da expressão gênica de

DNMT1 de camundongos por SP1 já foi demonstrada por Kishikaw e colaboradores. Os autores demonstraram que o elemento de ligação à SP1 no promotor da *DNMT1* é fundamental para ativação transcricional deste e que, SP1 é capaz de interagir fisicamente com esta região do genoma. Além disso, a expressão de SP1 exógena em linhagens de *Drosophila* SL2 (SP1-nula) potencializou a atividade do promotor de *DNMT1* de maneira dose-dependente (KISHIKAW *et al*, 2002). Entretanto, este foi o primeiro trabalho que demonstrou que a superexpressão de p53 foi associada ao aumento da atividade do promotor da *DNMT1*. Os mecanismos propostos para essa regulação, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, estão esquematizados na figura 5.1.

Por fim, neste trabalho também foi avaliado o perfil de metilação global do DNA, pela avaliação dos níveis de metilação em LINE-1. Essa avaliação foi feita após o tratamento das células derivadas de CEE com mitramicina A, uma vez que esse tratamento foi capaz de levar a uma redução expressiva dos níveis de expressão das DNMTs avaliadas em todas as células utilizadas nesse estudo. A análise do perfil de metilação de LINE-1, como metodologia para avaliar o perfil de metilação global do DNA, tem sido amplamente utilizada na literatura (LIMA *et al*, 2011; KHAKPOUR *et al*, 2015; CHEN *et al*, 2016; LAN *et al*, 2016) Nossos resultados mostraram que a redução da expressão das DNMTs, após o tratamento com a Mitramicina A, foi associada à redução significativa no nível de metilação de LINE-1, demonstrando que a expressão de DNMTs impacta nos níveis de metilação global do DNA.

A alteração no perfil de metilação do DNA é a alteração epigenética mais bem caracterizada em CEE. Essas alterações são observadas já na mucosa adjacente ao tumor, o que demonstra que esse tipo de alteração ocorre nas etapas iniciais da carcinogênese (LIMA *et al*, 2011). As enzimas responsáveis por catalisar essa alteração no fenótipo das células esofágicas são as DNMTs. Além disso, a alteração genética mais prevalente em CEE são mutações no gene *TP53* e muito têm se discutido sobre o possível ganho de função da proteína mutante (PETITJEAN *et al*, 2007; GIRARDINI *et al*, 2014; VAUGHAN *et al*, 2014; WALERYCH *et al*, 2015; IARC TP53 DATABASE, 2016; ZHANG *et al*, 2016). Nossos resultados demonstraram que tanto SP1 e p53 participam da regulação da expressão das DNMTs em CEE. No entanto, mesmo na ausência de p53, SP1 é capaz de ativar a transcrição destas enzimas. Ademais, p53 pode atuar como ativador ou repressor da expressão das DNMTs, dependendo dos níveis disponíveis na célula. Por fim, foi demonstrado que

a mutação em *TP53* está associada à maiores níveis de expressão de DNMT1 e SP1 em CEE. Portanto, esses resultados demonstram que a regulação da expressão das DNMTs por p53 é um indicador da interação entre mecanismos genéticos e epigenéticos atuando na carcinogênese esofágica.

Tabela 5.1: Representação sumarizada dos resultados obtidos da parte das análises de regulação gênica de *DNMT1* por SP1 e p53 em linhagens celulares derivadas de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE)

Experimento	Expressão Gênica			Promotor <i>DNMT1</i>		
	<i>SP1</i>	<i>TP53</i>	<i>DNMT1</i>	Atividade do Promotor	Ligação SP1	Ligação p53
TE-13 Basal	↑	∅	↑	-----	↑	∅
TE-1 37 (p53 mut) Basal	↑↑↑	↑↑*	↑↑	-----	-----	-----
TE-1 32 (p53 selv) Basal	↑↑	↑	↑	-----	↑	∅
TE-13 Basal	↑	∅	↑	-----	↑	∅
TE-13 Transfecção SP1 0,2 µg	↑↑	∅	↓	-----	-----	-----
TE-13 Transfecção SP1 1 µg	↑↑↑	∅	↑↑↑	↑	-----	-----
TE-13 siSP1	↓	∅	↓	↓	-----	-----
TE- 13 Mitramicina A	-----	↓	↓	-----	∅	∅
TE-13 Transfecção p53 0,2µg	↑	↑↑	↓	-----	-----	-----
TE-13 Transfecção p53 1 µg	↑	↑↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑
TE-13 Transfecção p53 2 µg	↑	↑↑↑↑	↓	↓	-----	-----
TE-1 37 (p53 mut) Basal	↑↑↑	↑↑*	↑↑	-----	-----	-----
TE-1 37 (p53 mut) Transfecção SP1	↑↑↑↑	↑↑*	↑↑↑	↑	-----	-----
TE-1 37 (p53 mut) siSP1	↑	↑↑*	↓	↓	-----	-----
TE-1 37 (p53 mut) Mitramicina A	-----	↑↑*	↓	-----	∅	∅
TE-1 32 (p53 selv) Basal	↑↑	↑	↑	-----	↑	∅
TE-1 32 (p53 selv)Transfecção SP1	↑↑↑	↓	↓	↓	-----	-----
TE-1 32 (p53 selv) siSP1	↑	↑	↑↑	↑	-----	-----
TE-1 32 (p53 selv) Mitramicina A	-----	↑↑↑	↓	-----	∅	∅
TE-1 32 (p53 selv)Transfec p53 0,3 µg	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑	-----	-----
TE-1 32 (p53 selv) MMS	↑	↑↑	↑↑	↑	-----	-----
TE-1 32 (p53 selv) siTP53	↑↑	↓	↓	↓	-----	-----
TE-13 Transfecção Combinada	↑↑↑	↑↑	↓	↓	↓	↓

Setas ↓ representam baixa expressão, atividade do promotor ou ligação ao promotor (em relação ao fenômeno na célula basal); ↑, ↑↑, ↑↑↑ e ↑↑↑↑ representam alta expressão, atividade do promotor ou ligação ao promotor de forma crescente (em relação ao fenômeno na célula basal); ∅ representa ausência de expressão ou ligação ao promotor; * representa proteína p53 mutada, --- representam ausência de avaliação

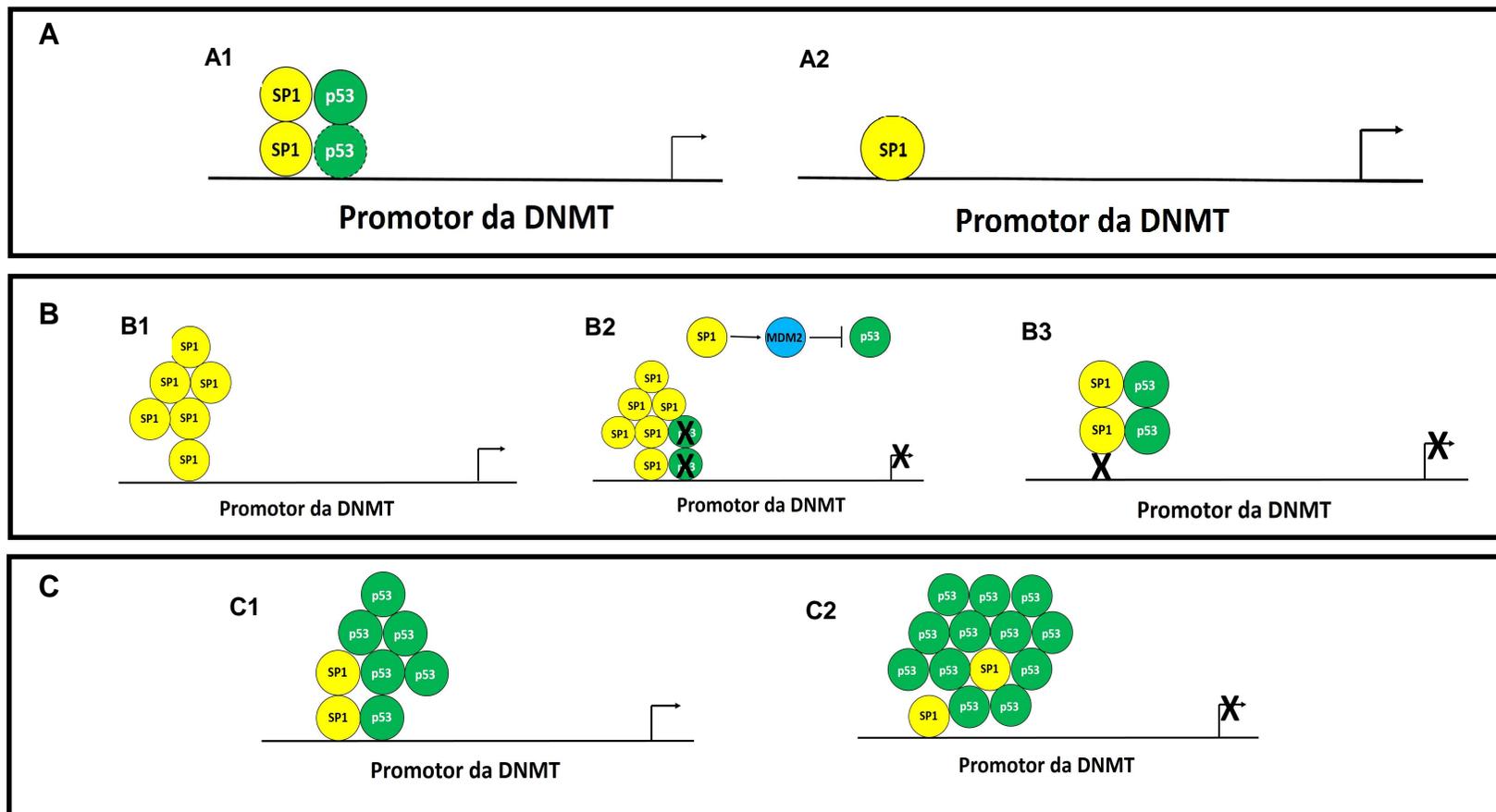


Figura 5.1: **Figura esquemática representativa dos mecanismos de regulação de *DNMT1* por SP1 e p53 em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) propostos a partir dos dados gerados nesse estudo.** Esfera amarela representa a proteína SP1, esfera verde representa a proteína p53 selvagem. Setas são representativas da ativação da transcrição e "X" se refere à inibição da expressão (A) Esquema representativo da regulação basal da expressão das DNMTs por p53 e SP1. As figuras A-1 e A-2 mostram que SP1 se liga ao promotor gênico de *DNMT1* já em condições basais, tanto na presença de p53 selvagem quanto na sua ausência e ativa a transcrição desse gene e níveis basais. A proteína p53 não se liga ao promotor gênico em condições basais, entretanto, é capaz de se ligar após a indução de sua expressão (ligação representada aqui pela esfera verde com limites pontilhados) e quando da sua ligação também é capaz de ativar a transcrição de *DNMT1*. (B) Esquema representativo da regulação da expressão das *DNMT1* quando da modulação da expressão e/ou atividade de SP1. A imagem B1 mostra que a superexpressão de SP1, mesmo na ausência de p53 selvagem, é capaz de ativar a transcrição de *DNMT1*. Em B2 está representado a superexpressão exógena de SP1 e seus efeitos sobre a diminuição dos níveis de p53, mediados pelo aumento da expressão de MDM2 e consequente degradação de p53, e inibição da ativação transcricional de *DNMT1*, provavelmente devida a interrupção da formação dos heterocomplexos multiproteicos formados entre SP1 e p53 e que atuam na ativação da transcrição dessa *DNMT*. A imagem B-3 mostra que o desligamento de SP1 do promotor de *DNMT1*, ocorrido após o tratamento das células com o inibidor da ligação de SP1 ao DNA, leva à inibição da atividade do promotor de *DNMT1*, mesmo na presença de p53 selvagem, sugerindo que a ligação de SP1 ao DNA é fundamental para a ativação transcricional (C) Esquema representativo da regulação da expressão da *DNMT1* quando da modulação de p53. Os esquemas C-1 e C-2 mostram que a superexpressão de p53 pode levar tanto à ativação quanto à repressão do promotor de *DNMT1*, de acordo com a quantidade de p53 disponível na célula. Em C-1 vemos que a superexpressão considerada mediana de p53 leva à indução da atividade transcricional de DNMT1, provavelmente devido à formação de heterocomplexos entre esses dois fatores de transcrição que irão atuar na regulação gênica da *DNMT1*. Já em C-2, vemos a superexpressão considerada exacerbada de p53, o que acarreta o sequestro de SP1 e subsequente impedimento da sua ligação ao promotor gênico, levando à inibição da atividade do promotor de *DNMT1*.

6. CONCLUSÕES

As proteínas SP1 e p53 participam da regulação da expressão das DNMTs em CEE e especificidades da interação entre SP1 e p53 na regulação transcricional das DNMTs podem desencadear efeitos distintos sobre a atividade do promotor.

- Amostras de CEE com mutações em *TP53* apresentam maior expressão gênica de *DNMT1* e *SP1* do que amostras que não apresentam mutação nesse gene. Além disso, existe uma correlação positiva entre as expressões de *DNMT1* e *SP1* em amostras que possuem mutações no gene *TP53*. Não foi observada nenhuma associação entre a expressão dos genes avaliados e os dados clínico-patológico dos pacientes comum aos dois grupos amostrais avaliados;

- A superexpressão de SP1 foi associada ao aumento da expressão das DNMTs, independente da presença de p53 selvagem, enquanto que, a superexpressão de p53 resultou em efeitos antagônicos sobre a expressão das DNMTs, o que foi dependente dos níveis de p53 disponíveis na célula;

- Existem elementos responsivos à p53 e SP1 na região promotora dos genes que codificam as DNMTs e esses elementos são conservados, principalmente, entre os primatas;

- p53 e SP1 interagem com a região promotora da *DNMT1* e essa interação pode resultar na ativação ou repressão do promotor da *DNMT1*, de acordo com os níveis de p53 disponíveis na célula;

- A redução da expressão das DNMTs foi associada à diminuição dos níveis de metilação global do DNA.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEDI-ARDEKANI B, KAMANGAR F, SOTOUDEH M *et al.* **Extremely high TP53 mutation load in esophageal squamous cell carcinoma in Golestan Province, Iran.** PLoS One, v.6, n.12, p.855-60, 2011.
- ABRAHAM JM, WANG S, SUZUKI H *et al.* **Esophagin cDNA cloning and characterization: a tissue-specific member of the small proline-rich protein family that is not expressed in esophageal tumors.** Cell Growth Differ, v.7, n.7, p.855-60, 1996.
- ADAMS RL, MCKAY EL, CRAIG LM *et al.* **Mouse DNA methylase: methylation of native DNA.** Biochim Biophys Acta, v. 561, n. 2, p. 345-57, 1979.
- AIELLO A, PANDINI G, SARFSTEIN R *et al.* **HMGA1 protein is a positive regulator of the insulin-like growth factor-I receptor gene.** Eur J Cancer, v. 46, n. 10, p. 1919-26, 2010.
- ANDERSON OS, SANT KE, DOLINOY DC. **Nutrition and epigenetics: an interplay of dietary methyl donors, one-carbon metabolism and DNA methylation.** J Nutr Biochem, v. 23, n. 8, p. 853-9, 2012.
- ALLEN JW, RICHARDSON JD, EDWARDS MJ *et al.* **Squamous cell carcinoma of the esophagus: a review and update.** Surg Oncol, v.6, p.193-200, 1997.
- BALDIN V, LUKAS J, MARCOTE MJ *et al.* **Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1.** Genes Dev, v.7, n. 5 p. 812-21, 1993.
- BARNAS C, MARTEL-PLANCHE G, FURUKAWA Y *et al.* **Inactivation of the p53 protein in cell lines derived from human esophageal cancers.** Int J Cancer, v. 71, n.1, p.79-87, 1997.
- BARONI TE, WANG T, QIAN H *et al.* **A global suppressor motif for p53 cancer mutants.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 101, n.14, p. 4930-5, 2004.

- BERKYUREK AC, SUETAKE I, ARITA K *et al.* **The DNA methyltransferase Dnmt1 directly interacts with the SET and RING finger-associated (SRA) domain of the multifunctional protein Uhrf1 to facilitate accession of the catalytic center to hemi-methylated DNA.** J Biol Chem, v. 289, n.1, p. 379-86, 2014.
- BESTOR TH. **Cloning of a mammalian DNA methyltransferase.** Gene, v. 74, n.1, p. 9-12, 1988.
- BESTOR TH. **Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain.** EMBO J, v. 11, n.7, p. 2611-7, 1992.
- BESTOR T, LAUDANO A, MATTALIANO R, *et al.* **Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases.** J Mol Biol, v. 203, n.4, p. 971-83, 1988.
- BIEGING KT, MELLO SS, ATTARDI LD. **Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression.** Nat Rev Cancer, v. 14, n.5, p. 359-70, 2014.
- BLACK AR, BLACK JD, AZIZKHAN-CLIFFORD J. **Sp1 and krüppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer.** J Cell Physiol, v. 188, n.2, p. 143-60, 2001.
- BLOT, W.J, MCLAUGHLIN, J.K. **The changing epidemiology of esophageal cancer.** Semin Oncol, v. 26, n. 5, p. 2-8, 1999.
- BODE, MA, DONG, Z. **Post-translational modification of p53 in tumorigenesis.** Nature, v. 4, p. 793-805, 2004.
- BROWN CJ, LAIN, VERMA CS *et al.* **Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway.** Nat Rev Cancer, v. 9, n. 12, p. 862-73, 2009.

- BULLOCK AN, HENCKEL J, FERSHT AR. **Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy.** *Oncogene*, v. 19, n. 10, p. 1245-56, 2000.
- BUNZ F, DUTRIAUX A, LENGAUER C, *et al.* **Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage.** *Science*, v.282, n.5393, p.1497-501, 1998.
- CAI BH, HSU PC, HSIN IL *et al.* **p53 acts as a co-repressor to regulate keratin 14 expression during epidermal cell differentiation.** *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. e41742, 2012.
- CAO HH, ZHENG CP, WANG SH *et al.* **A molecular prognostic model predicts esophageal squamous cell carcinoma prognosis.** *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e106007, 2014.
- CASTELLSAGUÉ X, MUÑOZ N, DE STEFANI E *et al.* **Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women.** *Int J Cancer*, v. 82, n.5, p.657-664, 1999.
- CASTELLSAGUÉ X, MUÑOZ N, DE STEFANI E *et al.* **Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America.** *Int J Cancer*, v. 88, n.4, p. 658-64, 2000.
- CAWLEY S, BEKIRANOV S, NG HH *et al.* **Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs.** *Cell*, v. 116, n.4, p. 499-509, 2004.
- CERAMI E, GAO J, DOGRUSOZ U *et al.* **The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.** *Cancer Discov* v. 2, n.5, p. 401-4, 2012.

- CHEN R, MENG X, ZHAO A, *et al.* **DNA hypomethylation and its mediation in the effects on fine particulate air pollution on cardiovascular biomarkers: A randomized crossover trial.** *Environ Int*, v. 4, p. 614-9, 20016.
- CHEN T, UEDA Y, DODGE JE, *et al.* **Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b.** *Mol Cell Biol*, v. 23, n.16, p. 5594-605, 2003.
- CHIEFARI E, BRUNETTI A, ARTURI F, *et al.* **Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation?** *BMC Cancer*, v. 2, n.35, p. 1-4, 2002.
- CHUANG JC, JONES PA. **Epigenetics and microRNAs.** *Pediatr Res*, v. 61, n. 5Pt2, p. 24R-29R, 2007.
- COUTTS AS, LA THANGUE N. **The p53 response during DNA damage: impact of transcriptional cofactors.** *Biochem Soc Symp*, v. 73, p. 181-9, 2006.
- CUNNINGHAM JM, CHRISTENSEN ER, TESTER DJ *et al.* **Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability.** *Cancer*, v. 58, n. 15, p. 3455-60, 1998.
- DA COSTA NM, HAUTEFEUILLE A, CROS MP *et al.* **Transcriptional regulation of thymine DNA glycosylase (TDG) by the tumor suppressor protein p53.** *Cell Cycle*, v. 11, n. 24, p. 4570-8, 2012.
- DA COSTA NM, SOARES LIMA SC, DE ALMEIDA SIMÃO T, *et al.* **The potential of molecular markers to improve interventions through the natural history of oesophageal squamous cell carcinoma.** *Biosci Rep*, v. 33, n. 4, p. e00057, 2013.
- DONG A, YODER JA, ZHANG X, *et al.* **Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA.** *Nucleic Acids Res*, v. 29, n. 2, p. 439-48, 2001.

- DOETZLHOFFER A, ROTHENEDER H, LAGGER G, *et al.* **Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1.** Mol Cell Biol, v. 99, n. 8, p. 5504-11, 1999.
- ENZINGER PC, MAYER RJ. **Esophageal cancer.** N Engl J Med, v. 349, n. 23, p. 2241-52, 2003.
- ESLICK GD. **Epidemiology of esophageal cancer.** Gastroenterol Clin North Am, v. 38, n. 1, p. 17-25, 2009.
- ESTÈVE PO, CHIN HG, PRADHAN S. **Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 4, p. 1000-5, 2005.
- ESTÈVE PO, CHIN HG, PRADHAN S. **Molecular mechanisms of transactivation and doxorubicin-mediated repression of survivin gene in cancer cells.** J Biol Chem, v. 282, n. 4, p. 2615-25, 2007.
- FATEMI M, HERMANN A, GOWHER H, *et al.* **Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA.** Eur J Biochem, v. 269, n. 20, p. 4981-4, 2002.
- FEINBERG AP, VOGELSTEIN B. **Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts.** Nature, v. 301, n. 5895, p. 89-92, 1983.
- FEINBERG AP, TYCKO B. **The history of cancer epigenetics.** Nat Rev Cancer, v. 4, n. 2, p. 143-53, 2004.
- FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, *et al.* **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** Int J Cancer, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

- FUJII S, KATAKE Y, TANAKA H. **Increased expression of DNA methyltransferase-1 in non-neoplastic epithelium helps predict colorectal neoplasia risk in ulcerative colitis.** *Digestion*, v. 82, n. 3, p. 179-86, 2010.
- GAO J, AKSOY BA, DOGRUSOZ U, *et al.* **Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal.** *Sci Signal*, v. 6, n. 269, p. 11, 2013.
- GAO YB, CHEN ZL, LI JG, *et al.* **Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma.** *Nat Genet*, v. 46, n. 10, p. 1097-102, 2014.
- GIRARDINI JE, WALERYCH D DEL SAL G. **Cooperations of p53 mutations with other oncogenic alterations in cancer.** *Subcell Biochem*, v. 85, p. 41-70, 2014.
- GIRAULT I, TOZLU S, LIDEREAU R, *et al.* **Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas.** *Clin Cancer Res*, v. 9, n. 12, p. 4415-22, 2003.
- GOLL MG, KIRPEKAR F, MAGGERT KA, *et al.* **Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2.** *Science*, v. 311, n. 5759, p. 395-8, 2006.
- GRAFF JR, HERMAN JG, LAPIDUS RG, *et al.* **E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas.** *Cancer Res*, v. 55, n. 22, p. 5195-9, 1995.
- GREGER V, PASSARGE E, HÖPPING W, *et al.* **Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma.** *Hum Genet*, v. 83, n. 2, p. 155-8, 1989.
- GREGER V, DEBUS N, LOHMANN D, *et al.* **Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma.** *Hum Genet*, v. 94, n. 5, p. 491-6, 1994.

- GRINKEVICH VV, NIKULENKOV F, SHI Y, *et al.* **Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis.** *Cancer Cell*, v. 15, n. 5, p. 441-53, 2009.
- GROS C, FAHY J, HALBY L, *et al.* **DNA methylation inhibitors in cancer: recent and future approaches.** *Biochimie*, v. 94, n. 11, p. 2280-96, 2012.
- GUAN H, CAI J, ZHANG N, *et al.* **Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome.** *Int J Cancer*, v. 130, n. 3, p. 593-601, 2012.
- HAINAUT P, HERNANDEZ T, ROBINSON A *et al.* **IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools.** *Nucleic Acids Research*, v. 26, n.1, p. 205-213, 1998.
- HAINAUT P, HOLLSTEIN M. **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** *Adv Cancer Res*, v. 77, p. 81-137, 2000.
- HAINAUT P, WIMAN KG. **30 years and a long way into p53 research.** *Lancet Oncol*, v. 10, n. 9, p. 913-9, 2009.
- HAMPEL H, ABRAHAM NS, EL-SERAG HB. **Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications.** *Ann Intern Med*, v. 143, n. 3, p. 199-211, 2005.
- HARDELAND U, BENTELE M, JIRICNY J *et al.* **The versatile thymine DNA-glycosylase: a comparative characterization of the human, *Drosophila* and fission yeast orthologs.** *Nucleic Acids Research*, v.31, n. 9, p. 2261-2271, 2003.
- HATA K, OKANO M, LEI H, *et al.* **Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice.** *Development*, v. 129, n. 8, p. 1983-93, 2002.

- HE L, HE X, LOWE SW, *et al.* **microRNAs join the p53 network--another piece in the tumour-suppression puzzle.** Nat Rev Cancer, v. 7, n. 11, p. 819-22, 2007.
- HE M, FAN J, JIANG R, *et al.* **Expression of DNMTs and genomic DNA methylation in gastric signet ring cell carcinoma.** Mol Med Rep, v. 8, n. 3, p. 942-8, 2013.
- HEATH EL, LIMBURG PJ, HAWK ET, *et al.* **Adenocarcinoma of the esophagus: risk factors and prevention.** Oncology, v. 14, n. 4, p. 507-514, 2000.
- HENDRICH B, BIRD A. **Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation.** Curr Top Microbiol Immunol. v.249, p.55-74, 2000.
- HERBSTER S, FERRARO CT, KOFF NK *et al.* **HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters.** Cancer Lett, v.326, n. 1, p. 52-8, 2012.
- HERCEG, Z. **Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors.** Mutagenesis, v. 22, n. 2, p. 91-103, 2007.
- HERMAN JG, LATIF F, WENG Y *et al.* **Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 91, n. 21, p. 9700-4, 1994.
- HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A. **Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases.** Cell Mol Life Sci, v. 61, n. 19-20, p. 2571-87, 2004.
- HONGO M.; NAGASAKI, Y.; SHOJI, T. **Epidemiology of esophageal cancer: Orient to Occident. Effects of chronology, geography and ethnicity.** J Gastroenterol Hepatol, v. 24, n. 5, p. 729-35, 2009.

- HOFFMAN WH, BIADE S, ZILFOU JT *et al.* **Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53**, J Biol Chem, v. 277, n. 5, p. 3247-57, 2002.
- HU J, NYRÉN O, WOLK A *et al.* **Risk factors for oesophageal cancer in northeast China**. Int J Cancer, v. 57, n. 1, p. 38-46, 1994.
- HVID-JENSEN F, PEDERSEN L, DREWES AM *et al.* **Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus**. N Engl J Med, v. 365, n. 15, p. 1375-83, 2011.
- IIDA T, SUETAKE I, TAJIMA S, *et al.* **PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA**. Genes Cells, v. 7, n. 10, p. 997-1007, 2002.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2013. 124p.
- ISLAMI F, BOFFETTA P, REN JS *et al.* **High-temperature beverages and foods and esophageal cancer risk--a systematic review**. Int J Cancer, v. 125, n. 3, p. 491-524, 2009.
- JÄHNER D, STUHLMANN H, STEWART CL *et al.* **De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis**. Nature, v. 298, n. 5875, p. 623-8, 1982.
- JEMAL A, BRAY F, CENTER MM *et al.* **Global cancer statistics**. CA Cancer J Clin, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.
- JIA D, JURKOWSKA RZ, ZHANG X, *et al.* **Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation**. Nature, v. 449, n. 7159, p. 248-51, 2007.

- JIANG NY, WODA BA, BANNER BF *et al.* **Sp1, a new biomarker that identifies a subset of aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 17, n. 7, p. 1648-52, 2008.
- JIN W, CHEN BB, LI JY, *et al.* **TIEG1 inhibits breast cancer invasion and metastasis by inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) transcription and the EGFR signaling pathway.** *Mol Cell Biol*, v. 32, n. 1, p. 50-63, 2012.
- JONES PA, LIANG G. **Rethinking how DNA methylation patterns are maintained.** *Nat Rev Genet*, v. 10, n. 11, p. 805-11, 2009.
- KANAI Y. **Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers.** *Pathol Int*, v. 58, n. 9, p. 544-58, 2008.
- KHAKPOUR G, POOLADIA, IZADI P *et al* Y. **DNA methylation as a promising landscape: A simple blood test for breast cancer prediction.** *Tumor Biol*, v. 36, n. 7, p. 4905-12, 2015.
- KIM GD, NI J, KELESOGLU N *et al.* **Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases** *EMBO J*, v. 21, n.15, p. 4183-95, 2002.
- KIM HS, HEO JI, PARK SH, *et al.* **Transcriptional activation of p21(WAF1/CIP1) is mediated by increased DNA binding activity and increased interaction between p53 and Sp1 via phosphorylation during replicative senescence of human embryonic fibroblasts.** *Mol Biol Rep*, v. 41, n.4, p. 2397-408, 2014.
- KINGSLEY C, WINOTO A. **Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression.** *Mol Cell Biol*, v. 12, n.10, p. 4251-61, 1992.
- KISHIKAWA S, MURATA T, KIMURA H *et al.* **Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zing finger proteins.** *Eur J Biochem*, v. 269, n.12, p. 2961-70, 2002.

- KNAPPSKOG S, BJORNSLETT M, MYKLEBUST LM, *et al.* **The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians.** *Cancer Cell*, v. 19, n. 2, p. 273-82, 2011.
- KONG X, PENG B, YANG Y *et al.* **p53 Represses transcription of RING finger LIM domain binding protein RLIM through Sp1.** *PLoS One*, v. 8, n.5, p. e62832, 2013.
- KWON YM, PARK JH, KIM H *et al.* **Different susceptibility of increased DNMT1 expression by exposure to tobacco smoke according to histology in primary non-small cell lung cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 133, n.4, p. 219-26, 2007.
- KUBO A, CORLEY DA. **Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 15, n.5, p. 872-8, 2006.
- KUMANO H, KATO H, MIYAZAKI T, *et al.* **Genetic alterations in esophageal cancer.** *Surg Today*, v. 35, n.1, p. 7-18, 2004.
- KOUTSODONTIS G, KARDASSIS D. **Inhibition of p53-mediated transcriptional responses by mithramycin A.** *Oncogene*, v. 23, n.57, p. 9190-200, 2004.
- LANE DP, CRAWFORD LV. **T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.** *Nature*, v. 278, n. 5701, p. 261-3, 1979.
- LI E. **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Nat Rev Genet*, v. 3, n. 9, p. 662-73, 2002.
- LI E, TIMOTHY H. BESTOR *et al.* **Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.** *Cell*, v. 69, n. 6, p. 915-26, 1992.

- LIN DC, HAO JJ, NAGATA Y *et al.* **Genomic and molecular characterization of esophageal squamous cell carcinoma.** *Nat Genet*, v. 46, n. 5, p. 467-73, 2014.
- LIN RK, HSU HS, CHANG JW *et al.* **Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer.** *Lung Cancer*, v. 55, n. 2, p. 205-13, 2007.
- LI H, ZHANG Y, STRÖSE A *et al.* **Integrated high-throughput analysis identifies Sp1 as a crucial determinant of p53-mediated apoptosis.** *Cell Death Differ*, v. 21, n. 9, p. 1493-502, 2014.
- LI J, LI X, LI Y, *et al.* **Cell-specific detection of miR-375 downregulation for predicting the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma by miRNA in situ hybridization.** *PLoS One*, v. 8, n. 1, p. e53582, 2013.
- LI M, WANG Y, SONG Y, *et al.* **Expression profiling and clinicopathological significance of DNA methyltransferase 1, 3A and 3B in sporadic human renal cell carcinoma.** *Int J Clin Exp Pathol*, v. 7, n. 11, p. 7597-609, 2014.
- LIJINSKY W. **Chemistry and biology of N-nitroso compounds.** CambUniv Press, 1992.
- LAM K, PAN K, LINNEKAMP JF *et al.* **DNA methylation based biomarkers in colorectal cancer: A systematic review.** *Biochim Biophys Acta*, v.1866; n.1; p. 106-20, 2016.
- LIMA SC, HERNÁNDEZ-VARGAS H, SIMÃO T *et al.* **Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers.** *Epigenetics*, v. 6, n. 10, p. 467-73, 2001.
- LI H, DURBIN R. **Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.** *Bioinformatics*, v. 25, n. 14, p. 1754-60, 2009.

- LIN RK, WU CY, CHANG JW, *et al.* **Dysregulation of p53/Sp1 control leads to DNA methyltransferase-1 overexpression in lung cancer.** *Cancer Res*, v. 70, n. 14, p. 5807-17, 2010.
- LIZ J, ESTELLER M. **lncRNAs and microRNAs with a role in cancer development.** *Biochim Biophys Acta*, v. 15, n. 138, p. S1874-9399, 2015.
- LOPEZ J, PERCHARDE M, COLEY HM *et al.* **The context and potential of epigenetics in oncology.** *Br J Cancer*, v. 100, n. 4, p. 571-7, 2009.
- LUCZAK MW, JAGODZINSKI PP. **The role of DNA methylation in cancer development.** *Folia Histochem Cytobiol*, v.44, n.3, p.143-154, 2006.
- LUNG ML, CHAN WC, ZONG YS *et al.* **p53 mutational spectrum of esophageal carcinomas from five different geographical locales in China.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, v. 5, n. 4, p. 277-84, 1996.
- LV J, CAO XF, ZHU B *et al.* **Long-term efficacy of perioperative chemoradiotherapy on esophageal squamous cell carcinoma.** *World J Gastroenterol*, v.16, n.13, p. 1649-54, 2010.
- MAI A, MASSA S, ROTILI D, *et al.* **Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy.** *Med Res Rev*, v. 25, n. 3, p. 261-309, 2005.
- MALKIN D, LI FP, STRONG LC *et al.* **Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.** *Science*, v.250, n. 4985, p. 1233-8, 1990.
- MANDARD AM, HAINAUT P, HOLLSTEIN M. **Genetic steps in the development of squamous cell carcinoma of the esophagus.** *Mutat Res*, v. 462, n. 2-3, p. 335-42, 2000.

- MAO WM, ZHENG WH, LING ZQ. **Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 12, n. 10, p. 2461-6, 2011.
- MAOR S, MAYER D, YARDEN RI, *et al.* **Estrogen receptor regulates insulin-like growth factor-I receptor gene expression in breast tumor cells: involvement of transcription factor Sp1.** J Endocrinol, v. 191, n. 3, p. 605-12, 2006.
- MASTRANGELO IA, COUREY AJ, WALL JS, *et al.* **DNA looping and Sp1 multimer links:a mechanism for transcriptional synergism and enhancement.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 88, n. 13, p. 5670-4, 1991.
- MCLARTY AJ, DESCHAMPS C, TRASTEK VF, *et al.* **Esophageal resection for cancer of the esophagus: long-term function and quality of life.** Ann Thorac Surg, v. 63, n. 6, p.1568-1572, 1997.
- MILLER DM, POLANSKY DA, THOMAS SD, *et al.* **Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA.** Am J Med Sci, v. 294, n. 5, p. 388-94, 1987.
- MILUTINOVIC S, BROWN SE, ZHUANG Q, *et al.* **DNA methyltransferase 1 knock down induces gene expression by mechanism independent of DNA methylation and histone deacetylation.** J Biol Chem, v. 279, n. 27, p. 27915-27, 2004.
- MOMAND J, ZAMBETTI GP, OLSON DC *et al.* **The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.** Cell, v. 69, n. 7, p. 1237-45, 1992.
- MOTOKURA T, BLOOM T, KIM HG, *et al.* **A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene.** Nature, v. 350, n. 6318, p. 512-5, 1991.
- MUMMENBRAUER T, JANUS F, MÜLLER B, *et al.* **p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity.** Cell, v. 85, n. 7, p. 1089-99, 1996.

- NAGAOKA M, SHIRAISHI Y, SUGIURA Y. **Selected base sequence outside the target binding site of zinc finger protein Sp1.** Nucleic Acids Res, v. 29, n. 24, p. 4920-9, 2001.
- NAKAGAWA H, ZUKERBERG L, TOGAWA K, *et al.* **Human cyclin D1 oncogene and esophageal squamous cell carcinoma.** Cancer, v. 76, n. 4, p. 541-9, 1995.
- NAVARRO F, LIEBERMAN J. **miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship.** PLoS One, v. 10, n. 7, p. e0132767, 2005.
- NISHIMAKI T, SHIMOJI H, SUNAGAWA H. **Recent changes and the future roles of esophageal cancer surgery.** Ann Thorac Cardiovasc Surg, v. 10, n. 6, p. 324-32, 2004.
- NOORI P, HOU SM. **Mutational spectrum induced by acetaldehyde in the HPRT gene of human T lymphocytes resembles that in the p53 gene of esophageal cancers.** Carcinogenesis, v. 22, n. 11, p. 1825-30, 2001.
- O'CONNOR L, GILMOUR J, BONIFER C. **The role of the ubiquitously expressed transcription factor Sp1 in tissue-specific transcriptional regulation and in disease.** Yale J Biol Med, v. 89, n. 4, p. 513-525, 2016.
- OH BK, KIM H, PARK HJ, *et al.* **DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation.** Int J Mol Med, v. 20, n. 1, p. 65-73, 2007.
- OKANO M, BELL DW, HABER DA, *et al.* **DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development.** Cell, v. 99, n. 3, p. 247-57, 1999.
- OLEAGA C, WELTEN S, BELLOC A, *et al.* **Identification of novel Sp1 targets involved in proliferation and cancer by functional genomics.** Biochem Pharmacol, v. 84, n. 12, p. 1581-91, 2012.

- PALUMBO A, DA COSTA NM, DE MARTINO M, *et al.* **UBE2C is overexpressed in ESCC tissues and its abrogation attenuates the malignant phenotype of ESCC cell lines.** *Oncotarget*, v. 7, n.40, p. 65876-87, 2016.
- PALUMBO A, DA COSTA NM, ESPOSITO F, *et al.* **HMGA2 overexpression plays a critical role in the progression of the esophageal squamous carcinoma.** *Oncotarget*, v. 7, n.18, p. 25872-84, 2016.
- PARKIN DM, BRAY F, FERLAY J, *et al.* **Global Cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin*, v. 55, n.2, p. 74-108, 2005.
- PASKA AV, HUDLER P. **Aberrant methylation patterns in cancer: a clinical view.** *Biochem Med*, v. 25, n.2, p. 161-76, 2015.
- PATHANIA R, RAMACHANDRAN S, ELANGO VAN S. **DNMT1 is essential for mammary and cancer stem cell maintenance and tumorigenesis.** *Nat Commun*, v. 6, p6910, 2015.
- PETITJEAN A, MATHE E, KATO S, *et al.* **Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database.** *Hum Mutat*, v. 28, n.6, p. 622-9, 2007.
- POHL H e WELCH HG. **The role of overdiagnosis and reclassification in the Marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence.** *Journal of the National Cancer Institute*, v.97, p.142-146, 2005.
- PRADHAN S, BACOLLA A, WELLS RD, *et al.* **Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation.** *J Biol Chem*, v. 274, n.46, p. 33002-10, 1999.
- PÜTZ A, HARTMANN AA, FONTES PR *et al.* **TP53 mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high risk area (Southern Brazil): role of life style factors.** *Int J Cancer*, v.98, n. 1, p. 99-105, 2002.

- KYO S, TAKAKURA M, TAIRA T *et al.* **Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT)**, *Nucleic Acids Res*, v.28, n. 3, p. 669-77, 2000.
- REIK W. **Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development**. *Nature*, v.447, n. 7143, p. 425-32, 2007.
- RIBIERAS S, TOMASETTO C, RIO MC. **The pS2/TFF1 trefoil factor, from basic research to clinical applications**. *Biochim Biophys Acta*, v.1378, n. 1, p. F61-77, 1998.
- ROBINSON JT, THORVALDSDÓTTIR H, WINCKLER W *et al.* **Integrative genomics viewer**. *Nat Biotechnol*, v.29, n. 1, p. 24-6, 2011.
- RUSTGI AK, EL-SERAG HB. **Esophageal carcinoma**. *N Engl J Med*, v.371, n. 26, p. 2499-509, 2014.
- RUTEGARD M, NORDENSTEDT H, LU Y. **Sex-specific exposure prevalence of established risk factors for oesophageal adenocarcinoma**. *Br J Cancer*, v.103, n. 5, p. 735-40, 2010.
- SAITO Y, KANAI Y, NAKAGAWA T, *et al.* **Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas**. *Int J Cancer*, v.105, n. 4, p. 527-32, 2003.
- Santos, PTS. ***Estudo de alterações moleculares em carcinoma epidermóide de esôfago através de sequenciamento de RNA (RNA-seq)***. Rio de Janeiro, 2016. 97p. Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, 2016. [Orientador: Luís Felipe Ribeiro Pinto]
- SAKAI T, TOGUCHIDA J, OHTANI N, *et al.* **Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene**. *Am J Hum Genet*, v.48, n. 5, p. 880-8, 1991.

- SCHAEFER M, LYKO F. **Solving the Dnmt2 enigma**. *Chromosoma*, v.119, n. 1, p. 35-40, 2010.
- SENGUPTA S, HARRIS CC. **p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination**. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v.6, n. 1, p. 44-55, 2005.
- SHAMMA A, DOKI Y, SHIOZAKI H, *et al.* **Cyclin D1 overexpression in esophageal dysplasia: a possible biomarker for carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma**. *Int J Oncol*, v.16, n. 2, p. 261-6, 2000.
- SHANG L, WANG M. **Molecular alterations and clinical relevance in esophageal squamous cell carcinoma**. *Front Med*, v.7, n. 4, p. 401-10, 2013.
- SHARIF J, MUTO M, TAKEBAYASHI S, *et al.* **The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA**. *Nature*, v.450, n. 7171, p. 908-12, 2007.
- SHRIDHAR R, ALMHANNA K, MEREDITH KL, *et al.* **Radiation therapy and esophageal cancer**. *Cancer Control*, v.20, n. 2, p. 97-110, 2013.
- SIEGFRIED Z, EDEN S, MENDELSON M, *et al.* **DNA methylation represses transcription in vivo**. *Nat Genet*, v.2, n. 2, p. 203-6, 1999.
- Simão, TA. **Alterações Genéticas e Epigenéticas em Carcinoma Epidermóide de Esôfago**. Rio de Janeiro, 2008. 146p. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, 2008. [Orientador: Rodolpho Mattos Albano]
- SIMÃO TDE A, SIMÕES GL, RIBEIRO FS, *et al.* **Lower expression of p14ARF and p16INK4a correlates with higher DNMT3B expression in human oesophageal squamous cell carcinomas**. *Hum Exp Toxicol*, v.25, n. 9, p. 515-22, 2006.
- SIMÃO T, SOUZA-SANTOS PT, DE OLIVEIRA DS, *et al.* **Quantitative evaluation of SPRR3 expression in esophageal squamous cell carcinoma by qPCR**

and its potential use as a biomarker. *Exp Mol Pathol*, v.91, n. 2, p. 584-9, 2011.

SONG Y, LI L, OU Y, *et al.* **Identification of genomic alterations in oesophageal squamous cell cancer.** *Nature*, v.509, n. 7498, p. 91-5, 2014.

SOUICI AC, MIRKOVITCH J, HAUSEL P, *et al.* **Transition mutation in codon 248 of the p53 tumor suppressor gene induced by reactive oxygen species and anitric oxide-releasing compound.** *Carcinogenesis*, v.21, n. 2, p. 281-7, 2000.

SPECHLER SJ, SOUZA RF. **Barrett's esophagus.** *N Engl J Med*, v.371, n. 9, p. 836-45, 2014.

SRIVASTAVA S, ZOU ZQ, PIROLLO K, *et al.* **Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome.** *Nature*, v.348, n. 6303, p. 747-9, 1990.

SU W, JACKSON S, TJIAN R, *et al.* **DNA looping between sites for transcriptional activation: self-association of DNA-bound Sp1.** *Genes Dev*, v.5, n. 5, p. 820-6, 1991.

SUEHIRO T, KANEDA T, IKEDA Y, *et al.* **Regulation of human glucocorticoid receptor gene transcription by Sp1 and p53.** *Mol Cell Endocrinol*, v.222, n. 1-2, p. 33-40, 2004.

SUZUKI HI, YAMAGATA K, SUGIMOTO K, *et al.* **Modulation of microRNA processing by p53.** *Nature*, v.460, n. 7254, p. 529-33, 2009.

SUZUKI T, KIMURA A, NAGAI R, *et al.* **Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 an the DNA-binding domais of Sp1 on and through DNA binding.** *Genes Cells*, v.5, n. 1, p. 29-41.

SYRJÄNEN KJ. **HPV infections and oesophageal cancer.** *J Clin Pathol*, v.55, n. 10, p. 721-8, 2002.

- TAN HH, PORTER AG. **p21(WAF1) negatively regulates DNMT1 expression in mammalian cells.** Biochem Biophys Res Commun, v.382, n. 1, p. 171-6, 2009.
- TEGTMEYER P, SCHWARTZ M, COLLINS JK, *et al.* **Regulation of tumor antigen synthesis by simian virus 40 gene A.** J Virol, v.16, n. 1, p. 168-78, 1975.
- TEGTMEYER P, RUNDELL K, COLLINS JK. **Modification of simian virus 40 protein A.** J Virol, v.21, n. 2, p. 647-57, 1977.
- TNM Classificação de tumores malignos.** UICC União Internacional contra o câncer. Ministério da Saúde, Secretaria de atenção à saúde, Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2013. 254p.
- VAN HAGEN P, HULSHOF MC, VAN LANSCHOT JJ, *et al.* **Preoperative chemoradiotherapy for esophageal or junctional cancer.** N Engl J Med, v. 366, n. 22, p. 2074-84, 2012.
- VAUGHAN C, PEARSALL, L YEUDALL A, *et al.* **p53: its mutations and their impact on transcription.** Subcell Biochem, v. 85, p. 71-90, 2014.
- VERTINO PM, YEN RW, GAO J, *et al.* **De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase.** Mol Cell Biol, v. 16, n. 8, p. 4555-65, 1996.
- WALERYCH D, LISEK K, DEL SAL G. **Mutant p53: One, no one and one hundred thousand.** Front Oncol, v. 5, p. 289, 2015.
- WANG J, ZHAO SL, LI Y, *et al.* **4-(Methylnitrosamino)-1-(30pyridyl)-1-butanone induces retinoic acid receptor β hypermethylation through DNA methyltransferase 1 accumulation in esophageal squamous epithelial cells.** Asian Pac J Cancer Prev, v. 13, n. 5, p. 2207-12, 2012.

- WANG L, WEI D, HUANG S, *et al.* **Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer.** Clin Cancer Res, v. 9, n. 17, p. 6371-80, 2003.
- WANG MJ, PEI DS, QIAN GW, *et al.* **p53 regulates Ki-67 promoter activity through p53- and Sp1-dependent manner in HeLa cells.** Tumour Biol, v. 32, n. 5, p. 905-12, 2011.
- WANG X, FENG Y, PAN L, *et al.* **The proximal GC-rich region of p16(INK4a) gene promoter plays a role in its transcriptional regulation.** Mol Cell Biochem, v. 301, n. 1-2, p. 259-66, 2007.
- WATERS TR e SWANN PF. **Kinetics of the action of Thymine-DNA glycosylase.** J Biol Chem, v. 273, n.32, p. 20007 – 20014, 1998.
- WERNER H, STANNARD B, BACH MA, *et al.* **Cloning and characterization of the proximal promoter region of the rat insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene.** Biochem Biophys Res Commun, v. 169, n.3, p. 1021-7, 1990.
- WICK M, ZUBOY D, HAGEN G. **Genomic organization and the promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT).** Gene, v. 232, n.1, p. 97-106, 1999.
- WONG DJ, BARRETT MT, STÖGER R, *et al.* **p16INK4a promoter is hypermethylated at a high frequency in esophageal adenocarcinomas.** Cancer Res, v. 57, n.13, p. 2619-22, 1997.
- WU J, XUE L, WENG M, *et al.* **Sp1 is essential for p16 expression in human diploid fibroblasts during senescence.** PLoS One, v. 2, n.1, p. e164, 2007.
- XIAO H, HASEGAWA T, ISOBE K. **p300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21 (waf1/cip1) promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor.** J Biol Chem, v. 275, n. 2, p. 1371-6, 2000.

- XING EP, NIE Y, WANG LD, *et al.* **Aberrant methylation of p16INK4a and deletion of p15INK4b are frequent events in human esophageal cancer in Linxian, China.** *Carcinogenesis*, v. 20, n. 1, p. 77-84, 1999.
- YANG M, LIU R, SHENG J, *et al.* **Differential expression profiles of microRNAs as potential biomarkers for the early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma.** *Oncol Rep*, v. 29, n.1, p. 169-76, 2013.
- YAKUSHIJI T, UZAWA K, SHIBAHARA T, *et al.* **Over-expression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of the oral cavity.** *Int J Oncol*, v. 22, n.6, p. 1201-7, 2003.
- ZHANG Y, LIU T, MEYER CA, *et al.* **Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS).** *Genome Biol*, v.9, n.9, p.137, 2008.
- ZHANG Y, COILLIE SV, FANG JY, *et al.* **Gain of function of mutant p53:R282W on the peak?** *Oncogenesis*, v.5, p. e196, 2016.
- ZHU JL, KAYTOR EN, PAO CI, *et al.* **Involvement of Sp1 in the transcriptional regulation of the rat insulin-like growth factor-1 gene.** *Mol Cell Endocrinol*, v.164, n.1-2, p.205,-18, 2000.

8. ANEXOS

Anexo 1



Memo 440/11-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 5 de dezembro de 2011.

A(o): Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 116/11 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
CAAE – 0086.0.007.000-11
Título do Estudo – Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA **aprovou** após reanálise o estudo intitulado: **Marcadores Moleculares de Tumores Secundários de Esôfago em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em Cabeça e Pescoço: Uso Potencial no Diagnóstico Precoce e na Terapia de Rotina versão 2**, bem como seu TCLE para estudo prospectivo **CECP versão 3** e TCLE para estudo retrospectivo **CECP e CEE versão 3**, em 30 de novembro de 2011.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

C/c – Dr. Luiz Augusto Maltoni – Direção Geral

Anexo 2

Tabela 1: Perfil de mutações em *TP53* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) de pacientes matriculados no INCA e compreendidos neste estudo.

Matricula	Localização Genoma	Referência	Alteração	Tipo de Mutação	Localização	Troca Aminoácido
5111635	chr17:7577571	A	T	<i>Missense</i>	exon7	M237K
5112944	chr17:7578235	T	C	<i>Missense</i>	exon6	Y205C
5114024	chr17:7577144	A	G	<i>Missense</i>	exon8	L265P
5114773	chr17:7577539	G	C	<i>Missense</i>	exon7	R248G
5115702	chr17:7577532	G	A	<i>Missense</i>	exon7	P250L
5116036	chr17:7577518	T	A	<i>Missense</i>	exon7	I255F
5116179	chr17:7578402	G	C	<i>Missense</i>	exon5	C176W
5117125	chr17:7577098	T	A	<i>Missense</i>	exon8	R280S
5123603	chr17:7578535	T	C	<i>Missense</i>	exon5	K132R
5124146	chr17:7578190	T	C	<i>Missense</i>	exon6	Y220C
5125704	chr17:7579329	T	C	<i>Missense</i>	exon4	K120E
5127027	chr17:7577114	C	T	<i>Missense</i>	exon8	C275Y
	chr17:7573867	A	G	<i>Unknown</i>	Intron	
	chr17:7574469	T	C	<i>Unknown</i>	intron	
5127091	chr17:7574470	G	A	<i>Unknown</i>	intron	
	chr17:7574481	T	C	<i>Unknown</i>	intron	
	chr17:7577100	T	A	<i>Nonsense</i>	exon8	R280X
	chr17:7578235	T	C	<i>Missense</i>	exon6	Y205C
5127930	chr17:7578271	T	A	<i>Missense</i>	exon6	H193L
5130165	chr17:7578190	T	C	<i>Missense</i>	exon6	Y220C
5130672	chr17:7574469	T	C	<i>Unknown</i>	Intron	
5130894	chr17:7578263	G	A	<i>Nonsense</i>	exon6	R196X
5132746	chr17:7578203	C	A	<i>Missense</i>	exon6	V216L
5112910	chr17:7577499	C	T	<i>Missense</i>	exon7	S261N
5133877	chr 17:7577499	C	T	<i>Missense</i>	exon7	S261N
5134334	chr 17:7578271	T	A	<i>Missense</i>	exon6	H193L
	chr 17:7578500	G	A	<i>Nonsense</i>	exon5	Q144X
5115763	chr 17:7578503	C	T	<i>Missense</i>	exon5	G427A
5127970	chr17:7577550	C	A	<i>Missense</i>	exon7	G244V

Anexo 3

Tabela 2: Perfil de mutações em *TP53* em carcinoma epidermóide de esôfago (CEE) de pacientes cujos dados foram depositados no *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e compreendidos neste estudo.

Amostra	Localização Genoma	Tipo de Mutação	Troca Aminoácido
TCGA-IG-A3I8-01	chr17:7578406	Missense	R175H
TCGA-IG-A3QL-01	chr17:7577530	IF del	P250_I251delinsL
TCGA-IG-A3Y9-01	chr17:7577094	Missense	R282W
TCGA-IG-A3YA-01	chr17:7578406	Missense	R175H
TCGA-IG-A3YB-01	chr17:7578547	FS del	P128Lfs*42
TCGA-IG-A3YC-01	chr17:7578493	Nonsense	W146*
TCGA-IG-A4P3-01	chr17:7577106	Missense	P278S
TCGA-IG-A50L-01	chr17:7577114	Missense	C275F
TCGA-IG-A51D-01	chr17:7577567	FS del	C238*
TCGA-IG-A5B8-01	chr17:7578190	Missense	Y220C
TCGA-IG-A5S3-01	chr17:7577105	Missense	P278H
TCGA-IG-A625-01	chr17:7578176	Splice	X224_splice
TCGA-IG-A6QS-01	chr17:7577556	Missense	C242Y
TCGA-IG-A8O2-01	chr17:7578427	Missense	H168R
TCGA-IG-A97H-01	chr17:7578291	Splice	X187_splice
TCGA-IG-A97I-01	chr17:7577538	Missense	R248Q
TCGA-JY-A6FA-01	chr17:7578257	Nonsense	E198*
TCGA-JY-A6FD-01	chr17:7577022	Nonsense	R306*
TCGA-JY-A6FE-01	chr17:7578439	FS del	K164Sfs*6
TCGA-JY-A6FG-01	chr17:7577120	Missense	R273H
TCGA-L5-A43H-01	chr17:7578526	FS ins	C135Lfs*14
TCGA-L5-A43J-01	chr17:7578190	Missense	Y220C
TCGA-L5-A4OM-01	chr17:7578370	Splice	X187_splice
TCGA-L5-A88S-01	chr17:7576897	Nonsense	Q317*
TCGA-L5-A88Z-01	chr17:7578407	Missense	R175G
TCGA-L5-A8NK-01	chr17:7578260	Missense	V197L
TCGA-L5-A8NQ-01	chr17:7578235	Missense	Y205C
TCGA-L7-A56G-01	chr17:7577535	Missense	R249M
TCGA-LN-A49K-01	chr17:7579321	FS del	V122Dfs*26
TCGA-LN-A49L-01	chr17:7578547	FS del	P128Lfs*42
TCGA-LN-A49M-01	chr17:7578212	Nonsense	R213*
TCGA-LN-A49N-01	chr17:7577527	FS del	L252Sfs*93
TCGA-LN-A49O-01	chr17:7578403	Missense	C176Y
TCGA-LN-A49P-01	chr17:7577610	Splice	X225_splice
TCGA-LN-A49R-01	chr17:7578370	Splice	X187_splice
TCGA-LN-A49S-01	chr17:7574003	Nonsense	R342*
TCGA-LN-A49U-01	chr17:7579315	Nonsense	C124*
TCGA-LN-A49V-01	chr17:7577094	Missense	R282G
TCGA-LN-A49W-01	chr17:7577121	Missense	R273C
TCGA-LN-A49X-01	chr17:7578461	Missense	V157F
TCGA-LN-A49Y-01	chr17:7577114	Missense	C275F
TCGA-LN-A4A1-01	chr17:7578457	Missense	R158L
TCGA-LN-A4A2-01	chr17:7578556	Splice	X126_splice
TCGA-LN-A4A3-01	chr17:7577058	Nonsense	E294*
TCGA-LN-A4A4-01	chr17:7577498	Splice	X261_splice
TCGA-LN-A4A5-01	chr17:7577538	Missense	R248Q
TCGA-LN-A4A6-01	chr17:7579358	Missense	R110L
TCGA-LN-A4A8-01	chr17:7578394	Missense	H179R
TCGA-LN-A4A9-01	chr17:7578528	Missense	F134L
TCGA-LN-A4MQ-01	chr17:7577566	IF del	C238_N239delinsY
TCGA-LN-A4MR-01	chr17:7578406	Missense	R175H
TCGA-LN-A5U5-01	chr17:7577595	FS del	C229Lfs*18
TCGA-LN-A5U6-01	chr17:7579497	FS del	P64Qfs*84
TCGA-LN-A5U7-01	chr17:7578406	Missense	R175H

Amostra	Localização Genoma	Tipo de Mutação	Troca Aminoácido
TCGA-LN-A7HV-01	chr17:7577106	<i>Missense</i>	P278A
TCGA-LN-A7HW-01	chr17:7578266	<i>Missense</i>	I195F
TCGA-LN-A7HX-01	chr17:7578410	<i>Missense</i>	R174W
TCGA-LN-A7HY-01	chr17:7578179	<i>Nonsense</i>	E224*
TCGA-LN-A7HZ-01	chr17:7578191	<i>Missense</i>	Y220D
TCGA-LN-A8HZ-01	chr17:7574035	<i>Splice</i>	X332_splice
TCGA-LN-A8I0-01	chr17:7577124	<i>Missense</i>	V272M
TCGA-LN-A8I1-01	chr17:7577538	<i>Missense</i>	R248Q
TCGA-LN-A9FO-01	chr17:7578239	<i>Nonsense</i>	E204*
TCGA-LN-A9FP-01	chr17:7577058	<i>Nonsense</i>	E294*
TCGA-LN-A9FQ-01	chr17:7577022	<i>Nonsense</i>	R306*
TCGA-LN-A9FR-01	chr17:7578290	<i>Splice</i>	X187_splice
TCGA-Q9-A6FU-01	chr17:7577121	<i>Missense</i>	R273C
TCGA-S8-A6BW-01	chr17:7578553	<i>Missense</i>	Y126S
TCGA-V5-A7RC-01	chr17:7577018	<i>Splice</i>	X307_splice
TCGA-VR-A8EO-01	chr17:7578407	<i>Missense</i>	R175G
TCGA-VR-A8EP-01	chr17:7578526	<i>Missense</i>	C135Y
TCGA-VR-A8ER-01	chr17:7578265	<i>Missense</i>	I195N
TCGA-VR-A8EU-01	chr17:7577515	<i>IF del</i>	I255del
TCGA-VR-A8EW-01	chr17:7578556	<i>Splice</i>	X126_splice
TCGA-VR-A8EX-01	chr17:7574000	<i>Nonsense</i>	E343*
TCGA-VR-A8EY-01	chr17:7579563	<i>FS del</i>	D42lfs*2
TCGA-VR-A8EZ-01	chr17:7578542	<i>Missense</i>	L130V
TCGA-VR-A8Q7-01	chr17:7577106	<i>Missense</i>	P278A
TCGA-VR-AA4G-01	chr17:7579406	<i>Nonsense</i>	S94*
TCGA-VR-AA7B-01	chr17:7578442	<i>Missense</i>	Y163C
TCGA-VR-AA7D-01	chr17:7578479	<i>Missense</i>	P151S
TCGA-XP-A8T6-01	chr17:7578212	<i>Nonsense</i>	R213*
TCGA-XP-A8T8-01	chr17:7579369	<i>Missense</i>	S106R
TCGA-Z6-A8JD-01	chr17:7577120	<i>Missense</i>	R273H
TCGA-Z6-A8JE-01	chr17:7578271	<i>Missense</i>	H193R
TCGA-Z6-A9VB-01	chr17:7579361	<i>Missense</i>	F109S
TCGA-Z6-AAPN-01	chr17:7577118	<i>Missense</i>	V274L