



Ministério Da Saúde
Instituto Nacional De Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

Diego Camuzi Cassiano

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM *FBXL7* E
SEU IMPACTO NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ESÔFAGO E
CABEÇA E PESCOÇO**

Orientadores: Dra. Sheila Coelho Soares Lima
Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Rio de Janeiro

2020



Ministério Da Saúde
Instituto Nacional De Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

Diego Camuzi Cassiano

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM *FBXL7* E
SEU IMPACTO NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ESÔFAGO E
CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientadores: Dra. Sheila Coelho Soares Lima
Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Rio de Janeiro

2020

C345i Cassiano, Diego Camuzi.

Identificação de alterações moleculares em *FBXL7* e seu impacto nos carcinomas epidermóides de esôfago e cabeça e pescoço. – Rio de Janeiro, 2020.

xxi, 194 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia,
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2020.

Orientadores: Dra. Sheila Coelho Soares Lima e Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto.

1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço - genética. 2. Carcinoma de Células Escamosas- genética. 3. Neoplasias Esofágicas - genética. I. Lima, Sheila Coelho Soares (Orient.). II. Pinto, Luis Felipe Ribeiro (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.994531

Catlogação na fonte

Kátia Simões CRB7/595



Ministério Da Saúde
Instituto Nacional De Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

Diego Camuzi Cassiano

**IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM *FBXL7* E SEU IMPACTO
NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ESÔFAGO E CABEÇA E PESCOÇO**

Orientadores: Dra. Sheila Coelho Soares Lima
Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Aprovado em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Drª Adriana Madeira Alvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo UFES

Drª Mariana Lima Boroni Martins
Instituto Nacional de Câncer (INCA)

Drª Marcia Maria Chiquitelli Marques Silveira
Hospital das Clínicas de Barretos

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Leila Pelegrini Camuzi,
pelo amor, dedicação e ser incrível.

À minha avó, Maria Helena Pelegrini,
por ser maravilhosa.

AGRADECIMENTOS

Primeiro à Deus, por tudo.

Na realidade, eu não quero apenas agradecer e sim dedicar essa dissertação a metade das pessoas que vou citar. Durante minha estadia no INCA, não houve relação desperdiçada. Todos contribuíram nem que seja com um tijolinho para meu crescimento pessoal, profissional e, conseqüentemente, para essa dissertação. Mas antes, quero agradecer a mim mesmo, porque não foi fácil. Já peço desculpas se esqueci de alguém.

À família, minha mãe Leila e avó Maria Helena meus maiores exemplos de vida. Tios (Paulo Cesar, Sueli, Chiquita e Carmen Lúcia), primos (Paula, Mateus, Marcela, Marina, Davy, Pedro, Maria Helena, Bruno, Ranieri, Sara, Karina, Renata Viviane, Ana, Fernanda etc) e irmã Milena.

Sem dúvidas o Rio e o trabalho não seriam tão fáceis sem as amizades. Vou começar pelos amigos de fora do INCA, limitando aos mais próximos. Eles não são cariocas assim como eu, e acabamos virando uma família. Renan, Neto, Gigi, Fábio, Cezinha e Amanda.

Quanto aos amigos de INCA: No PCM; Brunão, Marina (chata), Eduardo, Paula, Graci, Pedro(s), Mariana, Natália, Fernando, Madu, Jade, Carol, Andréia, Monique, André, Flávia, Jennifer, Tatiana, Bruna, Fernanda, Rachele, Leão e Andréia(s). PHOP; Felipe, Clara, Cristóvão, Elissa, Thon, Victor, Gisele, Carol, Bruno, Dr^a Socorro, Fran, Ingrid e Rô. DIPAT; Dr^a Ivanir, Dani, Daniel e Priscila. BNT; Diego. Endoscopia; Simone e Aparecida. “AbduLab”; Luísa, Karina, Mariana, Breno, Lenovo e Giovana. Secretaria; Rodrigo e Dani. Alojamento; Valdo, Aylton, Reginaldo, Larissa, Taisnara, Jéssica, Mariana, Alberto e Cássio.

Aos que passaram: Igor, Davy e Dani, Luiza, Alice, Tales, Ricardo, Isabela, Isabelle, Liliam, Juan, Pati, Alda, Eugenia e Luísa.

Às agências de fomento pela incansável luta no avanço da ciência e educação Brasileira, apesar dos percalços.

Por fim, agradeço imensamente a oportunidade dada pelo Dr. Luís Felipe de fazer parte do PCM e por ter me direcionado para a maravilhosa Dr^a Sheila, atual orientadora, amiga e a pessoa mais apaixonada pela ciência que já conheci.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.”

-Paulo Freire, 1996.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 24 |
| 1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTIMATIVAS..... | 24 |
| 1.2 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO: FATORES DE RISCO | 25 |
| 1.3 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO | 27 |
| 1.3.1 CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO HPV-..... | 27 |
| 1.3.2 CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE OROFARINGE HPV+..... | 28 |
| 1.4 CAMPO DE CANCERIZAÇÃO NOS PACIENTES COM CECR | 29 |
| 1.5 CARCER DE ESÔFAGO: ESTIMATIVAS..... | 30 |
| 1.6 CÂNCER DE ESÔFAGO: FATORES DE RISCO | 30 |
| 1.7 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO: ALTERAÇÕES MOLECULARES..... | 31 |
| 1.8 BIOMARCADORES | 32 |
| 1.8.1 DEFINIÇÃO DE BIOMARCADORES | 32 |
| 1.8.2 CURVA CARACTERÍSTICA DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR..... | 32 |
| 1.9 BIOMARCADORES & EPIGENÉTICA..... | 35 |
| 1.9.1 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA | 35 |
| 1.9.2 METILAÇÃO DO DNA | 37 |
| 1.10 PROTEÍNA F-BOX E RICA EM REPETIÇÃO P DE LEUCINA 7 (FBXL7) | 39 |
| 1.10.1 FBXL7: DA BIOLOGIA AO CÂNCER | 40 |
| 1.11 JUSTIFICATIVA | 42 |
| 2 OBJETIVOS | 43 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 43 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 44 |
| 3.1 ÉTICA..... | 44 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.2 | SOBRE A ORIGEM DE AMOSTRAS HUMANAS E DE DADOS PARA ANÁLISES <i>IN SILICO</i> | 44 |
| 3.2.1 | AMOSTRAS HUMANAS..... | 44 |
| 3.2.2 | AMOSTRAS HUMANAS PARA ANÁLISES DE HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL DE CEE..... | 44 |
| 3.2.3 | DADOS PÚBLICOS DE AMOSTRAS HUMANAS DEPOSITADOS | 45 |
| 3.3 | ANÁLISES <i>IN SILICO</i> | 47 |
| 3.3.1 | MICROARRANJO DE METILAÇÃO DO DNA DO GRUPO..... | 47 |
| 3.3.2 | MICROARRANJO DE EXPRESSÃO GÊNICA DO GRUPO | 48 |
| 3.3.3 | QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNA) E EXPRESSÃO DE <i>FBXL7</i> | 49 |
| 3.3.4 | PERFIL DE METILAÇÃO DE <i>MER4A1</i> GENÔMICO | 50 |
| 3.4 | EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PUREZA DE ÁCIDOS NUCLEICOS..... | 50 |
| 3.4.1 | EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO CONGELADO | 51 |
| 3.4.2 | EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDO CONGELADO | 51 |
| 3.4.3 | EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO..... | 52 |
| 3.4.4 | QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PUREZA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS PELO MÉTODO DE ABSORVÂNCIA | 53 |
| 3.4.5 | AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VIRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) NAS AMOSTRAS DE CEOF | 53 |
| 3.5 | TRATAMENTO DO RNA COM DNase I E TRANSCRIÇÃO REVERSA | 54 |
| 3.5.1 | TRATAMENTO DO RNA COM DNase I..... | 54 |
| 3.5.2 | REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA | 54 |
| 3.6 | REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (PCRq) | 55 |
| 3.7 | TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO, REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO POR PIROSEQUENCIAMENTO..... | 58 |
| 3.7.1 | TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO | 58 |
| 3.7.2 | REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE (PCR) | 59 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.7.3 | PIROSSEQUENCIAMENTO | 62 |
| 3.8 | IMUNOHISTOQUIMICA (IHQ) | 64 |
| 3.9 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 66 |
| 3.9.1 | ANÁLISES DE DISTRIBUIÇÃO, GRUPOS E TESTES ADOTADOS | 66 |
| 3.9.2 | ANÁLISES DE SOBREVIDA | 66 |
| 3.9.3 | MATRIZES DE CONFUSÃO, CURVA ROC (CARACTERÍSTICA DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR) E DETERMINAÇÃO DE VALORES DE DISCRIMINAÇÃO | 66 |
| 3.9.4 | CÁLCULO DO VALOR DE CORTE DA CURVA RIC | 67 |
| 3.9.5 | OBTENDO A ACURÁCIA NAS AMOSTRAS DO MICROARRANJO DE METILAÇÃO | 68 |
| 4 | RESULTADOS | 69 |
| 4.1 | PERFIL DE METILAÇÃO DE <i>FBXL7</i> COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO NO CEE E CECF | 69 |
| 4.1.1 | POTENCIAL BIOMARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO NO CEE | 69 |
| 4.1.2 | POTENCIAL BIOMARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO NOS CECF ... | 77 |
| 4.2 | <i>FBXL7</i> COMO MARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO DO EPITÉLIO LIGADO À EXPOSIÇÃO AOS FATORES DE RISCO..... | 82 |
| 4.2.1 | METILAÇÃO DE <i>FBXL7</i> EM ADE | 82 |
| 4.2.2 | METILAÇÃO DE <i>FBXL7</i> EM ADENOCARCINOMAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE PULMÃO..... | 84 |
| 4.2.3 | METILAÇÃO DE <i>FBXL7</i> EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE CERVICAL | 86 |
| 4.2.4 | METILAÇÃO DE <i>FBXL7</i> EM CEOF..... | 87 |
| 4.3 | METILAÇÃO E REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNA _m DE <i>FBXL7</i> | 88 |
| 4.3.1 | CEE | 89 |
| 4.3.2 | CEL..... | 92 |
| 4.4 | ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA | 95 |
| 4.5 | NÍVEIS PROTEICOS DE <i>FBXL7</i> E SEUS ALVOS BIRC5 E AURKA | 97 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.5.1 | CEE | 97 |
| 4.5.2 | CEL..... | 109 |
| 4.5.3 | CEOF..... | 121 |
| 4.6 | PERFIL DE METILAÇÃO EM cg11339964 COMO REGULADOR DE ENHANCER OU DE RETROVÍRUS HUMANO ENDÓGENO | 135 |
| 4.6.1 | PERFIL DE METILAÇÃO EM cg11339964 COMO REGULADOR DA ATIVIDADE DE ENHANCER | 135 |
| 4.6.2 | PERFIL DE METILAÇÃO EM cg11339964 COMO REGULADOR DA ATIVIDADE DO RETROVÍRUS ENDÓGENO <i>MER4A1</i> | 139 |
| 5 | DISCUSSÃO | 142 |
| 5.1 | CONCLUSÕES | 155 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 156 |
| 7 | SUPLEMENTARES..... | 174 |
| 7.1 | SUPLEMENTAR I - ISOFORMAS DE <i>FBXL7</i> NA PLATAFORMA GTE _x ... | 174 |
| 8 | ANEXOS | 175 |
| 8.1 | ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO PELO AUTOR DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO | 175 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 3.1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das isoformas gênicas de <i>FBXL7</i> , <i>MER4A1</i> , <i>TYK2</i> , <i>TARBP2</i> e <i>GAPDH</i> (gene - referência) na PCRq..... | 56 |
| Quadro 3.2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões contendo sítios CpGs para técnica de pirosequenciamento. | 60 |
| Quadro 3.3 - Concentração de cada reagente utilizado na reação de PCR com DNA modificado. | 61 |
| Quadro 3.4 – Condições de temperatura e ciclagem das reações de PCR. | 61 |
| Quadro 3.5 – Anticorpos utilizados na IHQ e respectivas diluições e tempos de incubação. | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 4.1 - Lista das dez sondas localizadas no corpo do gene <i>FBXL7</i> com maior acurácia para distinguir o carcinoma epidermoide de esôfago e o tecido adjacente não tumoral. O rank das sondas está ordenado pelo valor de acurácia (AUC)..... | 71 |
| Tabela 4.2 - Associações entre o perfil de metilação de <i>FBXL7</i> e dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago. | 76 |
| Tabela 4.3 - Avaliação das associações entre dados sociodemográficos ou clínicos dos pacientes com carcinoma epidermoide de laringe e o perfil de metilação de <i>FBXL7</i> avaliado por pirosequenciamento..... | 79 |
| Tabela 4.4 – Dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago do INCA e suas associações com os níveis de RNAm da isoforma principal (isoforma 1) de <i>FBXL7</i> | 90 |
| Tabela 4.5 - Níveis de RNAm de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de laringe e sua associação com características clínicas e sociodemográficas dos pacientes. . | 93 |
| Tabela 4.6 - Associação entre características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 100 |
| Tabela 4.7 - Associação das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de <i>AURKA</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 104 |
| Tabela 4.8 - Associação das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de <i>BIRC5</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 108 |
| Tabela 4.9 - Associação das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes com a imunomarcagem citoplasmática de <i>FBXL7</i> em CEL. | 112 |
| Tabela 4.10 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de <i>AURKA</i> em CEL..... | 116 |
| Tabela 4.11 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de <i>BIRC5</i> em carcinoma epidermoide de laringe..... | 120 |
| Tabela 4.12 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de orofaringe. | 124 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 4.13 - Associação entre as características sociodemográficas ou clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de AURKA em carcinoma epidermoide de orofaringe. | 128 |
| Tabela 4.14 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de BIRC5 em carcinoma epidermoide de orofaringe. | 132 |
| Tabela 4.15 - Resumo das quantificações de imunomarcagem das proteínas FBXL7, AURKA e BIRC5 nos CEE e CECP. | 133 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Representação gráfica dos sítios anatômicos no trato aerodigestivo superior acometidos pelo CCP..... | 24 |
| Figura 1.2 – Representação da curva ROC e da matriz de confusão.. | 33 |
| Figura 1.3 – Os principais mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica..... | 36 |
| Figura 1.4 - Representação da regulação da expressão gênica, ativação de elementos repetitivos e <i>enhancers</i> pela metilação das citosinas do DNA. | 38 |
| Figura 1.5 – Representação esquemática do gene <i>FBXL7</i> e suas isoformas de expressão..... | 40 |
| Figura 3.1 - Esquema de coleta das biópsias em pacientes com CEE para avaliação de heterogeneidade intratumoral..... | 45 |
| Figura 3.2 - Exemplo de curva de dissociação de PCRq. | 57 |
| Figura 3.3 - Tratamento do DNA com bissulfito de sódio para determinar o estado de metilação dos genes de interesse. | 58 |
| Figura 3.4 - Esquema geral da técnica de pirosequenciamento.. | 63 |
| Figura 3.5 - Representação gráfica da curva ROC e como seria aplicada a fórmula do triângulo retângulo para estabelecimento do melhor ponto de corte..... | 67 |
| Figura 4.1 - <i>Heatmap</i> e dendrogramas do perfil de metilação de <i>FBXL7</i> em CEE e tecidos adjacentes não tumorais..... | 70 |
| Figura 4.2 – Perfil de metilação de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de esôfago determinado por microarranjo de metilação..... | 72 |
| Figura 4.3 - Avaliação do perfil de metilação da sonda cg11339964 de <i>FBXL7</i> determinado por pirosequenciamento em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago. | 73 |
| Figura 4.4 – Perfil de metilação de <i>FBXL7</i> determinado por pirosequenciamento no set de validação de carcinoma epidermoide de esôfago..... | 74 |
| Figura 4.5 – Perfil de heterogeneidade intratumoral dos níveis de metilação de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de esôfago. | 75 |
| Figura 4.6 – Sobrevida de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago de acordo com o perfil de metilação de <i>FBXL7</i> na posição cg11339964..... | 76 |
| Figura 4.7 – Perfil de metilação de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de laringe | 78 |
| Figura 4.8 – Perfil de metilação de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de cavidade oral..... | 81 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.9 - Perfil de metilação da sonda cg11339964 de <i>FBXL7</i> em adenocarcinoma de esôfago..... | 83 |
| Figura 4.10 - Perfil de metilação da sonda cg11339964 de <i>FBXL7</i> em tumores de pulmão, de acordo com a exposição ao tabaco | 85 |
| Figura 4.11 – Perfil de metilação da sonda cg11339964 de <i>FBXL7</i> na cérvix e carcinoma epidermoide cervical.. | 86 |
| Figura 4.12 – Perfil de metilação de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de orofaringe de acordo com a presença da infecção por HPV. | 88 |
| Figura 4.13 – Avaliação da expressão gênica da isoforma 1 de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 89 |
| Figura 4.14 - Avaliação da expressão gênica da isoforma 3 de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 91 |
| Figura 4.15 - Avaliação da expressão gênica da isoforma 1 de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de laringe..... | 92 |
| Figura 4.16 - Avaliação da expressão gênica da isoforma 3 de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de laringe..... | 94 |
| Figura 4.17 – Frequência de alterações de número de cópias de <i>FBXL7</i> em carcinomas epidermóides de esôfago, laringe e cavidade oral..... | 96 |
| Figura 4.18 - Imunoexpressão de <i>FBXL7</i> em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago e tecido adjacente não tumoral..... | 98 |
| Figura 4.19 – Quantificação da imunomarcção de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 99 |
| Figura 4.20 - Imunoexpressão de <i>AURKA</i> em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago e tecido adjacente não tumoral..... | 102 |
| Figura 4.21 - Quantificação da imunomarcção de <i>AURKA</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 103 |
| Figura 4.22 - Imunoexpressão de <i>BIRC5</i> em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago e tecido adjacente não tumoral..... | 106 |
| Figura 4.23 - Quantificação da imunomarcção de <i>BIRC5</i> em carcinoma epidermoide de esôfago..... | 107 |
| Figura 4.24 – Imunomarcção de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de laringe por imuno-histoquímica. | 110 |
| Figura 4.25 – Quantificação da imunomarcção de <i>FBXL7</i> em carcinoma epidermoide de laringe..... | 111 |

| | |
|---|-----|
| Figura 4.26 - Imunomarcção de AURKA em carcinoma epidemroide de laringe por imuno-histoquímica..... | 114 |
| Figura 4.27 - Quantificação da imunomarcção de AURKA em carcinoma epidermoide de laringe..... | 115 |
| Figura 4.28 - Imunomarcção de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe por imuno-histoquímica..... | 118 |
| Figura 4.29 - Quantificação da imunomarcção de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe..... | 119 |
| Figura 4.30 - Imunoexpressão de FBXL7 em carcinoma epidermoide de orofaringe | 122 |
| Figura 4.31 - Quantificação da imunomarcção de FBXL7 em carcinoma epidermoide de orofaringe..... | 123 |
| Figura 4.32 - Imunoexpressão de AURKA em carcinoma epidermodie de orofaringe.. | 126 |
| Figura 4.33 - Quantificação da imunomarcção de AURKA em carcinoma epidermoide de orofaringe..... | 127 |
| Figura 4.34 - Imunoexpressão de BIRC5 em carcinoma epidermoide de orofaringe.. | 130 |
| Figura 4.35 - Quantificação da imunomarcção de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe..... | 131 |
| Figura 4.36 - Correlação entre a marcação citoplasmática de FBXL7 e de seus alvos em carcinomas epidermoides de esôfago e cabeça e pescoço..... | 134 |
| Figura 4.37 – Visualização no UCSC GenomeBrowser da região genômica que inclui a sonda cg11339964 com trackers de ChromHMM e RepeatMasker ativos.. | 135 |
| Figura 4.38 – Avaliação dos possíveis genes regulados pela metilação diferencial da sonda cg11339964, anotada no corpo de <i>FBXL7</i> | 137 |
| Figura 4.39 – Avaliação da expressão de <i>TARBP2</i> e <i>TYK2</i> em carcinoma epidermoide de laringe..... | 138 |
| Figura 4.40 – Avaliação da expressão de <i>TARBP2</i> e <i>TYK2</i> em carcinoma epidermoide de esôfago. A e C..... | 139 |
| Figura 4.41 – Perfil de metilação de todos os retrovírus endógenos humanos MER4A1 presentes no genoma humano e passíveis de análise pelo microarranjo de metilação nos pacientes de CEE, CEL e CECO do INCA e CEOF (GSE38271). | 140 |
| Figura 4.42 – Avaliação da expressão de MER4A1 em carcinoma epidermoide de esôfago. | 141 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-----------|---|
| 3'UTR | Região 3' Não Traduzida |
| 5caC | 5-Carboxilcitosina |
| 5fC | 5-Formilcitosina |
| 5hmC | 5-Hidroxi-Metilcitosina |
| 5hmU | 5-Hidroxi-Metiluracila |
| 5mC | 5-Metilcitosina |
| ADE | Adenocarcinoma de Esôfago |
| Adj | Tecido Adjacente Não Tumoral |
| AID | Desaminase de Citidina Induzida Por Ativação |
| APOBEC | Enzima de Edição De RNAm De Apolipoproteína B, Tipo Polipeptídeo Catalítico |
| AUC | Acurácia, Do Inglês <i>Area Under The Curve</i> |
| AURKA | Aurora A Kinase |
| BER | Reparo por Excisão de Base |
| BIRC5 | Inibidor Baculoviral da Apoptose Contendo Cinco Repetições |
| BNT | Banco Nacional de Tumores |
| b-value | Valores de Beta |
| CCND1 | Ciclina D1 |
| CCP | Câncer de Cabeça e Pescoço |
| CDK4 | Quinase 4 Dependente de Ciclina |
| CDK6 | Quinase 6 Dependente de Ciclina |
| CDKN2A | Inibidor De Quinase Dependente De Ciclina 2A |
| cDNA | DNA Complementar |
| CE | Câncer De Esôfago |
| CECO | Carcinoma Epidermoide de Cavidade Oral |
| CECP | Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço |
| CEE | Carcinoma Epidermoide de Esôfago |
| CEL | Carcinoma Epidermoide de Laringe |
| CEOF | Carcinoma Epidermoide de Orofaringe |
| CEOF-HPV- | Carcinoma Epidermoide de Orofaringe Não Infectado Pelo HPV+ |
| CEOF-HPV+ | Carcinoma Epidermoide de Orofaringe Infectado Pelo HPV |
| CNA | Alteração no Número De Cópias |
| CT | Ciclo de Threshold |

| | |
|------------|--|
| ctDNA | DNA Circulante de Origem Tumoral |
| CTTN | Cortactina |
| DIPAT/INCA | Divisão de Patologia do INCA |
| DNMT | DNA Metiltransferases |
| DRGE | Doença do Refluxo Gastroesofágico |
| DRGE | Doença do Refluxo Gastroesofágico |
| E1 | Enzimas Ativadoras de Ubiquitinação |
| E2 | Enzimas Conjugadoras de Ubiquitinação |
| E3 | Enzimas Proteína-Ubiquitina Ligases |
| EGFR | Receptor Do Fator De Crescimento Epidérmico |
| ER | Elemento Repetitivo |
| ERVs | Retrovírus Endógeno |
| FADD | Domínio de Morte Associado ao FAS |
| FBXL7 | F-Box e Rica Em Repetição de Leucina 7 |
| FDA | Food And Drug Administration |
| FN | Falsos Negativos |
| FP | Falsos Positivos |
| GEO | Gene Expression Omnibus |
| GST | Gene Supressor Tumoral |
| HAT | Histona Acetiltransferase |
| HCPA | Hospital das Clínicas de Porto Alegre |
| HDAC | Histona Desacetilase |
| HDM | Histona Desmetilase |
| HMT | Histona Metiltransferase |
| HOXA9 | Proteína Homeobox Hox-A9 |
| HPV | Papilomavírus Humano |
| HUPE-UERJ | Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| IHQ | Imunohistoquímica |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva |
| MT1M | Metalotioneína-1M |
| ncRNAs | RNAs Não Codificantes |
| NEFH | Neurofilamento, Polipeptídeo Pesado |
| NIH | National Institute Of Health |

| | |
|------------------|--|
| OR | Razão de Chances |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase (Polimerase Chain Reaction) |
| PCRq | PCR Quantitativa |
| pRb | Proteína do Retinoblastoma |
| RNA _m | RNA Mensageiro |
| ROC | Do Inglês, <i>Receiver Operating Characteristic</i> |
| RT | Transcrição Reversa |
| SAH | S-Adenosil Homocisteína |
| SAM | S-Adenosil Metionina |
| SCF | Skp1-Cullin-F-Box |
| SNP | Polimorfismos de Nucleotídeo Único |
| STP | Segundos Tumores Primários |
| T | Tumor |
| TAS | Trato Aerodigestivo Superior |
| TCGA | The Cancer Genome Atlas |
| TCGA-ESCA | Projeto de Câncer de Esôfago do TCGA |
| TCGA-HNSC | Projeto de Carcinomas Epidermóides de Cabeça e Pescoço do TCGA |
| TP53 | Proteína do Tumor P53 |
| UCHL1 | Hidrolase Carboxi-Terminal Da Ubiquitina L1 |
| VN | Verdadeiros Negativos |
| VP | Verdadeiros Positivos |



Ministério Da Saúde
Instituto Nacional De Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM *FBXL7* E SEU IMPACTO NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ESÔFAGO E CABEÇA E PESCOÇO

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Diego Camuzi Cassiano

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) compreende ~90% dos cânceres de cabeça e pescoço e afeta diferentes localizações anatômicas, dentre elas cavidade oral, orofaringe e laringe (CECO, CEOF, CEL). Com exceção dos CEOF associados à infecção pelo papilomavírus humano (HPV), os principais fatores de risco no CECP são o álcool e tabaco. A sobrevida global de pacientes acometidos por CECP é de cerca de 50% em cinco anos, porém uma proporção significativa desenvolve um segundo tumor primário (STP). Pacientes com CECP têm como um dos principais sítios acometidos por STP o esôfago, o que diminui sua sobrevida para menos de 20%. O carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) corresponde a até 88% dos casos e tem o álcool e tabaco como principais fatores de risco. A exposição concomitante dos epitélios da cabeça e pescoço e esôfago ao etanol e à fumaça do cigarro pode criar um campo de cancerização favorecendo o aparecimento de tumores sincrônicos ou metacrônicos. Baseado nisto, nosso grupo vem buscando biomarcadores moleculares que possam auxiliar na compreensão do desenvolvimento do campo de cancerização no trato aerodigestivo superior e no diagnóstico diferencial dos tumores associados. Inicialmente, foi realizado um microarranjo de metilação utilizando a plataforma Infinium 450K, em que o perfil de metilação de *FBXL7* foi capaz de distinguir os tumores e o tecido adjacente não tumoral de pacientes com CEE com 100% de sensibilidade e especificidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações moleculares de *FBXL7* e suas possíveis consequências em CEE e CECP. Inicialmente, as análises de microarranjo de metilação foram estendidas para um número maior de amostras de CEE. Identificamos uma sonda hipometilada localizada no corpo de *FBXL7*, cg11339964, nos tumores, com alto potencial de discriminação em relação ao tecido adjacente. Estabelecemos pontos de corte em sets de treino para o CEE e CEL, resultando em sensibilidade: 73,08%, especificidade: 94,12% e acurácia: 85,0% e sensibilidade: 83,33%, especificidade: 87,18%, e acurácia: 85,19%, respectivamente. A sonda cg11339964 estava hipometilada em diversos tumores associados ao álcool e tabaco e sem alterações nos tumores associados ao HPV como câncer cervical. Não encontramos correlação entre a metilação em cg11339964 e a expressão da isoforma principal de *FBXL7*. Por imunohistoquímica, a expressão de *FBXL7* não mostrou correlação com os níveis de AUKA e BIRC5, seus alvos proteicos de degradação, no CEE e CECP. A região genômica da sonda cg11339964 engloba ainda um retrovírus endógeno, MER4A1, e uma região de *enhancer*. Porém, não foram observadas diferenças de expressão entre adjacente e tumor ou correlação da metilação em cg11339964 com a expressão de MER4A1 em CEE e CEL. Análises de correlação dos níveis de metilação de cg11339964 com a expressão de todos os genes humanos no CEL identificaram *TYK2*, superexpresso em CEE, como provável alvo do *enhancer*. Este foi o primeiro estudo identificando as alterações moleculares de *FBXL7* em CEE e CECP. Os altos valores discriminatórios em tumores associados ao álcool e tabaco apontam a hipometilação em cg11339964 como potencial biomarcador de transformação do tecido associado à carcinogênese química.



Ministério Da Saúde
Instituto Nacional De Câncer
Coordenação de pós-graduação

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

IDENTIFICATION OF *FBXL7* MOLECULAR ALTERATIONS AND THEIR IMPACT ON SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE ESOPHAGUS AND HEAD AND NECK

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION

Diego Camuzi Cassiano

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) comprises ~90% of head and neck cancers and affects different anatomical locations, including oral cavity, oropharynx and larynx (OSCC, OPSCC, LSCC). With the exception of OPSCC associated with human papillomavirus (HPV) infection, the main risk factors in HNSCC are alcohol and tobacco. The overall survival of patients affected by HNSCC is about 50% in five years, but a significant proportion of the patients develops a second primary tumor (SPT). Esophagus is one of the main sites affected by SPT in HNSCC, reducing patients' survival to less than 20%. Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) corresponds to up to 88% of cases and has alcohol and tobacco as the main risk factors. Concomitant exposure of the epithelium of the head and neck and esophagus to ethanol and cigarette smoke can create a field of cancerization, favoring the appearance of synchronous or metachronic tumors. Based on this, our group has been looking for molecular biomarkers that can help understanding the development of the cancer field in the upper aerodigestive tract and in the differential diagnosis of associated tumors. Initially, a methylation microarray was performed using the Infinium 450K platform, in which *FBXL7* methylation profile was able to distinguish the tumors and the adjacent non-tumor tissue of ESCC patients with 100% sensitivity and specificity. Thus, the objective of this work was to evaluate *FBXL7* molecular changes of and their possible consequences in ESCC and HNSCC. Initially, the methylation microarray analyzes were extended to a larger number of ESCC samples. We identified a hypomethylated probe located in *FBXL7* gene body, cg11339964, in tumors, with a high potential for discrimination relative to the adjacent tissue. We established cutoff points in training sets for ESCC and LSCC, resulting 73.08% sensitivity, 94.12% specificity and 85.0% accuracy in ESCC, while in LSCC these values were 83.33%, 87.18% and 85.19%, respectively. The probe cg11339964 was hypomethylated in several tumors associated with alcohol and tobacco and showed no alterations in tumors associated with HPV as cervical cancer. We found no correlation between cg11339964 methylation and the expression of *FBXL7* main isoform. By immunohistochemistry, the expression of *FBXL7* was not correlated with the levels of AUKA and BIRC5, its protein degradation targets, in ESCC and HNSCC. The genomic region encompassing the cg11339964 probe also includes an endogenous retrovirus, MER4A1, and an enhancer region. However, MER4A1 was not differentially expressed in ESCC or LSCC and its expression levels were not correlated with cg11339964 methylation. Correlation analyzes between cg11339964 methylation and the expression of all human genes were performed in LSCC, indicating *TYK2*, overexpressed in ESCC, as a probable transcriptional target of the enhancer. This was the first study to show *FBXL7* molecular changes in ESCC and HNSCC. The high discriminatory values in tumors associated with alcohol and tobacco point to cg11339964 hypomethylation as a potential biomarker for tissue transformation associated with chemical carcinogenesis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTIMATIVAS

Câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o nome dado aos tumores originados no trato aerodigestivo superior, mais especificamente na região da cabeça e pescoço, compreendendo diversos sítios anatômicos (**Figura 1.1**). Sua incidência é de 650.000 novos casos e 330.000 mortes por ano no mundo, se apresentando entre os mais incidentes, inclusive no Brasil (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA SANTOS, 2018).

A incidência deste tipo tumoral é maior em homens do que mulheres, com razões variando de 2:1 a 4:1 (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). A maior parte dos pacientes tem seu diagnóstico em estádios tardios da doença, resultando em tumores de maior estadiamento e em consequência uma baixa sobrevida global em cinco anos. A sobrevida em cinco anos varia de acordo com o sítio do tumor: cavidade oral (26-43%), orofaringe (19-46%), laringe (38-57%) e hipofaringe (13-27%), o mais letal (GUNTINAS-LICHIUS; WENDT; BUENTZEL; ESSER *et al.*, 2010; PRUEGSANUSAK; PEERAVUT; LEELAMANIT; SINKIJCHAROENCHAI *et al.*, 2012).

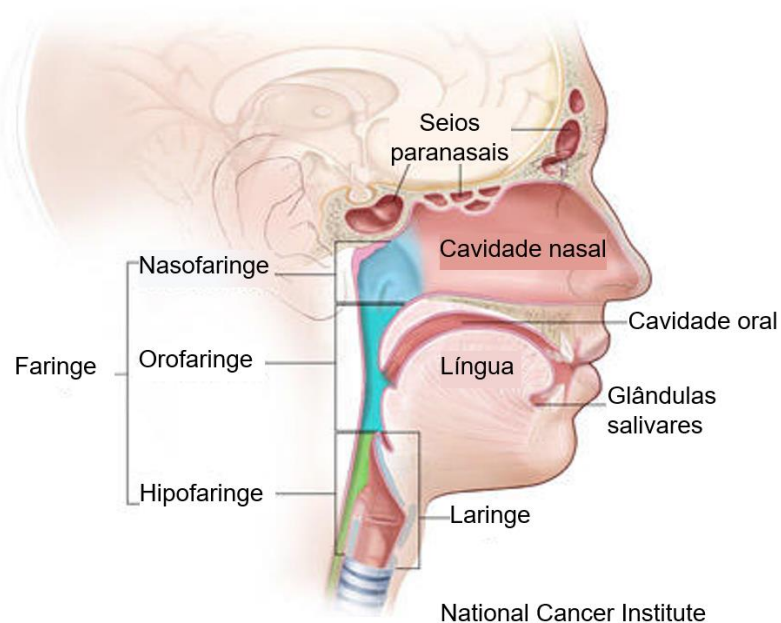


Figura 1.1 Representação gráfica dos sítios anatômicos no trato aerodigestivo superior acometidos pelo CCP. Adaptado de: National Cancer Institute (<http://www.cancer.gov>, acesso dia 24/01/2020).

A maior parte dos CCP se origina nas células de revestimento mucoso do tecido epitelial escamoso, denominando-se carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) e compreendendo aproximadamente 90% dos casos. Atualmente, o CECP apresenta maiores incidências nos países desenvolvidos, mas no futuro a tendência é de uma inversão, com as maiores taxas sendo encontradas em países em desenvolvimento, como o Brasil (GUPTA; JOHNSON; KUMAR, 2016). Os sítios mais acometidos no CECP são a cavidade oral (29-32%), orofaringe (~31%) e laringe (17-30%) (DIGIULIO, 2014; ALAM; SIDDIQUI; PERWEEN, 2017; STOYANOV; KITANOVA; DZHENKOV; GHENEV *et al.*, 2017).

1.2 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CABEÇA E PESCOÇO: FATORES DE RISCO

Além de apresentarem o mesmo tecido de origem, os fatores de risco também são compartilhados entre os carcinomas epidermóides de cavidade oral (CECO), laringe (CEL) e orofaringe (CEOF). Com exceção de um subtipo do CEOF, cujo desenvolvimento já foi associado à presença do Papilomavírus Humano (HPV), a ingestão de álcool e tabaco são os principais fatores de risco que se associam com incidência e mortalidade dos CECP (DELEYIANNIS; THOMAS; VAUGHAN; DAVIS, 1996; VAN IMHOFF; KRANENBURG; MACCO; NIJMAN *et al.*, 2016).

O hábito tabagista e o consumo de álcool podem influenciar no desenvolvimento da doença dependendo da regionalidade, por questões de qualidade ou quantidade. Pacientes tabagistas da Europa e América do Sul apresentam chances cerca de seis e cinco vezes maiores de desenvolverem CECP, respectivamente (razão de chances/OR = 5.83 [5.07 - 6.71] e 4.54 [3,89 – 5,31], respectivamente), enquanto norte-americanos tabagistas têm o dobro de chances de não tabagistas (OR = 2.09 [1,89 – 2,32]) (WYSS; HASHIBE; CHUANG; LEE *et al.*, 2013). Indivíduos tabagistas do Brasil, Cuba e Argentina têm chance cerca de cinco vezes maior de desenvolverem CECO ou CEOF (OR = 5.49 [4.06 – 7.41]) e sete vezes maior de desenvolver CEL ou carcinoma epidermoide de hipofaringe (OR = 7,44 [5,30–10,45]) (SZYMAŃSKA; HUNG; WÜNSCH-FILHO; ELUF-NETO *et al.*, 2011). Já o consumo de álcool no Brasil, Cuba e Argentina aumenta em mais de duas vezes as chances de desenvolvimento de CEL (OR = 2,50 [1,91–3,26]) e em quase cinco vezes as chances de desenvolverem (4,62 (3,39–6,28)) CECO e CEOF (SZYMAŃSKA; HUNG; WÜNSCH-FILHO; ELUF-NETO *et al.*, 2011). Ambos etilismo e tabagismo são associados com maiores taxas de recorrência da doença e pior sobrevida dos

pacientes (DELEYIANNIS; THOMAS; VAUGHAN; DAVIS, 1996; VAN IMHOFF; KRANENBURG; MACCO; NIJMAN *et al.*, 2016).

A maioria dos pacientes com CECP têm histórico de etilismo e tabagismo de forma concomitante. Dessa forma, o potencial carcinogênico é multiplicado, aumentando em dezenas de vezes a chance de desenvolver tumores (GARROTE; HERRERO; REYES; VACCARELLA *et al.*, 2001; DE STEFANI; BOFFETTA; DENEOPELLEGRINI; RONCO *et al.*, 2007; SZYMAŃSKA; HUNG; WÜNSCH-FILHO; ELUFNETO *et al.*, 2011). Esse efeito multiplicador é observado mesmo após cessação de um dos fatores. Por exemplo, indivíduos que usam tabaco e álcool que abandonam apenas o etilismo continuam com risco de desenvolver CECP 33 vezes maior do que indivíduos que não possuem esses hábitos (GARROTE; HERRERO; REYES; VACCARELLA *et al.*, 2001).

Como já mencionado, enquanto o álcool e tabaco são os principais fatores de risco de CECP, existe um grupo de CECP que apresenta uma etiologia e carcinogênese diferente. Dos mais de 200 tipos de HPV já descritos (DE VILLIERS, 2013), cerca de 16 com potencial oncogênico já foram isolados do CECP (BOYLE; FRANCESCHI, 2005; ANANTHARAMAN; GHEIT; WATERBOER; ABEDI-ARDEKANI *et al.*, 2013; KREIMER; CLIFFORD; MICHAUD; LANGEVIN; ELIOT; NELSON *et al.*, 2014; STEINAU; SARAIYA; GOODMAN; PETERS *et al.*, 2014; VIENS; HENLEY; WATSON; MARKOWITZ *et al.*, 2016) e pelo menos 10 são considerados de alto risco: HPV16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58, e 59. A participação do HPV nos sítios de CEL e CECO ainda é controversa e até o momento cogita-se uma infecção oportunista sem impactos clínicos (ISAYEVA; LI; MASWAHU; BRANDWEIN-GENSLER, 2012). Nos CEOF infectados pelo HPV (CEO-HPV+), o HPV16 é o tipo mais prevalente, em 87% dos casos, e é considerado o principal agente carcinogênico (NDIAYE; MENA; ALEMANY; ARBYN *et al.*, 2014). A prevalência dos CEOF associados ao HPV16 em países desenvolvidos é de 41% (Europa) a 60% (América do Norte) (NDIAYE; MENA; ALEMANY; ARBYN *et al.*, 2014)., enquanto no Brasil a frequência é de 6,1% (BUEXM; LOURENÇO; PINTO, 2018).

Assim, os CEOF podem ser divididos de acordo com a presença ou ausência da infecção viral pelo HPV. Do ponto epidemiológico, os casos de CEO-HPV+ em geral não estão associados ao consumo de álcool (GILLISON; D'SOUZA; WESTRA; SUGAR *et al.*, 2008) ou tabaco (HONG; MARTIN; CHATFIELD; JONES *et al.*, 2013), acometem indivíduos mais jovens e possuem melhores condições socioeconômicas (PYTYNIA; DAHLSTROM; STURGIS, 2014). Na clínica, CEO-HPV+ respondem

melhor à terapia e apresentam melhor sobrevida, o que levanta a possibilidade de reescalonamento com menor intensidade do tratamento (MIRGHANI; BLANCHARD, 2018).

O CEOF-HPV+ não é apenas distinto pela epidemiologia e clínica, seu mecanismo de carcinogênese e alterações moleculares são tão particulares que transformaram esse subtipo tumoral em algo completamente diferente dos demais CECP (NETWORK, 2015).

1.3 PRINCIPAIS ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO

1.3.1 CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO HPV-

Quando analisamos os CECP, em que os tumores compartilham uma origem em sítios anatômicos próximos, no mesmo epitélio e fatores de risco comuns, esperamos uma homogeneidade entre os tumores. Contudo, observamos no CECP uma alta heterogeneidade molecular, seja entre os diferentes sítios ou dentro dos mesmos.

A lista de genes mais mutados e mais relacionados à gênese do CECP varia de 50 a 100 genes, dependendo da metodologia abordada. Entretanto, a maioria desses genes apresenta uma baixa frequência de alterações e suas contribuições para a doença ainda não estão claras (LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018).

Dentre as principais vias alteradas estão apoptose e ciclo celular. *TP53* (*proteína do tumor p53*) é o gene mais mutado (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010), sendo que 86%-100% dos casos possuem alguma mutação relacionada à perda da atividade da proteína (LECHNER; FRAMPTON; FENTON; FEBER *et al.*, 2013; NETWORK, 2015). A proteína codificada por *TP53* é fundamental para a resposta a danos no DNA e controle do ciclo celular, encaminhando a célula para apoptose em caso de ineficiência do reparo de DNA, evitando assim o surgimento de mutações (JOERGER; FERSHT, 2016). Mutações em *TP53* também estão associadas com pior prognóstico e resistência à terapia (ZHOU; LIU; MYERS, 2016).

O *CDKN2A* (*inibidor de quinase dependente de ciclina 2A*) codifica a proteína p16 que está inativada em 57% dos casos por deleção ou mutação. Esta proteína se liga às quinases CDK4/CDK6 (SERRANO; HANNON; BEACH, 1993; NETWORK, 2015) (quinase 4 dependente de ciclina e quinase 6 dependente de ciclina, respectivamente) inibindo a progressão do ciclo celular nas fases G1/S. Assim, a

perda de p16 resulta na proliferação desregulada da célula (LIGGETT; SIDRANSKY, 1998). A expressão proteica de p16 é usada como biomarcador da infecção viral de HPV, essa interação será abordada mais à frente.

EGFR (*receptor do fator de crescimento epidérmico*) é o gene com maior potencial terapêutico no CECP. Originalmente, o tratamento dos CECP consiste de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (platinas, paclitaxel e fluorouracil). O tratamento com anticorpo monoclonal de EGFR (cetuximab) (BONNER; HARARI; GIRALT; AZARNIA *et al.*, 2006; VERMORKEN; MESIA; RIVERA; REMENAR *et al.*, 2008) foi a primeira e é até então a única terapia-alvo aprovada para CECP (MOREIRA; TOBIAS; O'BRIEN; AGULNIK, 2017). Amplificado em 11% dos casos, a superexpressão de *EGFR* pode ativar diversas vias relacionadas à proliferação e sobrevivência (SIGISMUND; AVANZATO; LANZETTI, 2018).

Outras alterações frequentes no CECP são as amplificações cromossômicas em 11q13 contendo os genes *FADD* (Domínio de morte associado ao FAS), *CCND1* (ciclina D1) e *CTTN* (cortactina) e no cromossomo 11q22, região dos genes *BIRC2* e *YAP1*, relacionados com proliferação, morte celular e via de Hippo (NETWORK, 2015).

1.3.2 CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE OROFARINGE HPV+

O genoma do HPV tem ~8000 pb e é constituído por oito genes que codificam seis proteínas no início da infecção (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e duas em momentos tardios (L1 e L2) (MUNOZ; CASTELLSAGUÉ; DE GONZÁLEZ; GISSMANN, 2006). E6 e E7 desempenham papéis fundamentais na carcinogênese.

Ao contrário dos demais CECP, em que *TP53* é predominantemente inativado por alterações genéticas, nos tumores HPV+, a proteína E6 se liga a p53, encaminhando a proteína para degradação após ubiquitinação (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). Graças a esse mecanismo, a taxa de tumores CEOF-HPV+ com mutação em *TP53* é de apenas 3% (NETWORK, 2015).

E7, por sua vez, se liga à pRb (proteína do retinoblastoma), impedindo sua ligação no fator de transcrição E2F que transloca para o núcleo e ativa genes relacionados com a progressão do ciclo celular (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). A transcrição de *p16* é ativada pela progressão do ciclo celular, causada pela ativação de E2F como uma tentativa de *feedback* negativo e parada do ciclo celular. Assim, em tumores de CEOF-HPV+, a superexpressão de p16 serve como biomarcador da

presença e atividade da infecção pelo HPV (LIANG; MARSIT; MCCLEAN; NELSON *et al.*). Ao contrário dos CECP HPV-, p16 não apresenta frequência relevante de alterações genéticas nos CEOF-HPV+ (NETWORK, 2015).

1.4 CAMPO DE CANCERIZAÇÃO NOS PACIENTES COM CECP

Além do diagnóstico tardio e da alta heterogeneidade molecular dos tumores, outro fator que contribui para a baixa sobrevida dos pacientes com CECP é a ocorrência de segundos tumores primários (STP). A elevada frequência de STP se deve a alterações moleculares provocadas pelos carcinógenos em grandes e múltiplas áreas do epitélio, criando um “campo de cancerização”. Este termo foi primeiramente empregado por Slaughter e colaboradores em 1953 (SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953), em um estudo com câncer oral. Os autores observaram que este tipo de tumor apresenta algumas características marcantes: se desenvolve em áreas de alterações pré-neoplásicas multifocais, o tumor é circundado por tecido caracterizado como anormal, tumores orais geralmente consistem de múltiplas lesões individuais, e a persistência de tecido anormal após a cirurgia pode explicar o desenvolvimento de STP e recorrências locais (BRAAKHUIS; TABOR; KUMMER; LEEMANS *et al.*, 2003).

Sendo assim, o tecido escamoso que reveste o trato aerodigestivo superior (TAS), uma vez exposto ao tabaco e/ou ao álcool, perderia suas características normais e se tornaria pré-disposto a se tornar neoplásico, o que poderia resultar no aparecimento de tumores sincrônicos ou metacrônicos nos diferentes órgãos revestidos por esse epitélio (KATADA; YOKOYAMA; YANO; ODA *et al.*, 2019).

Com uma incidência de 4% ao ano, cerca de 9-16% dos pacientes com CECP desenvolvem STP. No Brasil, a distribuição dos principais sítios de STP é de 49% na própria cabeça e pescoço, 22% no pulmão e 12% no esôfago (LEÓN; QUER; DIEZ; ORÚS *et al.*, 1999; PRIANTE; CARVALHO; KOWALSKI, 2010; MORRIS; SIKORA; PATEL; HAYES *et al.*, 2011), associados a um pior prognóstico (LIM; KIM; JUNG; GONG *et al.*, 2015). A sobrevida em cinco anos dos pacientes com CECP que desenvolvem um STP no esôfago cai de 43-51% para 0-24% (CHEN; HUANG; CHAN; CHEN *et al.*, 2010; RENNEMO; ZÄTTERSTRÖM; BOYSEN, 2008).

1.5 CARCER DE ESÔFAGO: ESTIMATIVAS

Sendo o sétimo em incidência e sexto em mortalidade, o câncer de esôfago (CE) apresenta mais de 570.000 novos casos e 508.000 mortes por ano, representando uma em cada 20 mortes por todos os tipos de câncer no mundo (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). O CE é duas a três vezes mais frequente em homens que mulheres (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018) com sobrevida global de apenas 13-22% em cinco anos (DUBECZ; GALL; SOLYMOSI; SCHWEIGERT *et al.*, 2012; ZENG; ZHENG; GUO; ZHANG *et al.*, 2015; TUSTUMI; TAKEDA; KIMURA; SALLUM *et al.*, 2016). A grande letalidade da doença é resultado do seu desenvolvimento assintomático causando um diagnóstico em estádios avançados, após instalação da disfagia (MWACHIRO; BURGERT; LANDO; CHEPKWONY *et al.*, 2016).

Existem dois principais tipos histológicos de CE, o adenocarcinoma (ADE) e o carcinoma epidermoide (CEE), o último responsável por até 88% dos casos (ARNOLD; SOERJOMATARAM; FERLAY; FORMAN, 2015).

1.6 CÂNCER DE ESÔFAGO: FATORES DE RISCO

Para o ADE, a obesidade, doença do refluxo gastroesofágico (DRGE) e principalmente a metaplasia de Barrett são os principais fatores de risco. Apesar de importantes, o álcool e o tabaco são considerados secundários para o ADE (MAO; ZHENG; LING, 2011).

Ao contrário, no CEE, os fatores de risco principais são o álcool e o tabaco (MAO; ZHENG; LING, 2011). Outro fator importante, mas regionalmente limitado é o hábito de consumir bebidas quentes como chás e chimarrão, frequente em países asiáticos e sul do Brasil, respectivamente (SU; YANG; XU; CHEN *et al.*, 2015; RAPOZO; BLANCO; REIS; GONZAGA *et al.*, 2016).

O hábito tabagista aumenta o risco de desenvolvimento do CEE em quase 10 vezes (HR: 9,27 [4,04–21,29]). Cerca de 70-80% das mortes por CE podem ser atribuídas a este hábito (FREEDMAN; ABNET; LEITZMANN; MOUW *et al.*, 2007). Etilistas têm cinco vezes mais risco de desenvolverem CEE [HR: 4,93 [2,69– 9,03]] (FREEDMAN; ABNET; LEITZMANN; MOUW *et al.*, 2007) e, da mesma forma que nos CECP, a combinação de álcool e tabaco multiplica a chance de desenvolver a doença em até 50 vezes (OR: 50,1 [14,3–175]) (MORITA; KUMASHIRO; KUBO; NAKASHIMA

et al., 2010). Ambos tabaco e álcool estão associados à pior sobrevida dos pacientes (WU; WU; LU; HSU *et al.*, 2013).

1.7 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO: ALTERAÇÕES MOLECULARES

Semelhante aos CEECP, as vias de ciclo celular e apoptose estão alteradas em quase todos os casos (~90%). *TP53* é o principal gene alterado por mutações de perda de função em até 90% dos casos, seguido por deleção de *p16* em aproximadamente 70% dos casos e amplificação de *CCND1*, responsável pela progressão da fase G1 no ciclo celular, em cerca de 50% dos casos (TALUKDAR; DI PIETRO; SECRIER; MOEHLER *et al.*, 2018).

Com exceção de *TP53* (ciclo celular e apoptose), a divergência genotípica e convergência fenotípica parece ser a estrada percorrida durante o desenvolvimento do CEE, em que alterações genéticas estão fragmentadas e, quando agrupadas, percebemos a super-representação de algumas vias. Vias como RTK (receptores tirosina-quinase)/RAS/PI3K (proliferação) e diferenciação celular apresentam alterações em mais de 50% dos casos e remodelamento da cromatina ou desenvolvimento embrionário em quase 40% (NETWORK, 2017).

A via RTK/RAS/PI3K geralmente está hiperativa por amplificações em *EGFR* (19% em algumas populações, enquanto no Brasil essa frequência é de 4%), *FGFR1* (12%) e *KRAS* (7%) e mutações em *PIK3CA* (13%), por exemplo. Os fatores de transcrição *TP63* e *SOX2* estão amplificados e somam 48% das alterações na via de diferenciação celular. *MYC* é o principal gene amplificado (23%) na via de desenvolvimento embrionário. A via de remodelamento da cromatina geralmente está inativada por mutações ou deleções principalmente em *KDM6A* (19%) e *KMT2D* (14%) (NETWORK, 2017).

Essa heterogeneidade nos CEE representa um desafio na compreensão da biologia do tumor. Em 16 pacientes sequenciados para estudos de heterogeneidade intratumoral, apenas *TP53* foi encontrado mutado na maioria dos casos, não se tornando possível até o momento uma classificação molecular clara do CEE (CAO; WU; YAN; TIAN *et al.*, 2015; HAO; LIN; DINH; MAYAKONDA *et al.*, 2016).

A grande letalidade provocada pelo diagnóstico tardio da doença, sua elevada frequência em grupos de alto risco como pacientes com CEECP, afetando drasticamente a sobrevida dos mesmos (CHABER-CIOPINSKA; KIPRIAN; KAWECKI;

KAMINSKI, 2016), e sua alta heterogeneidade destacam a necessidade e desafio de novos biomarcadores (TALUKDAR; DI PIETRO; SECRIER; MOEHLER *et al.*, 2018).

1.8 BIOMARCADORES

1.8.1 DEFINIÇÃO DE BIOMARCADORES

De acordo com a *Food and Drug Administration (FDA)* e *National Institute of Health (NIH)*, um biomarcador é “uma característica definida que é medida como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas a uma exposição ou intervenção” (GROUP, 2016). Apesar da ampla definição, o conceito engloba características histológicas, fisiológicas, moleculares, dentre outras, que podem ser usadas como ferramentas para intervenções terapêuticas objetivas como diagnóstico, prognóstico e resposta (GROUP, 2016). Entretanto, antes de sua aplicação clínica, é fundamental um biomarcador passar por estudos para atestar sua acurácia e reprodutibilidade (STRIMBU; TAVEL, 2010)

1.8.2 CURVA CARACTERÍSTICA DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR

A curva Característica de Operação do Receptor (ROC, do inglês *Receiver Operating Characteristic*) representa graficamente a capacidade de distinção de condições binárias (exemplo, dois grupos: controles/indivíduos sem doença, casos/indivíduos doentes) a partir de um conjunto de valores, comumente aplicada para avaliação de biomarcadores (KUMAR; INDRAYAN, 2011). Criada durante a Segunda Guerra Mundial para diferenciar sinais de radares inimigos e aliados, foi implementada na pesquisa clínica nos anos 70 para avaliar métodos e resultados diagnósticos de imagem (KRUPINSKI, 2017).

Os eixos x e y do gráfico representam a sensibilidade e 100-especificidade, respectivamente (**Figura 1.2A**). A formação da curva varia de acordo com a distribuição de valores do biomarcador candidato em ambos os grupos. Para cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia construímos uma matriz de confusão (**Figura 1.2B**) (HAJIAN-TILAKI, 2013; KRUPINSKI, 2017).

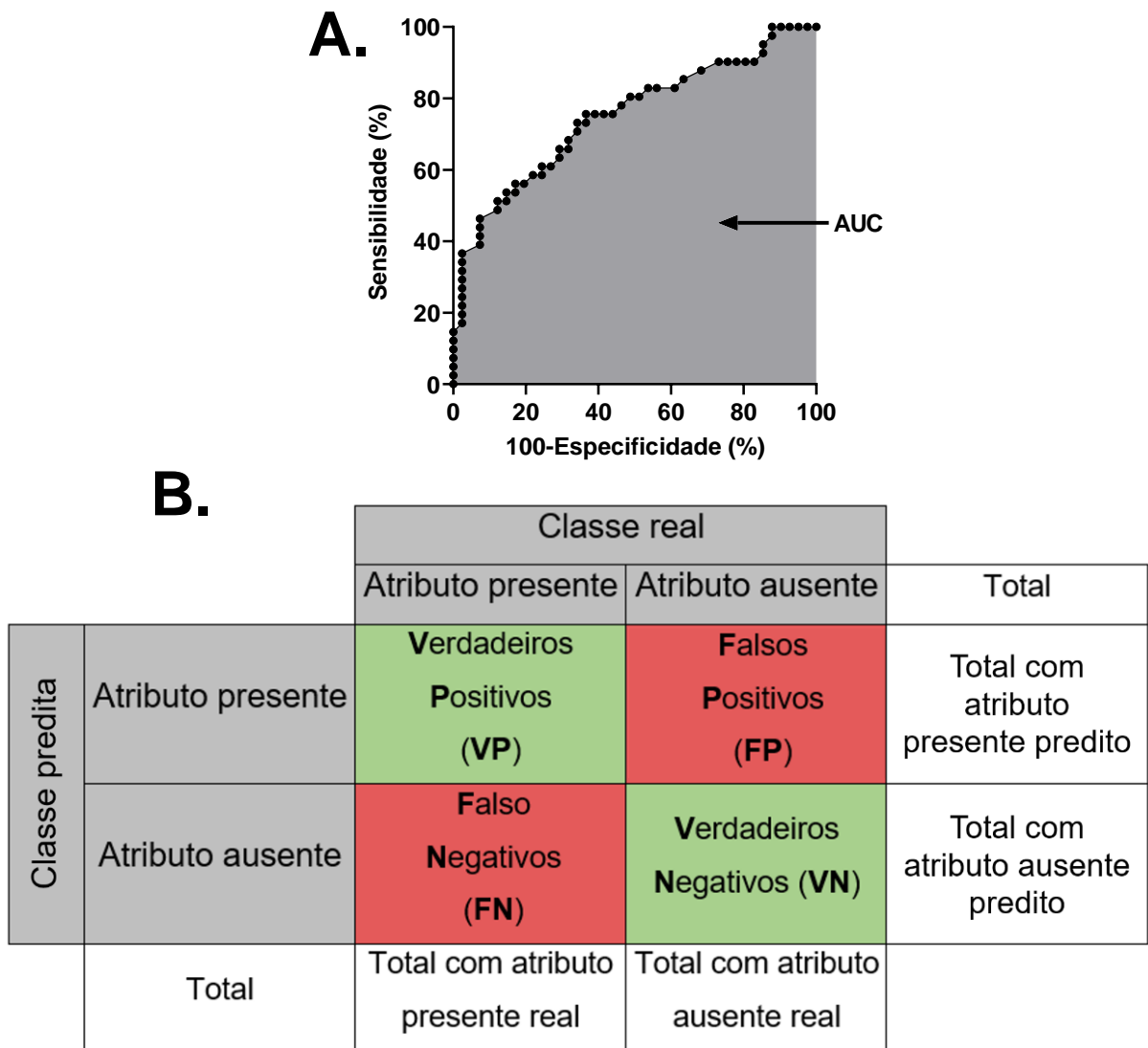


Figura 1.2 – Representação da curva ROC e da matriz de confusão. A. Na curva ROC, os eixos x e y representam 100%-especificidade e a sensibilidade em porcentagem, respectivamente. Os pontos pretos são os possíveis valores de corte para uma determinada variável contínua e espelham nos eixos x e y 100-especificidade e a sensibilidade, respectivamente, em diferenciar os grupos de interesse. A acurácia (AUC, do inglês Area Under the Curve) é toda a parte interior da curva (em cinza a apontada pela seta), representando toda fração de verdadeiros acertos positivos e negativos. B. Matriz de confusão apontando todos os agrupamentos de acordo com a classe original do indivíduo (Classe real) e a classe predita pelo biomarcador candidato (Classe predita). A interseção entre as classes cria as categorias de verdadeiros positivos (VP), verdadeiros negativos (VN), falsos positivos (FP) e falsos negativos (FN), que são usadas para calcular a sensibilidade, especificidade e acurácia.

A matriz de confusão é um formato de tabela que distribui os dados de acordo com a classe real e a classe predita do indivíduo. A primeira é respectiva à verdadeira natureza do atributo avaliado do indivíduo e a última se refere à classe em que o biomarcador candidato classificou o indivíduo. A interseção entre essas classes, de acordo com a presença ou ausência do atributo, cria quatro categorias principais:

- Verdadeiros positivos (VP): população classificada como portadora de um atributo, sendo este atributo presente (exemplo: indivíduo classificado como doente, tendo a doença).
- Falsos positivos (FP): população classificada como portadora de um atributo, sendo este atributo ausente (exemplo: indivíduo classificado como doente, mas não tem a doença).
- Verdadeiros negativos (VN): população classificada como não portadora do atributo, sendo este atributo ausente (exemplo: indivíduo sem a doença).
- Falsos negativos (FN): população classificada como não portadora do atributo, sendo este atributo presente (exemplo: indivíduo doente, classificado como não portador da doença).

A sensibilidade, que correspondente à taxa de acertos reais na presença de determinado atributo, pode ser calculada:

$$\text{sensibilidade} = \frac{VP}{VP + FN}$$

A especificidade, que corresponde à taxa de acertos reais na ausência de determinado atributo, pode ser calculada:

$$\text{especificidade} = \frac{VN}{FP + VN}$$

E a acurácia (AUC), que corresponde à taxa de acertos reais totais na ausência ou presença de determinado atributo pode ser calculada:

$$\text{acurácia} = \frac{VP + VN}{n}$$

1.9 BIOMARCADORES & EPIGENÉTICA

Biomarcadores epigenéticos possuem uma série de vantagens em relação aos genéticos, para citar alguns: são plásticos e o mesmo marcador pode ser utilizado para diversos propósitos (como diagnóstico e tratamento) (GARCÍA-GIMÉNEZ; SECO-CERVERA; TOLLEFSBOL; ROMÁ-MATEO *et al.*, 2017); são específicos para o tipo de célula estudada e podem revelar informações sobre a função do gene (GARCÍA-GIMÉNEZ; SECO-CERVERA; TOLLEFSBOL; ROMÁ-MATEO *et al.*, 2017); pode incorporar informações em relação ao estilo de vida do paciente como exposição a fatores de risco, nutrição e metabolismo auxiliando no conhecimento da história natural da doença (ANDERSEN; DOGAN; BEACH; PHILIBERT, 2015; RELTON; HARTWIG; DAVEY SMITH, 2015); podem ser avaliados de maneiras não invasivas como em fluídos (sangue, saliva, urina, sêmen, plasma etc) (JABBARI *et al.*, 2017; PATNAIK; MALLICK; YENDAMURI, 2010; ZUBAKOV; BOERSMA; CHOI; VAN KUIJK *et al.*, 2010; BULLA; DE WITT; AMMERLAAN; BETSOU *et al.*, 2016; GLINGE; CLAUSS; BODDUM); e são altamente estáveis mesmo em materiais degradados como tecidos parafinados ou descongelados por acidente (PEIRÓ-CHOVA; PEÑA-CHILET; LÓPEZ-GUERRERO; GARCÍA-GIMÉNEZ *et al.*, 2013).

Como já apresentado, o CECp e CEE possuem grande heterogeneidade genética, ambos apresentam fatores de risco comuns e o mesmo epitélio de origem compartilhando uma alta taxa de STP em decorrência do campo de cancerização. Nesse contexto, alguns marcadores epigenéticos vem se destacando.

1.9.1 MECANISMOS EPIGENÉTICOS DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

Epigenética quer dizer “acima da genética”, e se refere a todo o conjunto de alterações moleculares herdáveis capazes de alterar a expressão gênica sem alteração da sequência de bases do DNA (HYDE; FRISO; CHOI, 2020). A epigenética é plástica e pode responder a hábitos e exposições ambientais, como os fatores de risco de desenvolvimento de câncer (LIU; MARIONI; HEDMAN; PFEIFFER *et al.*, 2018; HERCEG; GHANTOUS; WILD; SKLIAS *et al.*, 2018). Os principais mecanismos de regulação epigenética são os RNAs não codificantes (ncRNAs), modificadores de histonas e a metilação do DNA (HYDE; FRISO; CHOI, 2020) (**Figura 1.3**).

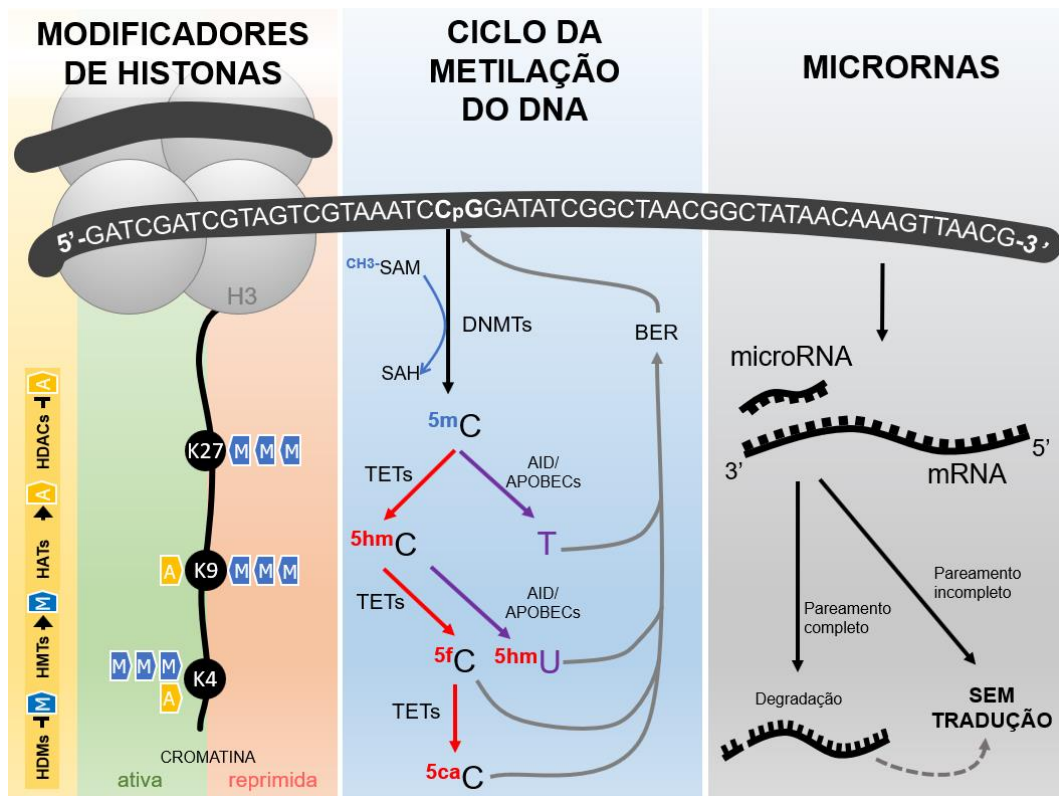


Figura 1.3 – Os principais mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica. O remodelamento da cromatina é coordenado por enzimas capazes de adicionar (HAT e HMT) ou retirar (HDAC e HDM) radicais covalentes nos resíduos de aminoácido N-terminais das histonas, podendo alterar sua carga e afinidade com o DNA (acetilação) ou recrutando outras proteínas (metilação), ativando ou reprimindo a transcrição. A metilação do DNA acontece no carbono 5 da citosina (5mC) e é catalisada pelas DNMT1, 3A e 3B utilizando o doador universal de metil S-Adenosil Metionina (SAM). TETs realizam séries de hidroxilações na 5mC gerando os radicais 5hmC > 5fC > 5caC. APOBECs e AID fazem desaminação da 5mC e 5hmC gerando timina (T) e 5hmU, respectivamente. Os produtos das hidroxilações e desaminações são reconhecidos pelo sistema de reparo por excisão de base (BER) e uma citosina não metilada é adicionada. Os microRNAs expressos podem se ligar a RNAs mensageiros alvo (RNAm), o pareamento de bases completa entre os RNAs resulta na degradação do RNAm e o incompleto na inibição de sua tradução. HAT: Histona acetiltransferase; HMT: Histona metiltransferase; HDAC: Histona desacetilase; HDM: Histona desmetilase; SAH: S-Adenosil Homocisteína; 5hmC: 5-hidroxi-metilcitosina; 5fC: 5-formilcitosina; 5caC: 5-carboxilcitosina; 5hmU: 5-hidroxi-metiluracila; APOBEC: Enzima de edição de RNAm de apolipoproteína B, tipo polipeptídeo catalítico; AID: Desaminase de citidina induzida por ativação. Adaptado de Camuzi et al, 2019 (CAMUZI; DE AMORIM; RIBEIRO PINTO; OLIVEIRA TRIVILIN *et al.*, 2019).

Os ncRNAs são uma classe abrangente de RNAs que não são traduzidos em proteína, sendo a classe mais bem caracterizada os microRNAs, com tamanho de cerca de 22 pb. MicroRNAs ligam-se por complementariedade de bases completa ou incompleta à porção 3' não traduzida (3'UTR) de RNAs mensageiros (RNAm) alvo, a primeira forma de ligação encaminha o RNAm para degradação e a última inibe a sua tradução (GEBERT; MACRAE, 2019).

Modificadores de histona são enzimas que adicionam ou removem radicais, metil e acetil por exemplo, ligados covalentemente às caudas das histonas. Esses radicais podem recrutar proteínas ou alterar a carga e afinidade das histonas pelo DNA, em ambos os casos o objetivo final é o remodelamento da cromatina. Quando a cromatina está aberta, é possível a ligação de toda maquinaria de transcrição gênica. Quando fechada, o complexo não consegue se acoplar na fita e a transcrição é inibida (BHAN; DEB; MANDAL, 2017; CAMUZI; DE AMORIM; RIBEIRO PINTO; OLIVEIRA TRIVILIN *et al.*, 2019).

1.9.2 METILAÇÃO DO DNA

As citosinas seguidas de guanina (CpG) podem ser metiladas no seu quinto carbono pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMT) 1, 3A e 3B utilizando o doador universal de metil S-Adenosil Metionina (SAM) formando as 5-metilcitosinas (5mC). As DNMT3A e 3B realizam a metilação *de novo* enquanto DNMT1 realiza a metilação de manutenção. A metilação do DNA é um processo reversível. A desmetilação passiva ocorre quando, durante o ciclo celular, a DNMT1 não copia os padrões de metilação da filha mãe para a fita filha recém-sintetizada. Já a desmetilação ativa se dá pela ação enzimática das TETs (hidroxilação) ou APOBECs (deaminação), seguida pelo reparo de excisão de bases de DNA e substituição da base excisada por uma citosina não metilada (**Figura 1.3**) (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011; CAMUZI; DE AMORIM; RIBEIRO PINTO; OLIVEIRA TRIVILIN *et al.*, 2019).

O aumento da metilação (hipermetilação) na região promotora dos genes geralmente é relacionado com a perda de sua expressão, enquanto no corpo do gene é relacionado com o aumento de expressão. Porém, esse último mecanismo ainda é controverso e pouco compreendido (**Figura 1.4**) (DEATON; BIRD, 2011). Além da expressão de genes que codificam proteínas, outros elementos do genoma podem ser controlados pela metilação do DNA. Por exemplo, elementos repetitivos (ER, padrões de bases que ocorrem de maneira repetitiva ao longo do genoma) como

retrovírus endógenos podem ser expressos quando hipometilados, e *enhancers* (regiões de ativação transcricional a dezenas a milhares de bases de distância do gene alvo) são ativados quando perdem metilação (hipometilação) (**Figura 1.4**) (WIENCH; JOHN; BAEK; JOHNSON *et al.*, 2011; STONE; CHIAPPINELLI; LI; MURPHY *et al.*, 2017).

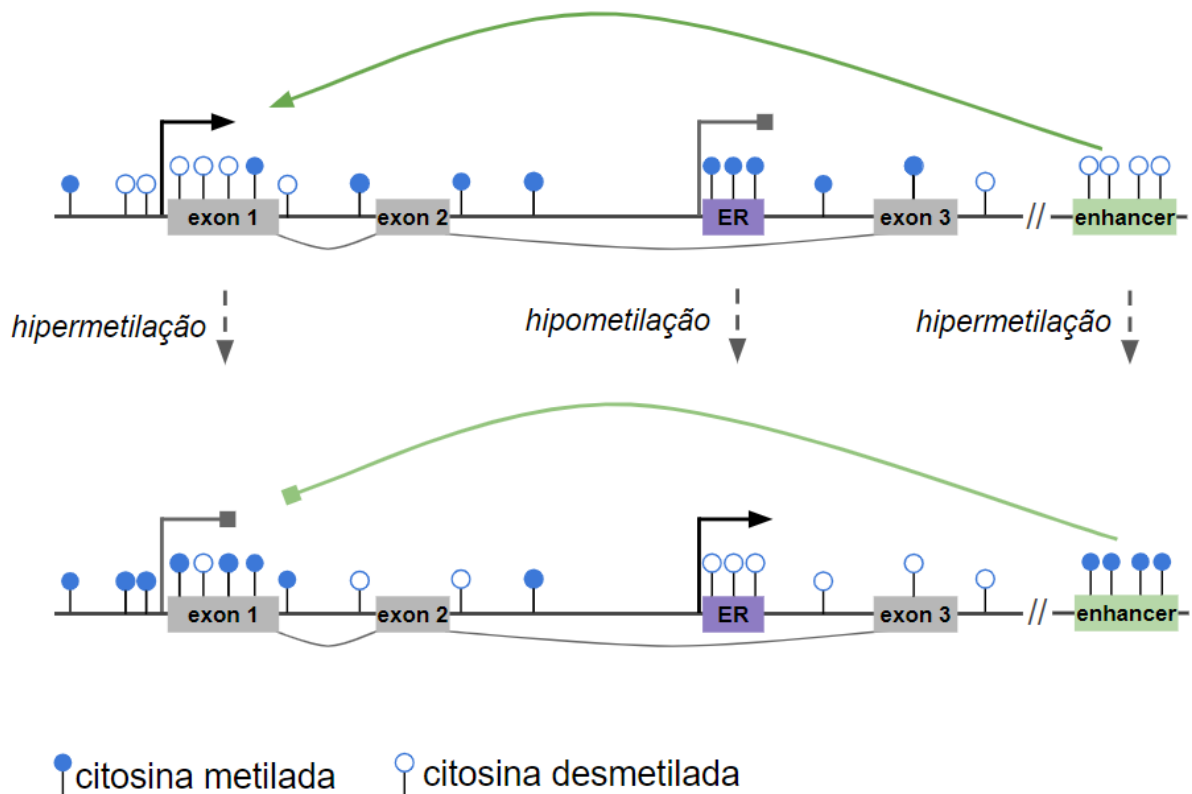


Figura 1.4 - Representação da regulação da expressão gênica, ativação de elementos repetitivos e *enhancers* pela metilação das citosinas do DNA. A hipermetilação das citosinas na região promotora dos genes leva à repressão de sua expressão. A hipermetilação de elementos repetitivos leva a seu silenciamento e a hipermetilação de *enhancers* leva à inativação desses elementos que estimulam a expressão gênica. Seta curvada em preto representa a transcrição de genes (indicado pelos éxons) ou ER. Seta curvada em cinza representa o silenciamento de genes ou ER. Seta em verde representa o estímulo da transcrição de um gene alvo por seu *enhancer*. Fonte: Autor.

Dos três mecanismos epigenéticos conhecidos, a metilação do DNA é o mais estudado e melhor caracterizado na biologia e câncer. Diversos trabalhos têm mostrado o potencial da metilação como biomarcador de transformação celular de uma célula normal para cancerígena no CEE (BABA; WATANABE; BABA, 2013) e CECP (ARANTES; DE CARVALHO; MELENDEZ; CARVALHO *et al.*, 2014).

Ainda, a metilação tem associação com os fatores de risco e pode anteceder eventos genéticos indicando que as alterações epigenéticas podem dar início ao campo de cancerização. Lee e colaboradores (2011) demonstraram que, à medida que a exposição ao álcool e tabaco aumenta, e há desenvolvimento do tumor, os níveis de metilação de alguns genes como *HOXA9* (Proteína Homeobox Hox-A9), *NEFH* (neurofilamento, polipeptídeo pesado), *UCHL1* (hidrolase carboxi-terminal da ubiquitina L1) e *MT1M* (metalotioneína-1M) também aumentam nos diferentes tecidos do trato aerodigestivo superior (LEE; WANG; WANG; KO *et al.*, 2011). No mesmo ano, um estudo do nosso grupo com CEE revelou que o perfil de metilação do gene *TFF1* foi capaz de diferenciar a mucosa saudável da mucosa adjacente não tumoral e esta última do tumor (LIMA; HERNANDEZ-VARGAS; SIMÃO; DURAND *et al.*, 2011).

Nesse contexto, um estudo em andamento do nosso grupo com tumores epidermóides do TAS utilizando a plataforma de microarranjo “Infinium HumanMethylation450 BeadChip”, capaz de analisar o perfil de metilação de mais de 480.000 sítios CpG no genoma, revelou que o perfil de metilação de um gene, *Proteína F-box e rica em repetição de leucina 7 (FBXL7)* era capaz de diferenciar com alta sensibilidade e especificidade o tecido adjacente não tumoral do tumor de pacientes com CEE. Portanto, este gene tornou-se alvo do presente trabalho.

1.10 PROTEÍNA F-BOX E RICA EM REPETIÇÃO DE LEUCINA 7 (FBXL7)

Clonado por Nagase e colaboradores (1998) (NAGASE; ISHIKAWA; SUYAMA; KIKUNO *et al.*, 1998) e posteriormente reconhecido como membro da família F-box (CENCIARELLI; CHIAUR; GUARDAVACCARO; PARKS *et al.*, 1999), *FBXL7* está localizado em 5p15.1 com três variantes (isoformas) descritas (NAGASE; ISHIKAWA; SUYAMA; KIKUNO *et al.*, 1998; HARROW; FRANKISH; GONZALEZ; TAPANARI *et al.*, 2012) (**Figura 1.5**). Sua isoforma principal conta com 439.614 pb e quatro éxons (RODRIGUEZ; MAIETTA; EZKURDIA; PIETRELLI *et al.*, 2013).

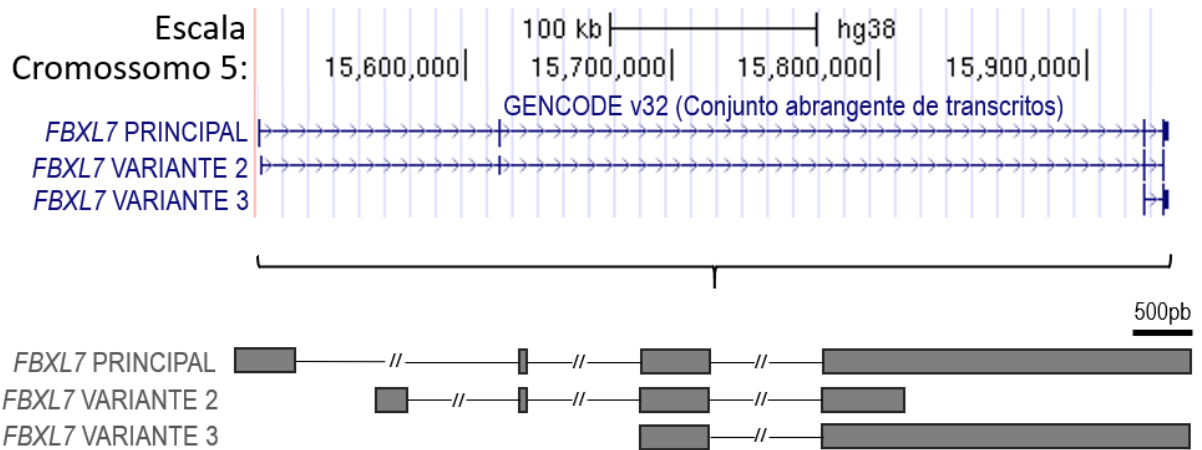


Figura 1.5 – Representação esquemática do gene *FBXL7* e suas isoformas de expressão. *FBXL7* está localizado no cromossomo 5 e possui três variantes descritas. Sua isoforma principal possui quatro éxons. A segunda e terceira variantes do gene possuem quatro e dois éxons, respectivamente. Imagem superior adaptada de: (HARROW; FRANKISH; GONZALEZ; TAPANARI *et al.*, 2012). Imagem inferior adaptada de (AGUET; BARBEIRA; BONAZZOLA; BROWN *et al.*, 2019).

1.10.1 FBXL7: DA BIOLOGIA AO CÂNCER

Assim como outros membros da família de proteínas F-box, *FBXL7* participa do complexo de ubiquitinação Skp1-Cullin-F-box (SCF) E3 ligase (NGUYEN; BUSINO, 2020). A via ubiquitinação-proteassoma é um dos principais processos de degradação proteica da célula e envolve três classes proteicas; as enzimas ativadoras de ubiquitinação (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitinação (E2) e enzimas proteína-ubiquitina ligases (E3). *FBXL7* compõe uma porção fundamental do SCF, responsável pelo reconhecimento e ligação nas proteínas-alvo do complexo para posterior ubiquitinação e encaminhamento para degradação (ROOS-MATTJUS; SISTONEN, 2004; NGUYEN; BUSINO, 2020).

Até o momento, os alvos conhecidos de *FBXL7* são Aurora A kinase (*AURKA*) e survivina/inibidor baculoviral da apoptose contendo cinco repetições (*BIRC5*). *AURKA* é componente do fuso bipolar mitótico responsável pela segregação cromossômica durante o ciclo celular e sua degradação por *FBXL7* pode causar o arresto do ciclo celular (COON; GLASSER; MALLAMPALLI; CHEN, 2012). *BIRC5* é uma proteína anti-apoptótica e *FBXL7* exerce um papel pro-apoptótico ao encaminhá-la para degradação (LIU; LEAR; IANNONE; SHIVA *et al.*, 2015). Ambos os alvos estão superexpressos em diversos tumores e sua maior expressão geralmente está

associada a um pior prognóstico (KARTHIGEYAN; PRASAD; SHANDILYA; AGRAWAL *et al.*, 2011; D'ASSORO; HADDAD; GALANIS, 2016; SHOJAEI; YAZDANI-NAFCHI; BANITALEBI-DEHKORDI; CHEHELGERDI *et al.*, 2019), inclusive em CEE (TONG; ZHONG; KONG; DONG *et al.*, 2004; ROSATO; PIVETTA; PARENTI; IADEROSA *et al.*, 2006) e CECF (ERPOLAT; GOCUN; AKMANSU; KARAKUS *et al.*, 2012; MEHRA; SEREBRIISKII; BURTNES; ASTSATUROV *et al.*, 2013). Assim, especula-se que *FBXL7* seja um gene supressor tumoral (GST).

A perda homozigótica de *FBXL7* foi associada ao desenvolvimento da síndrome de Hennekam, caracterizada pela má formação do sistema linfático (BOONE; PATERSON; MOHAJERI; ZHU *et al.*, 2020). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em *FBXL7* demonstram associação com resposta a drogas para asma (PARK; DAHLIN; TSE; DUAN *et al.*, 2014; PENNINGTON; ORTEGA; AMPLEFORD; MOORE *et al.*, 2017) e a ocorrência de Alzheimer de início tardio (TOSTO; FU; VARDARAJAN; LEE *et al.*, 2015). Pouco se conhece sobre a regulação epigenética de *FBXL7*, o perfil de metilação do gene foi avaliado apenas em um painel para identificar crianças com atopia ou asma (FORNO; WANG; QI; YAN *et al.*, 2019).

Em *Drosophila melanogaster*, *Fbxl7* é componente da via de Hippo, responsável pela forma e tamanho de órgãos, regulando os níveis proteicos de Dachs via ubiquitinação. A perda de *Fbxl7* está ligada ao acúmulo de Dachs e má formação de órgãos (RODRIGUES-CAMPOS; THOMPSON, 2014), contudo seu papel na ubiquitinação de Dachs é controverso (BOSCH; SUMABAT; HAFEZI; PELLOCK *et al.*, 2014).

Em câncer, um SNP em *FBXL7* foi associado à maior chance de desenvolvimento do câncer de mama em indivíduos com mutações em *BRCA2* (WANG; PANKRATZ; FREDERICKSEN; TARRELL *et al.*, 2010). Kamran e colaboradores (2017) mostraram um complexo mecanismo de regulação da expressão de *FBXL7* no câncer gástrico. AURKA interage com FOXP1, fator de transcrição de *FBXL7*, inibindo sua atividade e diminuindo os níveis de *FBXL7*. Com isso, é observado um acúmulo de BIRC5 e sua ação anti-apoptótica causa maior resistência ao tratamento (KAMRAN; LONG; XU; LV *et al.*, 2017). Ao contrário do que seria esperado por sua potencial ação supressora tumoral, a superexpressão de *FBXL7* já foi associada a pior prognóstico no câncer de ovário e proposta como biomarcador de resistência (CHIU; CHANG; LIN; LEE *et al.*, 2018).

1.11 JUSTIFICATIVA

Os CEE e CECP se originam pela transformação do mesmo epitélio escamoso estratificado e em decorrência das mesmas exposições (álcool e tabaco). Uma alta proporção dos pacientes com CECP desenvolvem um segundo tumor primário (STP) no trato aerodigestivo superior (TAS), o que reduz drasticamente sua sobrevida. Quando o STP é diagnosticado no esôfago, em geral em estádios tardios de desenvolvimento da doença, as taxas de sobrevida caem de 43-51%% para 0-24%. Portanto, é fundamental identificar biomarcadores moleculares que possam prever os pacientes com CECP mais suscetíveis a desenvolver um STP, assim como biomarcadores que possam antecipar o diagnóstico de um STP de esôfago.

Os tumores do TAS podem compartilhar diversas características moleculares pela sua etiologia comum. Porém, até então, a única alteração genética recorrente são as mutações em *TP53*. As demais apresentam elevada heterogeneidade entre indivíduos. Neste contexto, as alterações epigenéticas, por serem mais homogêneas e por seu potencial de utilização como biomarcador, se tornam uma opção promissora.

Como já citado, o perfil de metilação do DNA pode ser capaz de caracterizar a transformação do epitélio e a exposição aos fatores de risco no TAS. Baseado nisto, um estudo em andamento grupo avaliou os padrões de metilação globais destes tumores e mostrou que o perfil de metilação de apenas um gene, o *FBXL7*, era capaz de distinguir os CEE do tecido adjacente não tumoral com alta sensibilidade e especificidade. *FBXL7* é capaz de marcar para degradação as oncoproteínas AURKA e BIRC5, ambas superexpressas e associadas ao pior prognóstico em CECP e CEE. Entretanto, poucos estudos foram desenvolvidos a fim de compreender suas funções e sua regulação epigenética ainda não é descrita.

Sendo assim, este projeto visa caracterizar o perfil de metilação de *FBXL7* em tumores do TAS a fim de avaliar se este seria um potencial biomarcador de transformação do epitélio escamoso e se estaria associado ou não à exposição aos fatores de risco. Além disso, também visamos investigar os efeitos dessa modificação epigenética sobre a expressão gênica e proteica de *FBXL7*. Finalmente, devido à associação de seus alvos de degradação com vias celulares fundamentais para o desenvolvimento de CECP e CEE (ciclo celular e apoptose), avaliamos se a desregulação epigenética de *FBXL7* pode contribuir para as alterações dos níveis proteicos de Aurora A e/ou Survivina nestes tumores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar alterações moleculares de *FBXL7* e de seus alvos no carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) e carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de metilação e expressão gênica de *FBXL7* em amostras de pacientes com CEE e CECP.
- Verificar, em CEOF, se a presença do DNA viral de HPV pode estar associado com o perfil molecular de *FBXL7*.
- Correlacionar os níveis de metilação com os níveis de expressão gênica de *FBXL7* em CEE e CECP.
- Associar os níveis de metilação e de expressão gênica com os dados clínico-patológicos de pacientes com CEE e CECP.
- Avaliar a expressão proteica de *FBXL7*, *AURKA* e *BIRC5* em amostras de CEE e CECP e associar com os dados clínico-patológicos de pacientes com CEE e CECP.
- Correlacionar a expressão proteica de *FBXL7* com a expressão proteica de *AURKA* e *BIRC5*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÉTICA

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), sob o número 116/11.

3.2 SOBRE A ORIGEM DE AMOSTRAS HUMANAS E DE DADOS PARA ANÁLISES *IN SILICO*

Nesta sessão é especificada a origem e critérios de seleção das amostras ou dados depositados em repositórios online utilizados neste trabalho.

3.2.1 AMOSTRAS HUMANAS

Este trabalho utilizou amostras de carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) e dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (CECP) da laringe (CEL), cavidade oral (CECO) e orofaringe (CEOF). Todos os pacientes tiveram diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide confirmado por patologista. Todos os pacientes eram virgens de tratamento, ou seja, nenhum paciente passou por procedimento prévio de quimioterapia ou radioterapia até o momento da coleta tecidual.

As amostras de tecido tumoral ou do tecido adjacente não tumoral congeladas de pacientes com CEE (n = 71) foram obtidas de dois hospitais brasileiros, Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ) e INCA, neste último armazenadas no Banco Nacional de Tumores da instituição (BNT/INCA). Amostras congeladas de pacientes com tumores nos demais sítios tumorais, CEL (n = 56) ou CECO (n = 16), foram obtidas no BNT/INCA.

Amostras fixadas em formol e incluídas em parafina de pacientes com CEE (n = 26) originam-se do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA) ou da Divisão de Patologia do INCA (DIPAT/INCA), enquanto as amostras dos pacientes com CEL (n = 47) ou CEOF (n = 80) foram obtidas exclusivamente da DIPAT/INCA.

3.2.2 AMOSTRAS HUMANAS PARA ANÁLISES DE HETEROGENEIDADE INTRATUMORAL DE CEE

Dentre os pacientes de CEE já citados, foram feitas biópsias para análise da heterogeneidade intratumoral em cinco casos. Duas biópsias, uma superficial (1) e

outra profunda (2) eram coletadas de cada terço do tumor (Tumor A, Tumor B e Tumor C) e duas biópsias eram coletadas do tecido adjacente não tumoral, uma em referência à parte proximal e outra à distal do órgão. Assim, para cada paciente incluído na avaliação de heterogeneidade intratumoral, seis biópsias tumorais e duas do tecido adjacente não tumoral foram coletadas, quando possível.

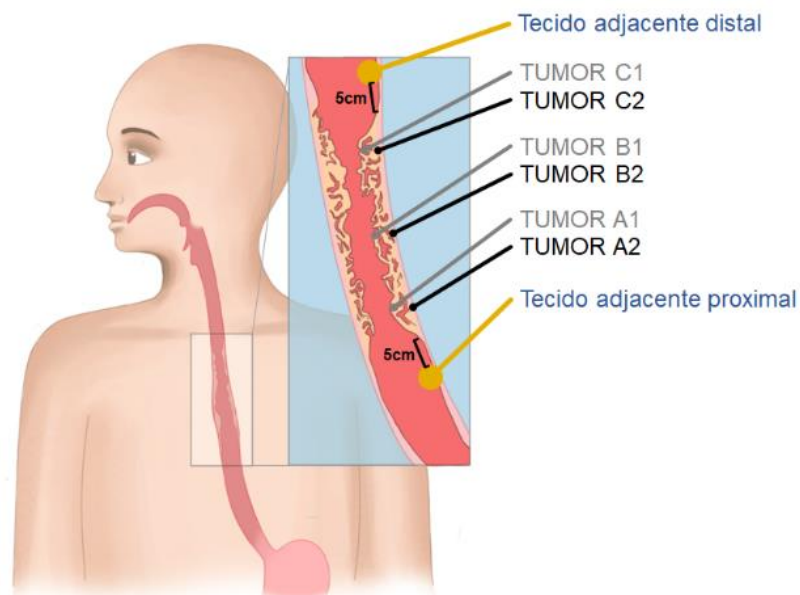


Figura 3.1 - Esquema de coleta das biópsias em pacientes com CEE para avaliação de heterogeneidade intratumoral. Foi coletado um total de três pares de biópsias ao longo do tumor (TUMOR A, TUMOR B e TUMOR C), sendo que cada par de biópsias correspondia a uma mesma localização, sendo uma mais superficial (1) (texto em cinza) e seu par mais profundo (2) (texto em preto). Foram coletadas também duas biópsias do tecido adjacente não tumoral (texto em azul), uma de origem proximal e outra distal.

3.2.3 DADOS PÚBLICOS DE AMOSTRAS HUMANAS DEPOSITADOS

Foram utilizados dados depositados nas plataformas Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (EDGAR; DOMRACHEV; LASH, 2002) e The Cancer Genome Atlas (TCGA) (<https://www.cancer.gov/tcga>).

3.2.3.1 DADOS PROVENIENTES DO GENE EXPRESSION ONMINIBUS

A partir do GEO, foram utilizados dados provenientes da plataforma de microarranjo de metilação Illumina HumanMethylation450 BeadChip, adotando os valores de beta (b-value) depositados referentes aos estudos:

- GSE38271: FF and FFPE HPV+ and HPV- HNSCC and HNSCC cell lines (LECHNER; FRAMPTON; FENTON; FEBER *et al.*, 2013).
- GSE72874: Methylome and transcriptome of EAC (KRAUSE; NONES; LOFFLER; NANCARROW *et al.*, 2016).
- GSE56044: Genome-wide DNA methylation analysis of lung carcinoma (KARLSSON; JÖNSSON; LAUSS; BRUNNSTRÖM *et al.*, 2014).
- GSE68825: caArray_EXP-598: TCGA (LUSC): Analysis of DNA Methylation for LUSC using Illumina Infinium HumanMethylation450 platform (jhu-usc).
- GSE46306: Genome-wide DNA methylation in cervical tissue (FARKAS; MILUTIN-GAŠPEROV; GRCE; NILSSON, 2013).
- GSE99511: Identification and validation of a novel 3-gene methylation classifier for HPV-based cervical screening on self-samples (VERLAAT; SNOEK; HEIDEMAN; WILTING *et al.*, 2018).

3.2.3.2 DADOS PROVENIENTES DO TCGA

Foram utilizados dados de pacientes dos projetos TCGA-HNSC (carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço) e TCGA-ESCA (câncer de esôfago). Os critérios de inclusão e exclusão levaram em conta o tipo histológico e a localização do tumor primário (Figura 3.2). Esta seleção de casos foi usada para todas as demais análises que utilizaram o TCGA como base de dados.

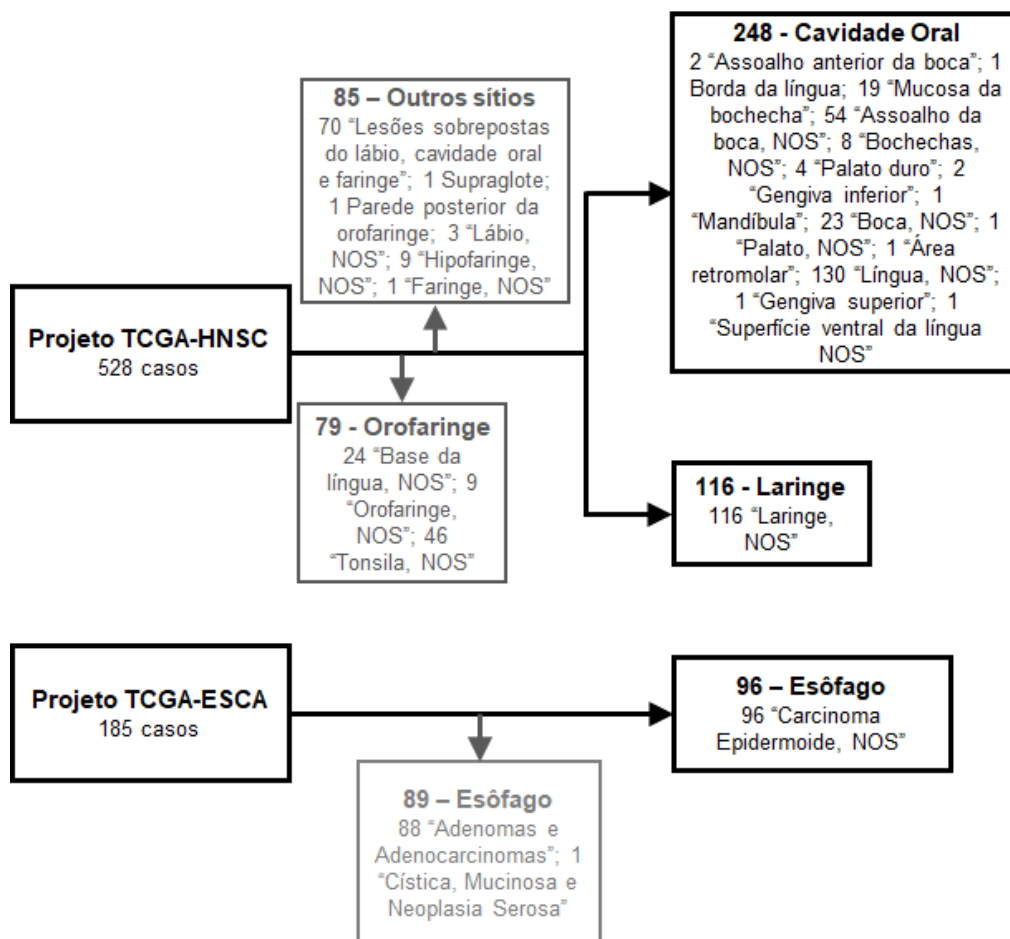


Figura 3.2 - Representação da seleção das amostras cujos dados foram depositados no TCGA nos projetos TCGA-HNSC e TCGA-ESCA. A inclusão ou exclusão levou em conta a o sítio e localização do tumor primário. Em cinza: Número de casos excluídos e critérios de exclusão; Em preto: Número de casos incluídos e critérios de inclusão; NOS: Sítio não especificado.

3.3 ANÁLISES *IN SILICO*

3.3.1 MICROARRANJO DE METILAÇÃO DO DNA DO GRUPO

Em trabalho prévio do grupo, foi realizada a técnica de microarranjo de metilação com o chip *Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit (Illumina, Califórnia, Estados Unidos)* para avaliação de citosinas diferencialmente metiladas no CEE, CECO e CEL. Ao todo, foram incluídas 16 amostras não tumorais e 24 amostras tumorais de CEE, 11 amostras não tumorais e 20 amostras tumorais de CEL e sete amostras não tumorais e 15 amostras tumorais de CECO.

Resumidamente, após a reação de conversão com bissulfito de sódio, 250 ng das amostras tumorais e adjacentes não tumorais tratadas foram preparadas para a

aplicação no chip, de acordo com as instruções do fabricante. Todas as análises do microarranjo foram feitas com auxílio do software RStudio com diferentes pacotes do Bioconductor. Para importação dos dados brutos, foi utilizado o pacote "methyumi". Em seguida, foram removidas as sondas de reação cruzada, sondas presentes nos cromossomos sexuais e aquelas que contêm SNPs conhecidos com uma frequência alélica de pelo menos 5% na população em geral (CHEN; LEMIRE; CHOUFANI; BUTCHER *et al.*, 2013). Além disso, foram removidas também sondas de baixa qualidade com um valor de p de detecção $< 0,05$ e amostras que continham mais de 1% das sondas com valor de p de detecção $< 0,05$ (pacote "wateRmelon").

Entretanto, nenhuma amostra foi excluída. Após a correção de background e ajuste de viés de fluoróforo (pacote "lumi"), foi feita a correção para o viés de tipo de sonda (tipo I e tipo II) utilizando o pacote "wateRmelon". O valor de beta (b-value) representa a razão entre a intensidade do alelo metilado e a soma das intensidades dos alelos metilado e não metilado e será utilizado para as análises posteriores.

Inicialmente, para a identificação de sítios CpG cujos níveis de metilação pudessem ser usados para o diagnóstico precoce de CEE, foi feita uma análise de predição para microarranjos (do inglês, *prediction analysis for microarrays* - PAM) com auxílio do software BRB ArrayTools, versão 4.3.0 - Beta_2. Nesta etapa, sete amostras tumorais e sete amostras adjacentes não tumorais pareadas de pacientes com CEE foram utilizadas. A partir dos dados de metilação, foi avaliado o número mínimo de sítios CpG necessário para a distinção dos tecidos não tumorais e tumorais com maior sensibilidade e especificidade. Essa análise nos mostrou que os níveis de metilação de apenas uma sonda, cg11339964, localizada no corpo do gene *FBXL7*, era capaz de distinguir os dois tecidos com acurácia de 100%. Portanto, esta sonda foi utilizada nas demais análises desta dissertação.

3.3.2 MICROARRANJO DE EXPRESSÃO GÊNICA DO GRUPO

Dados provenientes de microarranjo de expressão de trabalho prévio do grupo foram utilizados. Ao todo, foram utilizadas 11 amostras de tecido adjacente não tumoral e 17 do tumor para CEL, e 15 amostras do tecido adjacente não tumoral e 15 do tumor para CEE. Brevemente, O RNA foi extraído com o RNeasy Mini Kit (Qiagen) e a integridade do RNA extraído foi avaliada utilizando o equipamento Bioanalyzer (Agilent), com o chip RNA 6000 Nano, seguindo os protocolos dos fabricantes. A partir do RNA, o cDNA foi sintetizado com kit WT Expression Kit (Thermofisher), biotinilado, amplificado e hibridizado no chip Human Exon 1.0 ST array (Affymetrix, Inc.).

Os microarranjos foram lidos em scanner GeneArray® Scanner 7G (Affymetrix), programado segundo as instruções do fabricante. A captura das imagens e análise inicial das hibridações foram feitas com o software Affymetrix® Expression Console™ e os arquivos gerados foram salvos em formato *.cel.

Os dados brutos (arquivos *.cel) foram normalizados no software Expression Console (Affymetrix) utilizando o algoritmo Robust Multi-array Average (RMA) para criação da matriz de genes e expressão.

3.3.3 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS (CNA) E EXPRESSÃO DE *FBXL7*

Avaliamos as CNA nos microarranjos de metilação do grupo pelo software RStudio utilizando a função “champ.CNA” (pacote “ChAMP”). Nesta análise, a intensidade de cada sonda é avaliada e grupos de sondas são agrupados de acordo com a similaridade de intensidade, gerando a média de intensidade do segmento. Em seguida, esta média é comparada à intensidade do mesmo segmento avaliada em amostras controles, dados fornecidos pelo próprio pacote. Estes são referentes a amostras de sangue de indivíduos controle. A razão entre a média de segmento da amostra interrogada e a média de intensidade do mesmo segmento nas amostras controle é convertida em log₂, valor fornecido ao fim da análise (seg.mean). No presente estudo, adotamos um ponto de corte de seg.mean acima de 0,3 para ampliações e abaixo de -0,3 para deleções. Assim, consideramos ampliações quando pelo menos 50% das células apresentaram ganho de uma cópia da região e deleções quando pelo menos 50% das células apresentaram perda de uma cópia da região. Ao todo, foram avaliadas 16 amostras não tumorais e 24 amostras tumorais de CEE, 11 amostras não tumorais e 20 amostras tumorais de CEL e sete amostras não tumorais e 15 amostras tumorais de CECO.

Por meio do cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) (CERAMI; GAO; DOGRUSOZ; GROSS *et al.*, 2012) (um portal para visualizar, analisar e adquirir informações de amostras provenientes de repositórios de dados, como o TCGA), foram avaliadas as alterações de número de cópias de *FBXL7* nos tumores de CEE, CEL e CECO pela ferramenta OncoGrid. A plataforma utilizada para obtenção dos dados foi Affymetrix SNP 6.0. Os estudos selecionados foram *Esophageal Carcinoma* (TCGA. Provisional) e *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* (TCGA, Provisional). Cabe ressaltar que a plataforma aplica os mesmos pontos de corte

utilizados em nossos dados de microarranjo de metilação, ou seja, ampliações quando $\text{seg.mean} > 0,3$ e deleções quando $\text{seg.mean} < -0,3$. Os dados de expressão foram obtidos no cBioPortal para as mesmas amostras em que o perfil de CNA foi avaliado. A quantificação das expressões foi feita pela plataforma *Illumina HiSeq* (RNA-seq) e as análises foram feitas pelos valores de RPKM (leituras por quilobase de transcrito, por milhão de leituras mapeadas).

3.3.4 PERFIL DE METILAÇÃO DE MER4A1 GENÔMICO

A posição genômica das sondas da plataforma *Illumina HumanMethylation450 BeadChip* e a posição genômica dos elementos repetitivos (ER) gerados pelo *RepeatMasker* (<http://www.repeatmasker.org>) foram obtidos em *UCSC Genome Browser* (<http://www.genome.ucsc.edu>), acesso dia: 08/07/2019 (KENT; SUGNET; FUREY; ROSKIN *et al.*, 2002).

A fim de identificar quais sondas do microarranjo de metilação poderiam estar contidas nos elementos repetitivos MER4A1, foi desenvolvido um *script* utilizando o programa R versão 3.6 no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio versão 1.2.1335.

A posição genômica dos ER é disponibilizada considerando toda sua ocupação, da seguinte forma:

Cromossomo: Base inicial - Base final

As sondas do microarranjo de metilação são compostas de algumas dezenas de bases, contudo o perfil de metilação de apenas uma citosina é avaliado. Assim, temos em relação a esta citosina a seguinte coordenada genômica:

Cromossomo: Base (Citosina) avaliada

Diante disto, verificamos quais citosinas/sondas avaliadas no microarranjo de metilação estariam presentes dentro da coordenada genômica dos ER.

3.4 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PUREZA DE ÁCIDOS NUCLEICOS

As extrações de ácidos nucleicos ocorreram no BNT/INCA, como determina o regimento da instituição.

3.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO CONGELADO

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o DNeasy Mini kit® (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante:

As amostras provenientes de biópsias de CEE e CEL foram colocadas em microtubo de 1,5 mL contendo 150 µL de tampão ATL e maceradas com auxílio de pistão. Após esse processo, foram adicionados mais 150 µL de tampão ATL e proteinase K, com posterior incubação a 56°C sob agitação constante por duas horas no equipamento Thermomixer Comfort (EPPENDORF®). A inativação da proteinase K foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante 10 minutos, seguida por centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos e adição de 200 µL de tampão de ligação e 200 µL de etanol absoluto. Após a homogeneização das soluções, este conteúdo foi então transferido para uma coluna com tubo coletor (contidos no kit) e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Adicionou-se em seguida 500 µL de tampão de lavagem à coluna e esta foi centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foram adicionados então 500 µL de um segundo tampão de lavagem à coluna, sendo centrifugada a 14.000 rpm por 1 minuto. A solução coletada no tubo foi descartada. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos para a retirada de qualquer resíduo do tampão. O tubo coletor foi então descartado e substituído por um microtubo de 1,5 mL. Por fim, foram acrescentados 30 µL de tampão de eluição (contido no kit) ao centro da coluna seguida de uma centrifugação a 14.000 rpm por 1 minuto e o material coletado foi armazenado no freezer a -20°C para uso posterior.

3.4.2 EXTRAÇÃO DE RNA DE TECIDO CONGELADO

Para a extração do RNA total, foi utilizado o RNeasy Mini kit® (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante: um fragmento da biópsia de até 30 mg foi colocado em um microtubo de 1,5 mL junto com 200 µL do tampão RLT com beta-mercaptoetanol. Após macerar o tecido, com auxílio de um pistão, foram adicionados mais 400 µL do tampão RLT e posteriormente foram centrifugados em microcentrífuga por três minutos a 12.000 x g para sedimentar o material não lisado. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e um volume de etanol 70% foi adicionado. Após homogeneização, 700 µL da solução foram transferidos para uma coluna de purificação alocada em um tubo coletor de 2 mL e centrifugados por 15 s 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 à coluna de purificação e centrifugados por 15 s a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e 500 µL do tampão RPE foram adicionados à coluna de purificação e, posteriormente, centrifugados por dois minutos a 8.000 x g. Em seguida, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL e centrifugada por um minuto a 12.000 x g. Após essa centrifugação, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e 30 µL de água livre de RNase foram adicionados no centro da membrana, sem encostar a ponteira na mesma, a fim de eluir o RNA total. Após um minuto à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados por mais um minuto a 8.000 x g. A coluna foi descartada e posteriormente os tubos contendo o RNA total extraído foram armazenados à -80°C.

3.4.3 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO

A extração foi realizada como descrito pelo manual de uso do QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN®). Desta forma, foram utilizadas para a extração de DNA seis seções com 10 µm de espessura dos blocos contendo material de ressecção cirúrgica ou biópsia de CCE de orofaringe.

Esta etapa foi seguida do processo de desparafinização realizado a partir da adição de 1 mL de xilol aos cortes isolados em microtubos, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vortex por 10 segundos e centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos para a sedimentação do material celular, seguida da remoção do sobrenadante com a pipeta. A retirada do xilol ocorreu com a adição de 1 mL de álcool etílico absoluto nos microtubos contendo o material, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vortex por 10 segundos e centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos para a sedimentação do material celular. Seguido da remoção do sobrenadante com a pipeta.

O resíduo de álcool etílico foi evaporado a partir do acondicionamento dos microtubos a uma temperatura de 37°C por 10 minutos. Foram então adicionados tampão de digestão (ATL) e proteinase K, fornecidos no kit, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vortex por 10 segundos e as amostras foram incubadas a 56°C por uma hora no equipamento Thermomixer Comfort (EPPENDORF®). A inativação da proteinase K foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante uma hora. As amostras foram então centrifugadas brevemente a 12.000 rpm e foram adicionados 200 µL de tampão de ligação AL e 200 µL de álcool etílico absoluto. Após a homogeneização das soluções

e centrifugação breve a 12.000 rpm, este conteúdo foi então transferido para uma coluna com tubo coletor (QIAamp MinElute column) e centrifugado a 8.000 rpm por dois minutos.

A solução coletada no tubo foi descartada. Adicionou-se em seguida 500 µL de tampão de lavagem (AW1) à coluna e esta foi centrifugada a 8.000 rpm por dois minutos. A solução coletada no tubo foi descartada. Foram adicionados em seguida 500 µL de um segundo tampão de lavagem (AW2) à coluna e esta foi centrifugada a 8.000 rpm por dois minutos. A solução coletada no tubo foi descartada. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por três minutos para a retirada de qualquer resíduo do tampão. O tubo coletor foi então descartado e substituído por um microtubo de capacidade de 1,5 mL. Em seguida, foram acrescentados ao centro da coluna 50 µL de tampão de eluição (ATE). Por fim, este material foi centrifugado a 14.000 rpm por um minuto e o DNA coletado foi estocado em refrigeração a -20°C.

3.4.4 QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PUREZA DOS ÁCIDOS NUCLEICOS PELO MÉTODO DE ABSORVÂNCIA

Foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) para quantificação dos ácidos nucleicos pela quantificação da absorção de luz no comprimento de onda 260 nm. A qualidade da extração foi medida pela razão da absorbância dos ácidos nucleicos em 230 nm/260 nm e 280 nm/260 nm para avaliação de contaminantes orgânicos ou inorgânicos, respectivamente. As amostras foram consideradas puras quando estas razões eram iguais ou superiores a 1,7.

3.4.5 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELO VIRUS DO PAPILOMA HUMANO (HPV) NAS AMOSTRAS DE CEOF

A caracterização da infecção pelo papilomavírus humano nas amostras de orofaringe foi realizada previamente no grupo (BUEXM, A. L. 2018). Brevemente, o DNA das amostras incluídas em parafina foi testado quanto à sua integridade pela amplificação de um fragmento de DNA genômico da *β-Actina* (com amplicon de 250 pb). As amostras com integridade confirmada eram submetidas à técnica de PCR quantitativa (PCRq) para amplificação do gene E6 do HPV com corte previamente estabelecido a partir de amostras de câncer cervical. O bloco de parafina das mesmas amostras era também submetido à imuno-histoquímica para p16.

Para o presente trabalho, apenas amostras positivas para ambos os testes, amplificação de E6 e marcação de p16, foram consideradas HPV positivas e amostras com positividade em apenas um deles ou negativas em ambos os casos, eram consideradas HPV negativas.

3.5 TRATAMENTO DO RNA COM DNase I E TRANSCRIÇÃO REVERSA

3.5.1 TRATAMENTO DO RNA COM DNase I

Esta etapa se deu com o objetivo de quantificar os níveis de expressão gênica de *MER4A1*, e foi executada antes da reação de transcrição reversa utilizando DNase I (Invitrogen™). O tratamento se deu conforme manual do fabricante: Na primeira etapa, foram adicionados a um microtubo de 200 µL:

- 250 ng de RNA
- 1x Reaction Buffer
- 1 unidade de DNase I
 - Água deionizada autoclavada para volume final de 10 µL. Todo o conteúdo foi suavemente misturado. Seguiu-se incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada a solução Stop Solution. Por fim, a mistura foi incubada por 10 minutos a 65°C a fim de inativar a enzima. O volume final da reação é de 11 µL, procedendo imediatamente para a etapa de Reação de Transcrição Reversa (item 3.5.2).

Amostras utilizadas exclusivamente na quantificação dos níveis de RNAm de *FBXL7* e *GAPDH* não passaram por esse tratamento uma vez que os primers compreendiam regiões de junção exon-exon e foram verificados através da ferramenta de alinhamento de primers Primer-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para possíveis ligações no genoma.

3.5.2 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a análise da expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*- PCR) quantitativa (PCRq), foi necessário primeiramente transcrever o RNAm recém extraído em um DNA complementar (cDNA). O cDNA possui uma sequência de desoxirribonucleotídeos complementar à sequência do RNAm. Este procedimento é essencial para a PCR porque as moléculas de RNA são

muito instáveis e pelo fato da DNA polimerase, enzima responsável pela reação, ter a capacidade de polimerizar fitas complementares de DNA a partir, somente, de outra fita de DNA.

A síntese de cDNA foi feita através da reação de transcrição reversa (RT), na qual o RNA total extraído foi incubado com a enzima transcriptase reversa SuperScript II® (Invitrogen). Em um microtubo, foram adicionados 250 ng de primer randômico (Promega), 500 ng de RNA alvo, 1 µL do set de dNTPs a 10 mM e água livre de RNase suficiente para completar o volume final de 20 µL de reação e subsequente incubação por cinco minutos a 65°C. Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão da enzima transcriptase reversa (5X) fornecido pelo fabricante (Invitrogen) e 2 µL de DTT 0,1 M e subsequente incubação por dois minutos a 25°C. Em seguida, foi adicionado 1 µL de SuperScript II® (200 U) e as reações foram incubadas no termociclador por 10 min a 25°C e 50 min a 42°C. A inativação da enzima foi feita incubando a reação a 70°C por 15 min. Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (PCRq)

A PCRq ou PCR em tempo real é um tipo de reação em cadeia da polimerase em que podemos observar a geração de novas cópias de determinada sequência do DNA ao longo da reação, ou seja, em tempo real. Esta metodologia foi realizada em termociclador equipado com detectores de fluorescência que acompanham o processo de amplificação através da captação de sinal fluorescente emitido por moléculas específicas (fluoróforos), quando estas interagem com o DNA ao longo de cada ciclo da reação.

O fluoróforo mais comumente utilizado nas práticas de PCRq é o reagente SYBR Green que emite fluorescência após interagir fisicamente com a dupla-fita de DNA ao longo do processo de amplificação.

A PCR quantitativa (PCRq) foi otimizada para cada par de oligonucleotídeos a fim de avaliar a expressão gênica das isoformas de *FBXL7*, *MER4A1*, *TYK2* e *TARBP2* nas amostras de tecido congelado. Foi utilizado o sistema Rotor-Gene Q (Qiagen) e o reagente QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). O gene *GAPDH* foi utilizado como gene-referência. As sequências dos oligonucleotídeos específicos para cada gene encontram-se no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das isoformas gênicas de *FBXL7*, *MER4A1*, *TYK2*, *TARBP2* e *GAPDH* (gene - referência) na PCRq.

| Alvo | Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3') | Tamanho do amplicon (pb) | Referência |
|------------------------------|---|--------------------------|-------------------------|
| <i>FBXL7</i> - Isoforma 1 | S: TGC GGG GAC CTCTCCAG | 199 | Desenhado pelo grupo |
| | AS: CCTTTGCCCTCACTGCCGTA | | |
| <i>FBXL7</i> - isoforma 2 | S: AGACCGGGTCAGTTTTACAGC | 252 | Desenhado pelo autor |
| | AS: GTCGGAGTCTTCGCTGGTAG | | |
| <i>FBXL7</i> - isoforma 3 | S: AGCTCGAGCATCTCATCTGAC | 95 | Desenhado pelo autor |
| | AS: CTCAGGTCGGAGTCTTCGC | | |
| <i>MER4A1</i> | S: AGAATGTGCCTGTTCTTCTCTCA | 120 | Desenhado pelo autor |
| | AS: GAAGTACATTTGTTGGTTGGGTTT | | |
| <i>TYK2</i> | S: GAAAGCCCTCAAGGCAGACT | 132 | Desenhado pelo autor |
| | AS: GACTTCTCGCCTTGGTCCTC | | |
| <i>TARBP2</i> | S: GAAGACAGACCGGCAGTGAA | 102 | Desenhado pelo autor |
| | AS: CCTGGAAGTGGCATGCAACAT | | |
| <i>GAPDH</i> | S: CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA | 124 | DE A SIMÃO et al., 2011 |
| | AS: AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT | | |

As reações de PCRq foram feitas em duplicata e dois controles negativos foram incluídos em cada reação. A PCRq foi realizada em um rotor de 72 poços e em cada reação foram adicionados 5 µL de tampão QuantiFast SYBR Green (Qiagen), 0,3 µL de oligonucleotídeos específicos a 10 µM, 1µL de cDNA diluído 1:20 e água deionizada autoclavada para completar o volume final de 10 µL. A reação de amplificação foi realizada através das seguintes condições:

- Pré-desnaturação: 5 minutos a 95°C;
- 40 ciclos de desnaturação (5 segundos a 95°C) e anelamento e extensão (etapas integradas – 10 segundos a 60°C), com posterior captura de fluorescência;
- Curva de dissociação: 65°C - 95°C.

Após a amplificação dos produtos, é realizada a análise da curva de dissociação gerada pelo software do termociclador. Essa curva é importante para verificar se os produtos observados na PCRq são específicos para os oligonucleotídeos analisados, para verificar se há formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos e contaminação da reação (controle negativo

amplificando). Um gráfico representativo da curva de dissociação está representado na **Figura 3.2**.

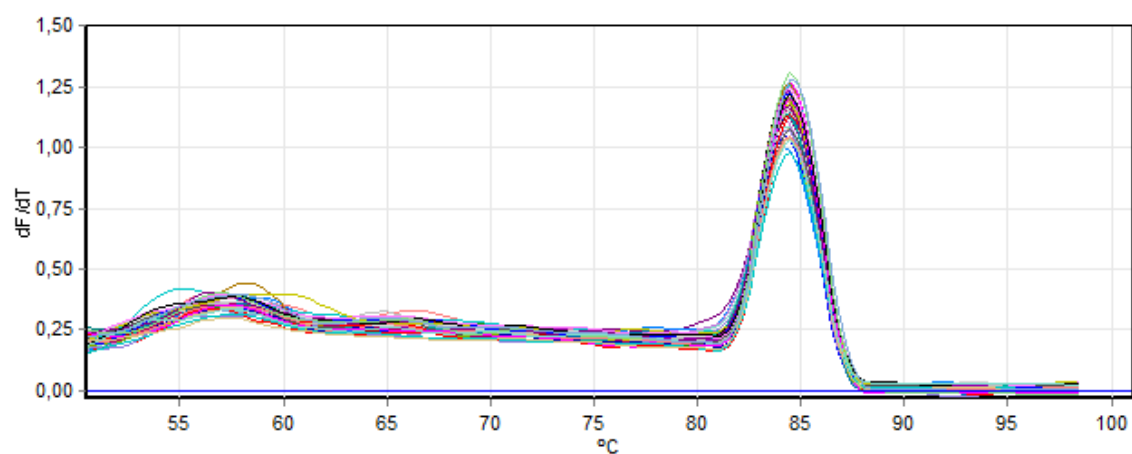


Figura 3.2 - Exemplo de curva de dissociação de PCRq.

Nota: Esta curva tem como base a captura da fluorescência à medida que aumenta a temperatura. Com o aumento da temperatura, a dupla-fita dos produtos vai se dissociando e, com isso, a emissão de fluorescência vai diminuindo. Assim, é possível verificar se o produto é específico ou não. Nesse caso, o produto é específico, não há formação de estruturas secundárias de oligonucleotídeos e nem contaminação da reação.

Após a reação, foi feita a quantificação relativa do RNAm de cada gene, utilizando o *GAPDH* como controle interno, através do método de ΔCT (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008). Durante a reação de amplificação, é gerado um gráfico em que o eixo Y representa o sinal de fluorescência captado e o eixo X, o número de ciclos da reação. No primeiro ciclo da reação de PCR, há pouca emissão de fluorescência. É justamente isso que define a linha de base do gráfico de amplificação. Ao decorrer da reação, há um aumento do sinal de fluorescência, indicando um acúmulo de produto de PCR. Esse acúmulo de produto de PCR é representado através de uma curva exponencial. Durante a fase exponencial, é determinado um limiar de detecção de fluorescência fixo acima da linha de base (*threshold*). A partir desse limiar, é obtido o parâmetro CT (ciclo de *threshold*), definido como o número de ciclos, inteiro ou não, em que a fluorescência ultrapassou o limiar previamente estabelecido (Figura 3.2). Como o experimento era feito sempre em duplicata, foi calculada a média dos CTs tanto para o gene alvo como para o gene - referência (*GAPDH*). A diferença entre as

médias dos CTs (ΔCT) de cada gene de interesse e a do *GAPDH* foi calculada pelo programa Microsoft Excel e os valores de quantificação relativa foram expressos pelas fórmulas $2^{-\Delta CT}$ para todos os genes avaliados, também calculados pelo programa Microsoft Excel.

3.7 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO, REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE E ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO POR PIROSEQUENCIAMENTO

3.7.1 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Parte do DNA extraído e quantificado foi tratado/modificado com bissulfito de sódio (NaHSO_3) para determinar o estado de metilação do gene de interesse. O tratamento com bissulfito de sódio é responsável pela desaminação das citosinas (C) não metiladas, convertendo-as em uracilas (U) e na amplificação por PCR esses resíduos serão convertidos em timina (T) (**Figura 3.3**). As citosinas metiladas não sofrem desaminação, e permanecem inalteradas (LIU & XU, 2004; PATTERSON et al., 2011).

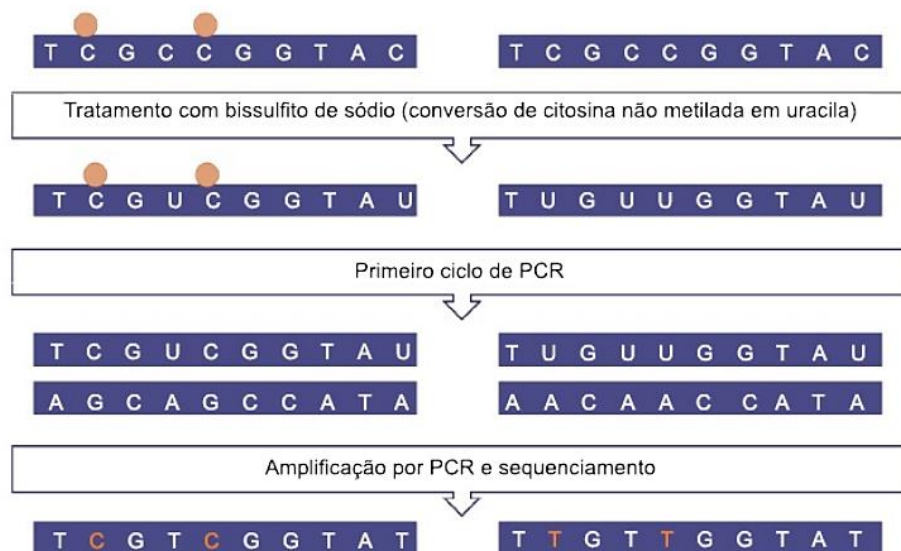


Figura 3.3 - Tratamento do DNA com bissulfito de sódio para determinar o estado de metilação dos genes de interesse. O tratamento com bissulfito de sódio é responsável pela desaminação das citosinas (C) não metiladas, convertendo-as em uracilas (U) e na amplificação por PCR esses resíduos serão convertidos em timina (T). As citosinas metiladas não sofrem desaminação, e permanecem inalteradas. Fonte: Adaptado de (NICIURA; SARAIVA, 2014).

Para tanto, 500 ng de DNA genômico foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio, utilizando EZ DNA Methylation Kit® (Zymo Research, Estados Unidos), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Brevemente:

- 5uL de *M-Dilution Buffer* foram adicionados a 500 ng de DNA e o volume foi ajustado para 50 uL com água ultrapura em tubo de 200 uL. A solução foi incubada por 15 minutos a 37°C.
- 100 uL de *CT Conversion Reagent* foram adicionados.
- A solução foi incubada no termocilador em: 95°C por 30 segundos, 50°C por 60 minutos - 16 ciclos. Mantida por 4°C e depois colocada em gelo por 10 minutos.
- Adicionamos 400 uL de *M-Binding Buffer* a uma coluna *Zymo-Spin IC* adaptada num tubo de coleta.
- A solução com o DNA foi misturada com o *M-Binding Buffer* na coluna.
- Centrifugamos a 10.000 g por 30 segundos. Adicionamos 100 uL de *M-Wash Buffer* na coluna e centrifugamos à velocidade máxima por 30 segundos.
- Adicionamos 200 uL de *M-Desulphonation Buffer* na coluna e incubamos por 20 minutos à temperatura ambiente.
- Adicionamos 200 uL de *M-Wash Buffer* e centrifugamos por 30 segundos. Repetimos essa etapa.
- Colocamos a coluna num microtubotubo de 1,5 ml e adicionamos 20 uL de *M-Elution Buffer*. Centrifugamos à velocidade máxima por 30 segundos. Assim, sua concentração final é de 25 ng/ µL após eluição.

3.7.2 REAÇÃO EM CADEIRA DA POLIMERASE (PCR)

Depois da conversão com bissulfito, foi realizada uma PCR para amplificar o DNA tratado. Nesta reação, as uracilas foram amplificadas como timina e as citosinas metiladas como citosinas (**Figura 3.3**). Desta forma, frente à análise no sequenciamento, todas as citosinas lidas correspondem às citosinas metiladas no DNA genômico.

Para esta reação, um total de 25 ng de DNA genômico foi amplificado utilizando primers específicos para a região do gene de interesse. Para a mesma região de *FBXL7*, foram utilizados dois pares de primers, um dos pares para DNA proveniente

da extração de amostras congeladas e outro para o DNA proveniente da extração de tecido parafinado (Quadro 3.2).

Quadro 3.2 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados para amplificação das regiões contendo sítios CpGs para técnica de pirosequenciamento.

| Alvo | Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3') | Tamanho do amplicon (pb) | Referência |
|---|---|--------------------------|----------------------|
| <i>FBXL7</i> – Para DNA extraído de tecido congeladas | S: GAGATAGATGTATATTTGGTTG | 262 | Desenhado pelo grupo |
| | AS: biotina-GTGGGTATATGTTATTAGGAT | | |
| | Sequenciamento: ATAAATGTATTTTTT | | |
| <i>FBXL7</i> – Para DNA extraído de tecido parafinado | S: GTTTTTTGATTGATATTTTTTGT | 84 | Desenhado pelo autor |
| | AS: biotina-GTGGGTATATGTTATTAGGAT | | |
| | Sequenciamento: ATAAATGTATTTTTT | | |

Legenda: S: Primer senso; AS: Primer anti-senso.

Para que posteriormente apenas uma das fitas amplificadas seja selecionada, um dos primers utilizados na reação de PCR deve ser marcado com biotina. Além disso, nós incluímos na sequência a ser analisada ao menos uma citosina que não fosse parte de um sítio CpG como controle interno da conversão com bissulfito de sódio. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL e com as condições descritas no Quadro 3.3.

Quadro 3.3 - Concentração de cada reagente utilizado na reação de PCR com DNA modificado.

| Alvo | Tampão | dNTP | Co-fator | Primers Senso e Anti-senso | Enzima | DNA (tratado com bissulfito de sódio) | Água deionizada autoclavada |
|---|---------------|-------|--------------------------|----------------------------|--|---------------------------------------|--|
| <i>FBXL7</i> – Para DNA extraído de tecido frescas congeladas | 1X PCR Buffer | 10 mM | 3 mM MgSO ₄ | 0,2 µM | Platinum™ Taq DNA Polimerase High Fidelity 2 U | 25 ng | Para completar o volume final de 50 µL |
| <i>FBXL7</i> – Para DNA extraído de tecido parafinado | 1X PCR Buffer | 10 mM | 1,5 mM MgCl ₂ | 0,2 µM | Platinum™ Taq DNA Polimerase 2 U | 25 ng | Para completar o volume final de 50 µL |

E as condições da reação de amplificação para cada par de primers estão descritas no Quadro 3.4.

Quadro 3.4 – Condições de temperatura e ciclagem das reações de PCR.

| Genes | Desnaturação Inicial | 50 ciclos | | | Extensão Final |
|---|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| | | Desnaturação | Anelamento | Extensão | |
| <i>FBXL7</i> – Para DNA extraído de tecido frescas congeladas | 15 minutos a 95°C | 30 segundos a 95°C | 30 segundos a 52°C | 30 segundos a 72°C | 10 minutos a 72°C |
| <i>FBXL7</i> – Para DNA extraído de tecido parafinado | 5 minutos a 95°C | 30 segundos a 95°C | 45 segundos a 50°C | 30 segundos a 72°C | 10 minutos a 72°C |

Após PCR, os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose 2% com marcadores de peso molecular.

3.7.3 PIROSSEQUENCIAMENTO

O pirosequenciamento é a técnica padrão-ouro para analisar de maneira quantitativa a metilação do DNA em regiões dos genes de interesse. Essa técnica necessita que o produto de PCR esteja na forma de fita simples de DNA, para que assim o oligonucleotídeo/primer de sequenciamento anele-se à sequência alvo. Portanto, conforme já foi mencionado (item 3.7.2), uma das fitas do produto de PCR é marcada com biotina (Quadro 3.2). Essa fita é capturada em microesferas revestidas por estreptavidina e o DNA não biotinilado é removido por tratamento com solução alcalina. O DNA biotinilado é lavado para neutralizar o pH básico. Finalmente, a fita simples de DNA é purificada e transferida para uma placa de pirosequenciamento contendo um tampão de anelamento e o primer de sequenciamento.

Para tanto, o protocolo constituiu-se em: produtos de PCR que foram coletados utilizando “beads” revestidas com estreptavidina diluídas em tampão de ligação (10 mM TrisHCl; 2 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% Tween 20 – pH 7,6) com o objetivo de ligar apenas as fitas biotiniladas. Após 10 minutos de agitação, as “beads” foram aspiradas utilizando a “Vacuum Prep Workstation”, lavadas com etanol 70%, seguida por desnaturação com NaOH (0,2 M) e lavagem (10 mM Tris-Acetato – pH 7,6). Após a adição de 40 µL da solução de primer de sequenciamento 0,4 mM diluído em tampão de anelamento (20 mM Tris-Acetato; 2 mM MgAc₂ – pH 7,6), o MIX (“beads” e oligonucleotídeos) foi desnaturado por dois minutos a 80°C e então resfriado por 20 minutos para atingir a temperatura de anelamento dos primers. Os volumes de dNTPs, enzimas e substrato foram definidos de acordo com a sequência a ser injetada. A fita biotinilada foi, então, sequenciada com o sistema PyroMark Q96 (Qiagen).

A técnica de pirosequenciamento (**Figura 3.4**) baseia-se no sequenciamento por síntese, onde temos a adição e incorporação sequencial de nucleotídeos. O nucleotídeo só é incorporado pela DNA polimerase se for complementar à fita molde, sendo que essa incorporação pode ser monitorada em tempo real (DEJEUX et al., 2009). Inicialmente, um oligonucleotídeo desenhado especialmente para o sequenciamento se anela à fita simples do produto gerado na reação de PCR, a qual serve como molde para a síntese. São então adicionadas as enzimas DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase, assim como os substratos adenosina 5' fosfosulfato (APS) e luciferina. Em seguida, o primeiro desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTP) é adicionado à reação. Caso ele seja complementar à fita molde, a DNA polimerase o incorpora à fita que está sendo sintetizada. Cada incorporação é

acompanhada da liberação de pirofosfato (PPi) em uma quantidade equimolar à quantidade de nucleotídeo incorporada. A enzima ATP sulfúrilase converte então o PPi em ATP na presença de APS. O ATP produzido é utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina (reação catalisada pela enzima luciferase) e luz em uma intensidade proporcional à quantidade de ATP. A luz produzida é captada e visualizada como um pico no gráfico luz versus tempo, sendo que a altura de cada pico é proporcional à quantidade de nucleotídeos adicionados. Enquanto isso, a apirase degrada continuamente os nucleotídeos não incorporados e o ATP. Quando esta etapa é concluída, um novo nucleotídeo é adicionado (DEJEUX, 2009).

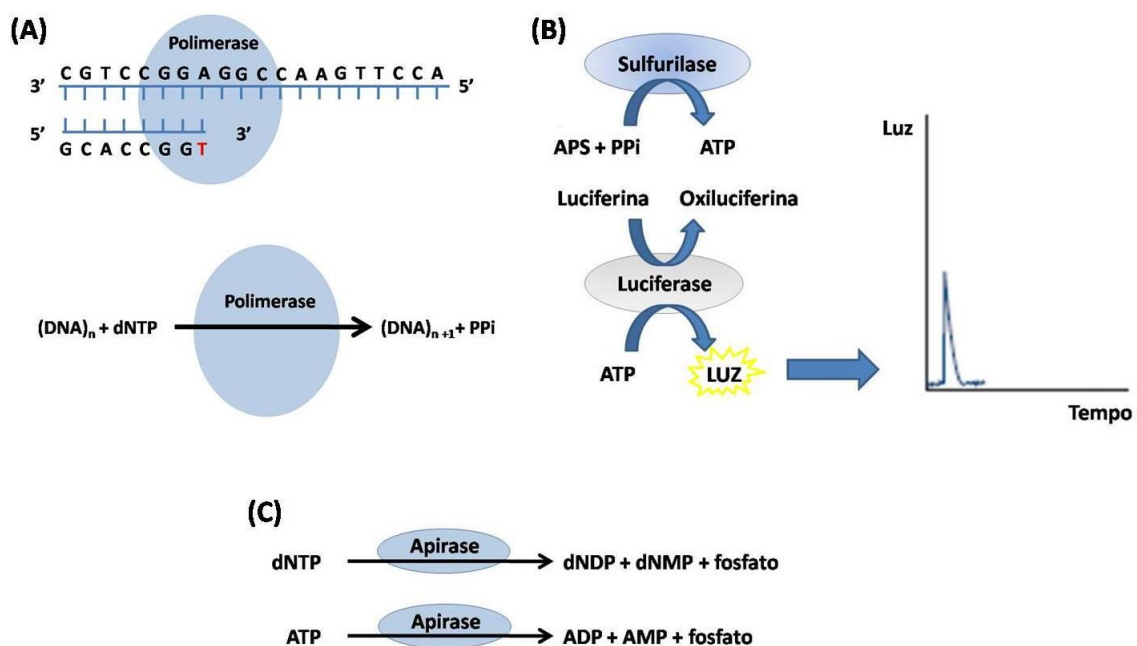


Figura 3.4 - Esquema geral da técnica de pirosequenciamento. (A) Anelamento do primer para sequenciamento à fita simples do produto gerado na reação de PCR e incorporação do desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTP) à fita que está sendo sintetizada com consequente liberação de pirofosfato (PPi). (B) A enzima ATP sulfúrilase converte adenosina 5' fosfosulfato (APS) e PPi em ATP que é posteriormente utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina. Nesta etapa há a liberação de luz, que é captada e representada como um pico no gráfico luz versus tempo. (C) Durante todo o experimento, a enzima apirase degrada os nucleotídeos não incorporados, assim como o ATP. Fonte: Adaptado de: <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454>.

O método de pirosequenciamento trata cada sítio CpG como um polimorfismo C/T e gera um dado quantitativo de proporção relativa do alelo metilado versus o alelo não metilado. Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse são avaliados convertendo os pirogramas em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos (**Figura 3.4**) (VAISSIÈRE et al., 2009). Para o *FBXL7*, consideramos apenas o perfil de metilação da citosina correspondente à sonda do microarranjo de metilação, cg11339964.

3.8 IMUNOHISTOQUIMICA (IHQ)

A partir dos blocos de parafina, foram feitos três cortes seriados na espessura de 3 µm cada e dispostos em lâminas silanizadas. Para cada bateria de IHQ, um controle positivo e um negativo (sem adição de anticorpo primário) eram utilizados. As lâminas passavam por processo de desparafinação, desidratação e hidratação de rotina. Brevemente:

A desparafinação foi feita em estufa a 60°C por no mínimo duas horas e seis banhos em bateria com xilol 100%. Seguiram-se seis banhos em álcool absoluto para desidratação e hidratação em água corrente por cinco minutos.

A etapa de recuperação de antígeno foi feita com o reagente Trilogy™ (Cell Marque) diluído 100x. A solução era colocada em um *steamer* a 98°C para adição das lâminas, onde permaneciam por 50 minutos. Após o término do tempo, a solução era removida do *steamer* para repouso à temperatura ambiente por 10 minutos, seguido por banho em água corrente por 10 minutos.

Após lavagem, as lâminas foram dispostas em uma bandeja e o tecido foi circulado por caneta hidrofóbica e imediatamente coberto com solução salina tamponada com solução Tris 0,05 M, cloreto de sódio 0,15 M (TBS, pH 7.4) por 5 minutos. Esta última etapa foi repetida mais duas vezes.

O excesso de TBS foi retirado e se iniciou o bloqueio da peroxidase endógena com solução Peroxidase Block (Novolink™ - Leica) por cinco minutos. O excesso de Peroxidase Block foi aspirado com bomba a vácuo e foi adicionada a solução de bloqueio de ligações inespecíficas Novocasta™ Protein Block (Novolink™ - Leica) por cinco minutos.

O excesso de solução foi aspirado com bomba a vácuo e, após diluição, o anticorpo primário foi adicionado sobre o tecido e posteriormente incubado em técnica de um dia ou overnight, a 4°C protegidos da luz. As diluições e tempos de incubação dos anticorpos estão no **Quadro 3.5**.

Quadro 3.5 – Anticorpos utilizados na IHQ e respectivas diluições e tempos de incubação.

| Proteína | Anticorpo | Diluição | Tempo de incubação |
|----------|---|----------|--------------------|
| FBXL7 | FBL7 (A-8): sc-374319 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) | 1:2500 | 1 hora |
| AURORA A | Anti-Aurora A - ab1287 (abcam) | 1:100 | Overnight |
| BIRC5 | Survivin (D-8): sc-17779 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) | 1:50 | Overnight |

Após incubação, as lâminas foram lavadas com água destilada e solução de TBS durante cinco minutos por três vezes. O TBS foi aspirado e o anticorpo secundário foi adicionado (Novolink - Leica), por 30 minutos. A lâmina foi lavada com água destilada e posteriormente com TBS durante cinco minutos, por três vezes. O polímero Novolink™ Polymer foi adicionado por 30 minutos e, em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e posteriormente com TBS durante cinco minutos, por três vezes. A revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB) 1:20 por três minutos e as lâminas foram imediatamente lavadas em água corrente por quatro minutos. As lâminas foram imersas em hematoxilina por 30 segundos e lavadas em água corrente por cinco minutos ou até a água ficar clara. As amostras foram submetidas a outra bateria seriada com seis banhos de álcool seguida de bateria com seis banhos de xilol. Para a montagem da lâmina, foi adicionado balsamo sobre o tecido e cobrimos com uma lamínula.

Todas as lâminas foram lidas e avaliadas por patologista experiente que determinou a porcentagem de células com marcação positiva no citoplasma e porcentagem de células com marcação positiva no núcleo. Durante o texto, destacamos as amostras sem marcação (marcação negativa) e com porcentagem de marcação inferior a 5% (citoplasmática ou nuclear), contudo para as análises estatísticas consideramos apenas amostras com marcação superior a 5% das células.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.9.1 ANÁLISES DE DISTRIBUIÇÃO, GRUPOS E TESTES ADOTADOS

Foi adotado o teste Kolmogorov-Smirnov para verificar se os valores obedeciam à distribuição normal. Para análises de comparação entre dois grupos de números amostrais diferentes e com distribuição paramétrica ou não-paramétrica foram adotados os testes de t de Student ou Mann Whitney, respectivamente. Em análises em que todas as mucosas adjacentes e amostras do tumor partem dos mesmos pacientes, foram adotados testes pareados, sendo o testes de t de student pareado no caso de distribuição paramétrica, e o teste de Wilcoxon no caso de distribuição não-paramétrica. Em análises para mais de dois grupos com distribuição paramétrica ou não-paramétrica, o teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis foi utilizado, respectivamente. A análise era seguida dos pós-teste de múltiplas comparações de Tukey ou Dunn, respectivamente. Análises onde um ou mais dos grupos não atingia o valor mínimo de amostras ($n < 5$) para o teste de distribuição de valores foram realizadas pelos testes não-paramétricos previamente citados. Todas as análises de correlação utilizaram teste não-paramétrico de Spearman. Para análises onde houve ajuste de p para múltiplas comparações foi adotado o teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A construção dos gráficos e análises estatísticas foram realizadas nos programas R versão 3.6 em ambiente de desenvolvimento integrado RStudio versão 1.2.1335 (R) ou GraphPad Prism versão 8.0.1 (Prism).

3.9.2 ANÁLISES DE SOBREVIDA

Para a estimativa da sobrevida univariada, foi gerada uma curva de sobrevida de Kaplan-Meier e a significância estatística entre os dois grupos foi calculada pelo teste de log-rank no programa Prism. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.9.3 MATRIZES DE CONFUSÃO, CURVA ROC (CARACTERÍSTICA DE OPERAÇÃO DO RECEPTOR) E DETERMINAÇÃO DE VALORES DE DISCRIMINAÇÃO

A matriz de confusão foi utilizada para obter os valores discriminatórios de sensibilidade, especificidade e acurácia. Uma curva ROC foi utilizada para representar

graficamente os resultados de discriminação. Foi utilizado o software Prism para montagem das curvas ROC.

3.9.4 CÁLCULO DO VALOR DE CORTE DA CURVA ROC

Para cálculo do valor de corte da curva ROC, utilizamos a sensibilidade e especificidade numa fórmula baseada no triângulo retângulo:

$$c^2 = a^2 + b^2$$

Em cada ponto da curva, os catetos a e b correspondem aos valores de 100 menos sensibilidade e especificidade, respectivamente, e o valor da hipotenusa em c aponta a distância necessária para se chegar a 100% de sensibilidade e especificidade (ou 100% de acurácia) (Figura 3.5). Desta forma, o ponto de corte escolhido foi aquele que apresentava o menor valor de c .

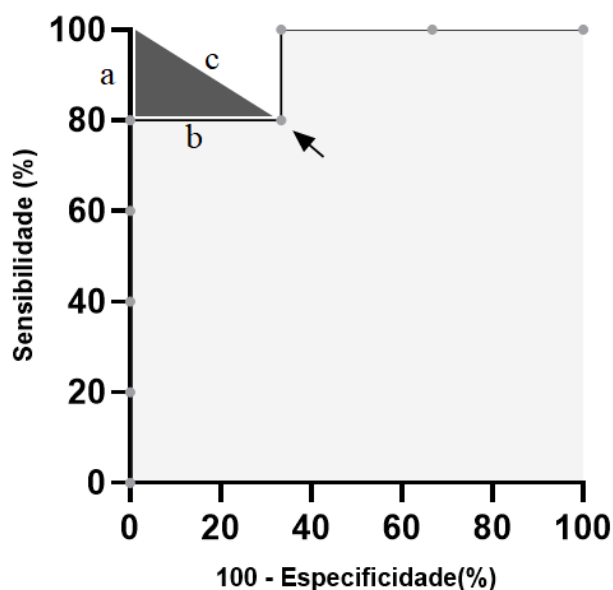


Figura 3.5 - Representação gráfica da curva ROC e como seria aplicada a fórmula do triângulo retângulo para estabelecimento do melhor ponto de corte. Para cada ponto de corte possível (pontos em cinza), é calculado o valor de c com base em a (100 – sensibilidade) e b (100 – especificidade). A seta indica o ponto que estaria sendo interrogado no momento e responsável pela conformação do triângulo retângulo. O menor valor de c indicaria o ponto mais próximo de 100% de sensibilidade e especificidade (ou 100% de acurácia).

3.9.5 OBTENDO A ACURÁCIA NAS AMOSTRAS DO MICROARRANJO DE METILAÇÃO

O cálculo da acurácia a partir dos resultados do microarranjo de metilação foi realizado no R, com pacote Epi v2.35, função *ROC()*. Todas as sondas do microarranjo de metilação comuns a todos os sítios de CEE, CEL e CECO (48 de 49 sondas) no gene *FBXL7* foram testadas.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DE METILAÇÃO DE *FBXL7* COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO NO CEE E CECF

4.1.1 POTENCIAL BIOMARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO NO CEE

Conforme mencionado anteriormente, dados prévios do grupo mostraram que uma única sonda localizada no corpo do gene *FBXL7* era capaz de distinguir o tecido tumoral do tecido adjacente não tumoral de pacientes com CEE com 100% de acurácia (dados não mostrados). Porém, essa análise preliminar foi realizada com sete amostras de cada grupo e o primeiro passo do presente estudo foi estender a análise para um número maior de amostras. Com a inclusão de mais nove amostras adjacentes e 17 amostras tumorais de CEE (totalizando 16 e 24 amostras de cada tipo, respectivamente) na análise por microarranjo de metilação, observamos um padrão de hipometilação no corpo de *FBXL7* em amostras tumorais (**Figura 4.1**). Por meio de análise de clusterização não supervisionada, o perfil de metilação consegue separar os tecidos adjacentes não tumorais e os tecidos tumorais (**Figura 4.1**).

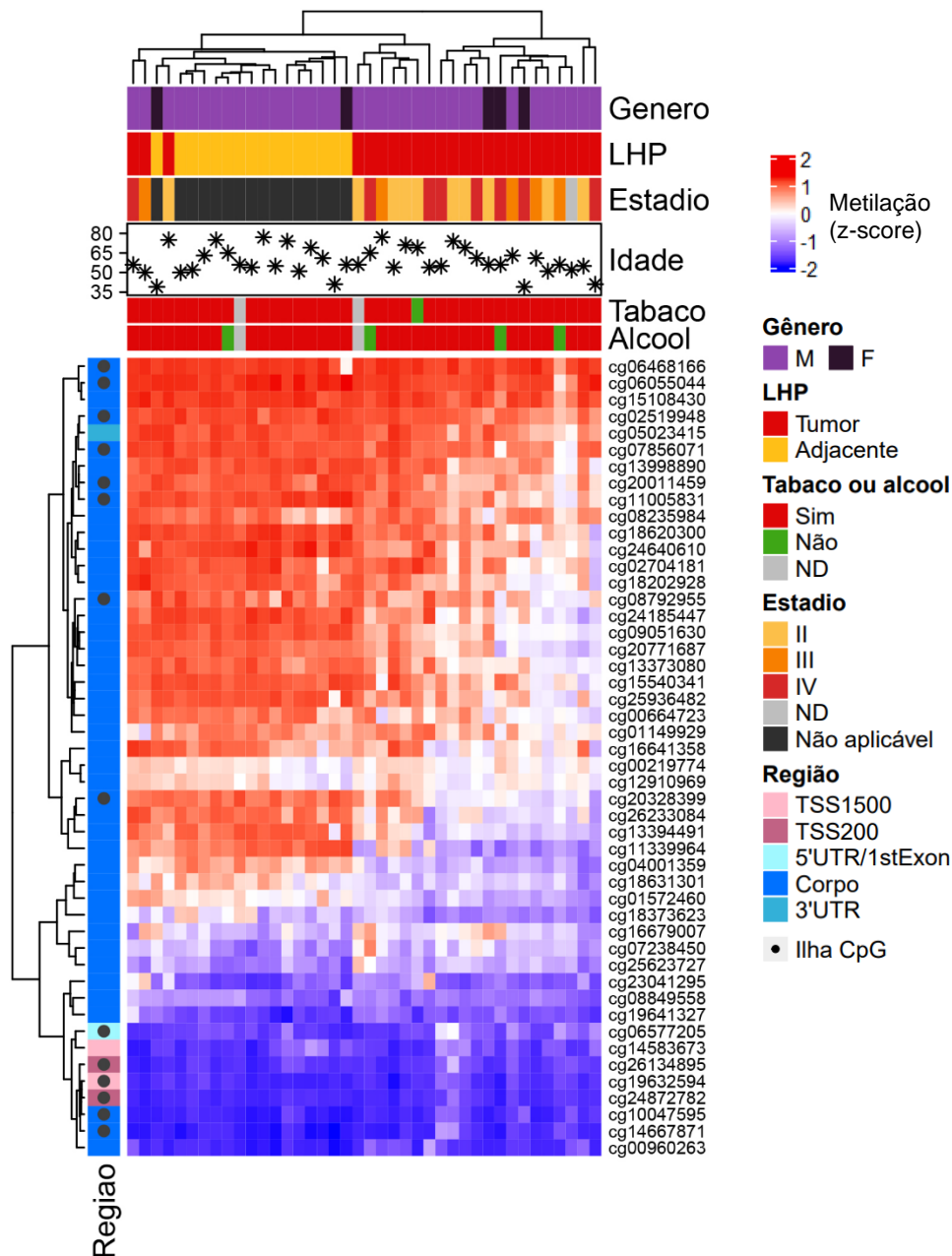


Figura 4.1 - Heatmap e dendrogramas do perfil de metilação de *FBXL7* em CEE e tecidos adjacentes não tumorais. No topo, a imagem exibe dados sociodemográficos (Sexo, idade em anos e consumo de álcool ou tabaco) e clínicos (estadiamento e laudo histopatológico) e agrupa amostras pelo perfil de metilação de *FBXL7*. Na lateral esquerda, o gráfico ilustra as regiões genômicas ocupadas pelas sondas em relação ao gene *FBXL7* e agrupa as sondas pelo perfil de metilação das mesmas. LHP: Laudo histopatológico. ND: Não disponível. M: Masculino, F: Feminino. TSS: Sítio de início da transcrição. UTR: Região não traduzida. 1stExon: Primeiro Éxon. Tumor: n = 24; Adjacente: n = 16.

Em seguida, nos perguntamos qual seria o potencial do perfil de metilação de *FBXL7* como biomarcador de transformação desse epitélio escamoso em carcinoma epidermoide. Iniciamos uma análise de discriminação entre o tecido adjacente não tumoral e o CEE para cada uma das 48 sondas do microarranjo de metilação localizadas no gene *FBXL7* a fim de obter um valor de corte e seus respectivos valores de sensibilidade, especificidade e acurácia (**Tabela 4.1**). Adotando como ponto de corte o valor de beta de metilação de $< 0,8036$, a sonda cg11339964 (previamente identificada pelo grupo) apresentou sensibilidade de 96%, especificidade de 94% e acurácia 98%, sendo este último o maior nível dentre as demais sondas. Assim, esta sonda foi selecionada para as análises subsequentes.

Tabela 4.1 - Lista das dez sondas localizadas no corpo do gene *FBXL7* com maior acurácia para distinguir o carcinoma epidermoide de esôfago e o tecido adjacente não tumoral. O rank das sondas está ordenado pelo valor de acurácia (AUC).

| Rank (↓AUC) | Sonda | Melhor Corte (valor de beta) | Sensibilidade | Especificidade | Acurácia (AUC) |
|-------------|------------|------------------------------|---------------|----------------|----------------|
| 1 | cg11339964 | $< 0,8036$ | 0,9583 | 0,9375 | 0,9818 |
| 2 | cg04001359 | $< 0,6364$ | 0,9167 | 1,0000 | 0,9661 |
| 3 | cg24640610 | $< 0,9092$ | 0,9167 | 0,9375 | 0,9479 |
| 4 | cg13394491 | $< 0,7985$ | 0,9167 | 0,9375 | 0,9453 |
| 5 | cg09051630 | $< 0,8840$ | 0,8333 | 1,0000 | 0,9453 |
| 6 | cg24185447 | $< 0,8803$ | 0,8333 | 1,0000 | 0,9297 |
| 7 | cg25936482 | $< 0,8794$ | 0,9167 | 0,9375 | 0,9219 |
| 8 | cg11005831 | $< 0,9062$ | 0,8333 | 0,9375 | 0,9193 |
| 9 | cg18631301 | $< 0,5662$ | 0,9167 | 0,8125 | 0,9115 |
| 10 | cg20328399 | $< 0,7972$ | 0,7500 | 1,0000 | 0,8932 |
| ... | | | | | |

N total= 40; Tumor =24, adjacente:16

A sonda cg11339964 está localizada no corpo de *FBXL7*, no segundo intron. Em nossas análises, a sonda foi encontrada hipometilada no CEE em relação à mucosa adjacente não tumoral, com mediana de valor de beta de 0,359 e 0,879, respectivamente ($p < 0,0001$) (**Figura 4.2**).

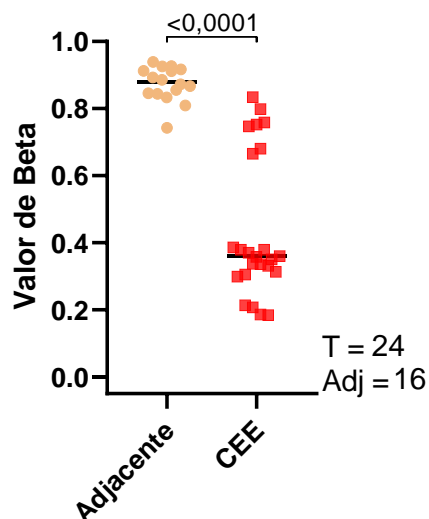


Figura 4.2 – Perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de esôfago determinado por microarranjo de metilação. Gráfico de pontos mostrando os valores de beta de metilação da sonda cg11339964, localizada no corpo do gene *FBXL7*, em carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) e tecido adjacente não tumoral (Adjacente). Teste de Mann-Whitney. T: tumor; Adj: tecido adjacente não tumoral.

Utilizando um subgrupo das amostras incluídas na análise por microarranjo de metilação, validamos esse perfil de hipometilação no CEE por pirosequenciamento, com mediana de metilação no tecido adjacente de 95,7% e no tumoral de 28,8% ($p=0,0003$) (**Figura 4.3A**). A correlação entre os achados do microarranjo de metilação e do pirosequenciamento foi direta e significativa ($\rho = 0,95$, $p<0,0001$) (**Figura 4.3B**). A partir dos valores de metilação obtidos por pirosequenciamento, estabelecemos um set de treino e recalculamos um novo corte de metilação (aplicado à técnica de pirosequenciamento), definindo que valores $< 71,95\%$ indicariam um epitélio transformado em CEE. O novo corte apresentou 100% de sensibilidade, 87% de especificidade e 92% de acurácia (**Figura 4.3C**).

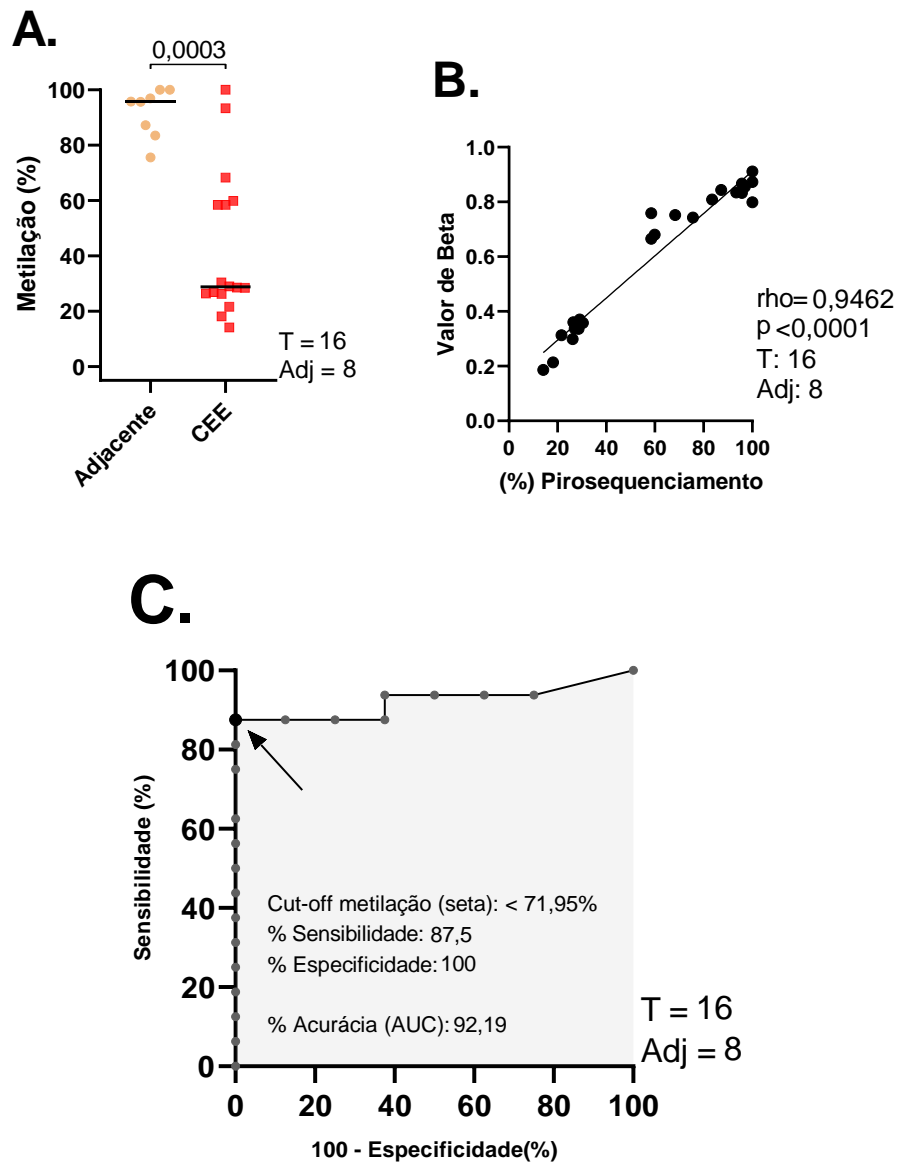


Figura 4.3 - Avaliação do perfil de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* determinado por pirosequenciamento em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) e tecido adjacente não tumoral (Adjacente) determinados por pirosequenciamento. Teste de Mann-Whitney. B. Correlação entre os níveis de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* estabelecidos por pirosequenciamento e os valores de beta de metilação estabelecidos por microarranjo de metilação em pacientes com CEE. Teste de Spearman. C. Curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) para estabelecimento de novo corte de valor de metilação (estabelecido por pirosequenciamento) para distinção do tecido tumoral e adjacente não tumoral em pacientes com CEE. T: tumor; Adj: tecido adjacente não tumoral.

A fim de reforçar os resultados de hipometilação de *FBXL7* em CEE e sua capacidade de diferenciar o tecido adjacente e o tecido tumoral, aumentamos o número de amostras avaliadas por pirosequenciamento. Neste set de validação, novamente *FBXL7* foi encontrado hipometilado em CEE, com uma mediana de 95,6% no tecido adjacente e 48,2% no tecido tumoral ($p < 0,0001$) (**Figura 4.4A**). Aplicando o ponto de corte de metilação definido no set de treino, obtivemos 73% de sensibilidade, 94% de especificidade e 85% de acurácia (**Figura 4.4B**).

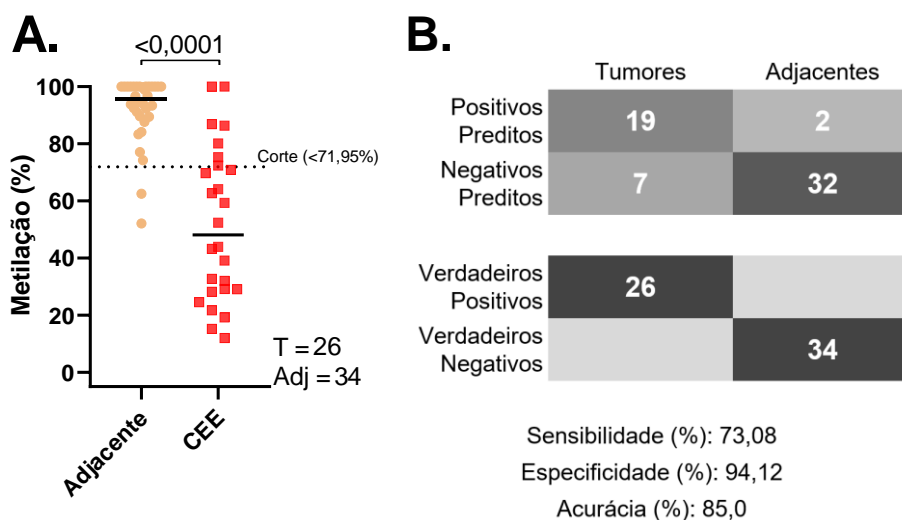


Figura 4.4 – Perfil de metilação de *FBXL7* determinado por pirosequenciamento no set de validação de carcinoma epidermoide de esôfago. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de esôfago (CEE) e tecido adjacente não tumoral (Adjacente) determinados por pirosequenciamento. Teste de Mann-Whitney. B. Matriz de confusão apresentando o poder de discriminação no set de validação a partir do corte estabelecido no set de treino (**Figura 4.3C**). T: tumor; Adj: tecido adjacente não tumoral.

Uma vez que de forma intertumoral a hipometilação do corpo de *FBXL7* se mostrou homogênea, avaliamos a heterogeneidade intratumoral desta alteração molecular. A partir de múltiplas biópsias do tecido adjacente e do tecido tumoral coletadas em cinco pacientes com CEE, constatamos haver um padrão de hipometilação na maior parte das biópsias tumorais em comparação aos tecidos adjacente pareados (**Figura 4.5**).

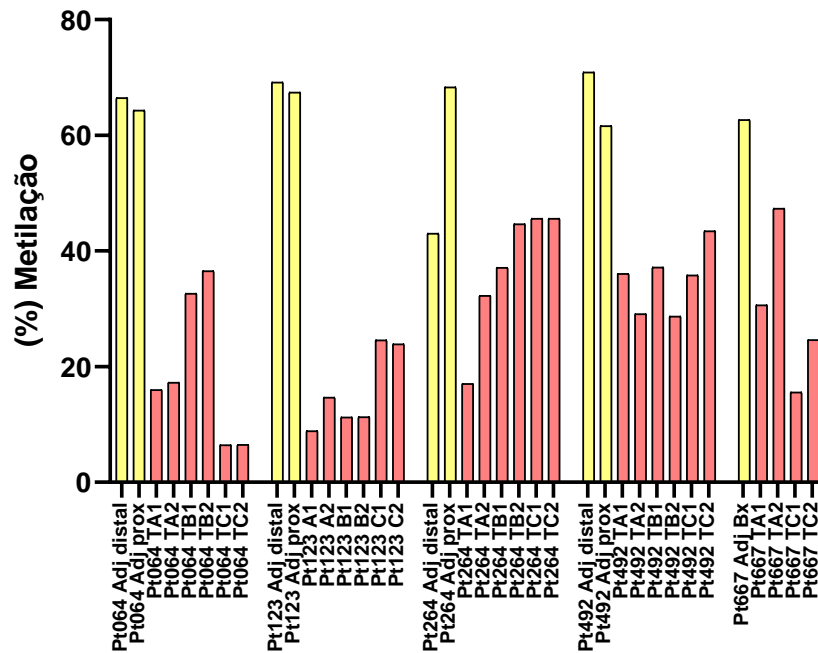


Figura 4.5 – Perfil de heterogeneidade intratumoral dos níveis de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de esôfago. Gráfico de barras mostrando os valores de metilação de *FBXL7* determinados por pirosequenciamento em múltiplas biópsias de tecido adjacente e tumoral coletadas a partir de cinco pacientes com CEE. Barras amarelas: Tecido adjacente não tumoral; Barras vermelhas: Tumor.

O perfil de metilação de *FBXL7* no CEE não foi associado com os dados sociodemográficos (sexo, idade, tabagismo e etilismo) ou clínicos (estadiamento e diferenciação) dos pacientes com CEE (**Tabela 4.2**), com exceção da sobrevida. Pacientes com hipometilação de *FBXL7* apresentaram pior sobrevida global com mediana de 6,4 meses, enquanto pacientes com hipermetilação apresentaram 15,8 meses de sobrevida ($p=0,344$) (**Figura 4.6**).

Tabela 4.2 - Associações entre o perfil de metilação de *FBXL7* e dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % metilação Mediana (Min-Max) | p |
|--|----|---------|----------------------------------|--------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 30 | 39 | 30,59 (11,99 - 100,0) | 0,3451 |
| Feminino | 9 | | 52,42 (14,13 - 100,0) | |
| Idade (Mediana = 59) | | | | |
| < 59 | 18 | 39 | 37,60 (14,13 - 100,0) | 0,6308 |
| ≥ 59 | 21 | | 32,71 (11,99 - 100,0) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 33 | 35 | 39,14 (14,13 - 100,0) | 0,1210 |
| Nunca | 2 | | 20,22 (11,99 - 28,45) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 31 | 34 | 43,91 (11,99 - 100,0) | 0,1038 |
| Nunca | 3 | | 26,41 (14,13 - 29,03) | |
| Estadiamento | | | | |
| II | 8 | 33 | 59,17 (24,57 - 86,90) | 0,6118 |
| III-IV | 25 | | 32,00 (14,13 - 100,0) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 7 | 34 | 59,36 (15,25 - 100,0) | 0,1488 |
| Moderado | 26 | | 29,79 (14,13 - 100,0) | |
| Indiferenciado | 1 | | 100,0 | |

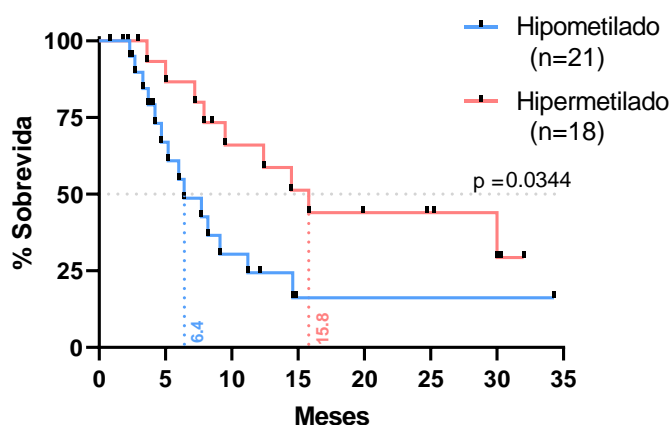


Figura 4.6 – Sobrevida de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago de acordo com o perfil de metilação de *FBXL7* na posição cg11339964. O corte de metilação foi o quantil de 55% da população com os maiores níveis de metilação contra o restante. Teste de Log-rank (Mantel-Cox). Hipometilado: < 41,165%; Hipermetilado ≥ 41,165.

4.1.2 POTENCIAL BIOMARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO NOS CECP

Devido às semelhanças quanto ao subtipo histológico e aos fatores de risco associados, avaliamos o perfil de metilação de *FBXL7* na posição genômica de cg11339964 também em CECP.

4.1.2.1 CEL

Em CEL, *FBXL7* estava hipometilado em relação à mucosa adjacente não tumoral. No tumor, sua mediana foi de 21,13%, e no tecido adjacente sua mediana foi de 59,21% ($p < 0,0001$) (**Figura 4.7A**). Aplicamos o mesmo ponto de corte estabelecido em CEE nas amostras de CEL e obtivemos sensibilidade de 97,62%, especificidade de 12,82% e acurácia de 56,79% (**Figura 4.7B**). Devido à baixa especificidade, buscamos para o CEL um novo ponto de corte particular, resultando no valor de corte de metilação $< 39,53\%$ com sensibilidade de 83,33%, especificidade de 87,18 e acurácia de 85,19% (**Figura 4.7C**).

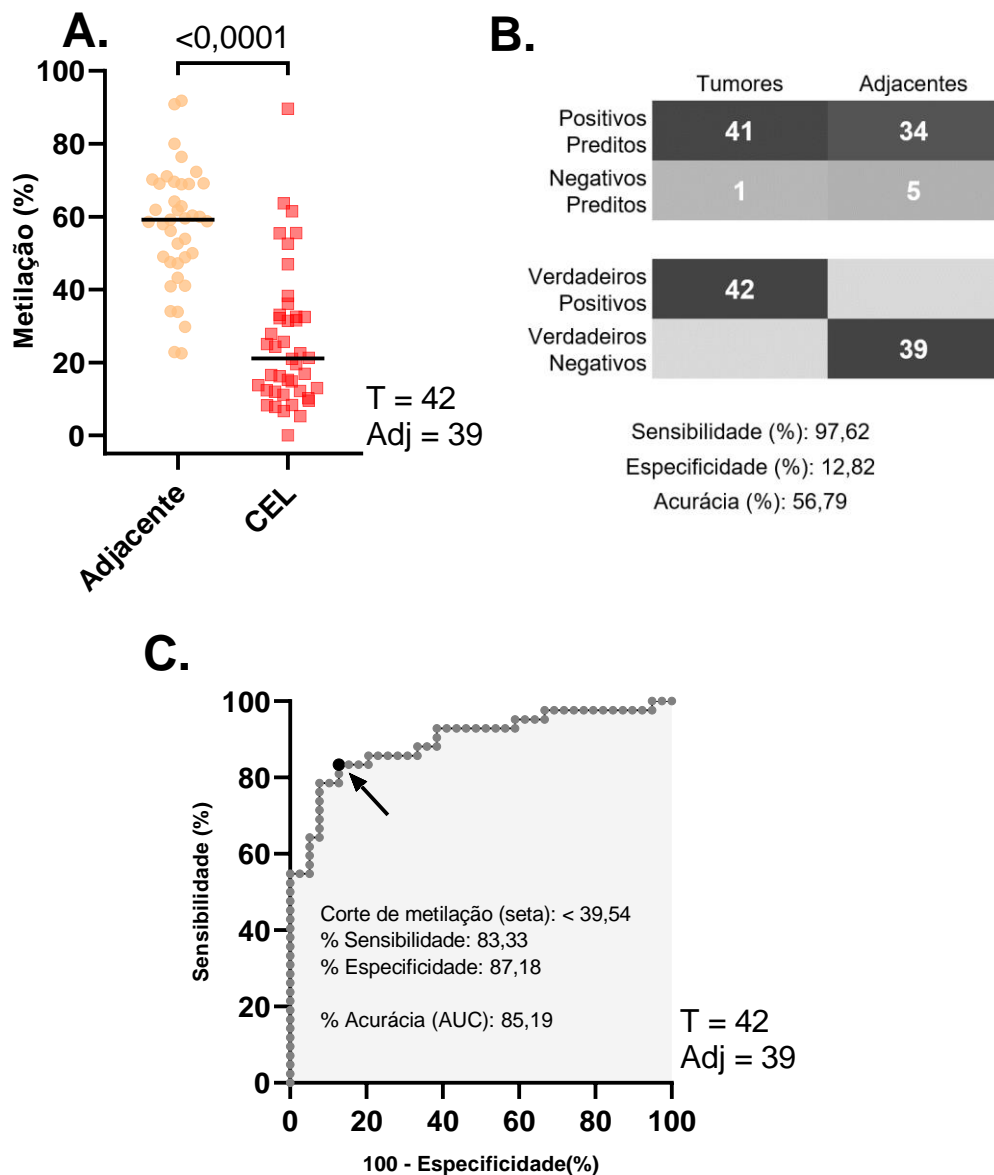


Figura 4.7 – Perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de laringe. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação da sonda cg11339964 em carcinoma epidermoide de laringe (CEL) e tecido adjacente não tumoral (Adjacente), determinados pela técnica de pirosequenciamento. Teste de Mann-Whitney. B. Matriz de confusão para definição de amostras tumorais e adjacentes não tumorais de pacientes com CEL utilizando o valor de metilação avaliado por pirosequenciamento estabelecido como ponto de corte para CEE (< 71,95%). C. Curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) para estabelecimento de novo corte de valor de metilação (estabelecido por pirosequenciamento) para distinção do tecido tumoral e adjacente não tumoral em pacientes com CEL. T: tumor; Adj: tecido adjacente não tumoral.

Dentre as características sociodemográficas e clínicas, o perfil de metilação de *FBXL7* foi associado com o grau de diferenciação (Tabela 4.3, $p = 0,0005$). Pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, *FBXL7* apresenta uma hipermetilação nos tumores pouco diferenciados (mediana de metilação 58,5%) em relação aos bem diferenciados (mediana de 8,2%, $p=0,004$) e moderadamente (mediana de 16,7%, $p=0,0011$) diferenciados. Não houve associação entre a mediana de metilação de *FBXL7* no CEL e a sobrevida dos pacientes ($p = 0,2535$).

Tabela 4.3 - Avaliação das associações entre dados sociodemográficos ou clínicos dos pacientes com carcinoma epidermoide de laringe e o perfil de metilação de *FBXL7* avaliado por pirosequenciamento.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % metilação Mediana (Min-Max) | p |
|--|----|---------|----------------------------------|---------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 37 | 42 | 21,26 (0 - 89,64) | 0,8362 |
| Feminino | 5 | | 15,29 (5,260 - 55,40) | |
| Idade (Mediana = 63,5) | | | | |
| < 63,5 | 21 | 42 | 21,26 (0 - 63,60) | 0,8756 |
| ≥ 63,5 | 21 | | 21,00 (6,720 - 89,64) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 33 | 40 | 16,91 (0 - 63,60) | 0,2926 |
| Nunca | 7 | | 25,08 (7,790 - 89,64) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 27 | 40 | 19,51 (0 - 63,60) | 0,7110 |
| Nunca | 13 | | 22,48 (5,260 - 89,64) | |
| Estadiamento | | | | |
| II | 3 | 42 | 19,51 (8,360 - 31,49) | 0,6775 |
| III-IV | 39 | | 21,26 (0,000 - 89,64) | |
| Diferenciação | | | | |
| Bem | 3 | 41 | 8,270 (7,790 - 22,48) | 0,0005 |
| Moderado | 32 | | 16,74 (0 - 55,40) | |
| Pouco | 6 | | 58,50 (38,23 - 89,64) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | | Mediana em Meses | |
| < Mediana | 18 | 37 | 46,8 | 0,2535 |
| ≥ Mediana | 19 | | 31,4 | |

4.1.2.2 CECO

Em CECO, *FBXL7* apresentou uma hipometilação em relação ao tecido adjacente não tumoral com mediana de 19,62% no tumor e mediana de 61,09% na mucosa adjacente ($p = 0,0004$) (**Figura 4.8A**). Testamos o mesmo ponto de corte estabelecido para CEE nas amostras de CECO e obtivemos sensibilidade de 100%, especificidade de 42,86% e acurácia de 77,78% (**Figura 4.8B**). Buscamos para o CECO um novo ponto de corte, resultando no valor de corte de metilação $< 41,19\%$ com sensibilidade de 90,91%, especificidade de 100% e acurácia de 96,1% (**Figura 4.8C**).

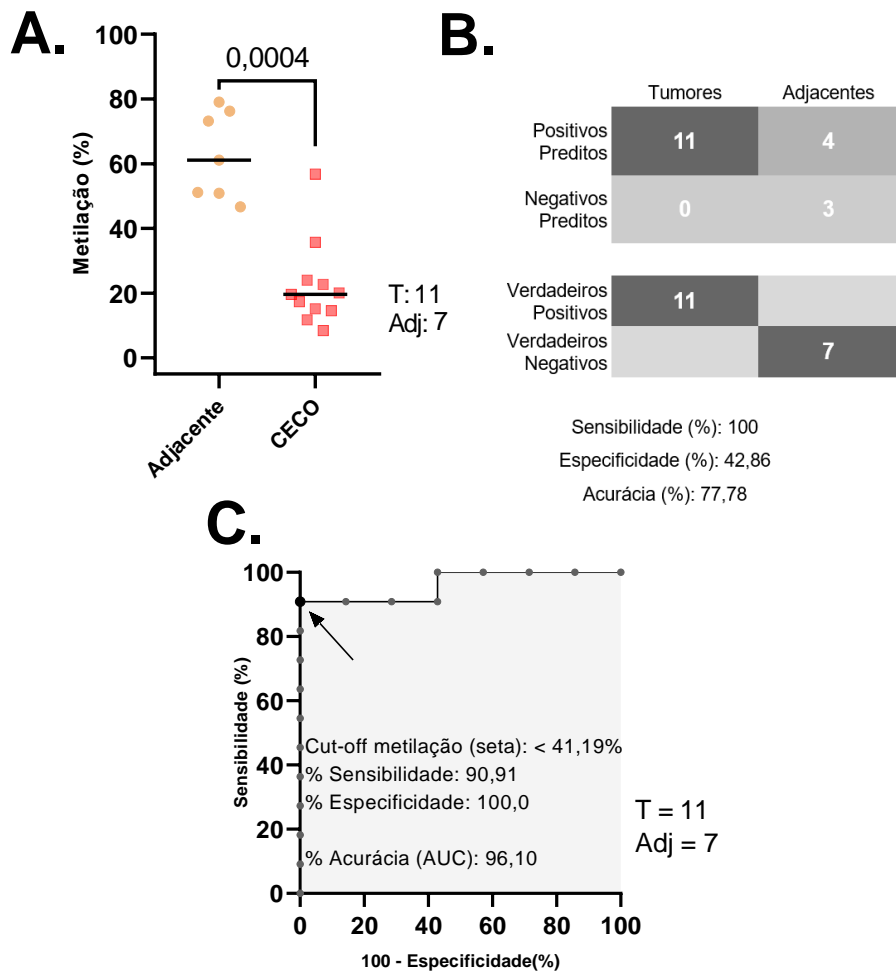


Figura 4.8 – Perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de cavidade oral. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação da sonda cg11339964 em carcinoma epidermoide de cavidade oral (CECO) e tecido adjacente não tumoral (Adjacente), determinados pela técnica de pirosequenciamento. Teste de Mann-Whitney. B. Matriz de confusão para definição de amostras tumorais e adjacentes não tumorais de pacientes com CECO utilizando o valor de metilação avaliado por pirosequenciamento estabelecido como ponto de corte para CEE (< 71,95%). C. Curva ROC (do inglês *Receiver Operating Characteristic*) para estabelecimento de novo corte de valor de metilação (estabelecido por pirosequenciamento) para distinção do tecido tumoral e adjacente não tumoral em pacientes com CECO. T: tumor; Adj: tecido adjacente não tumoral.

Pelo baixo número amostral do CECO, não realizamos as análises de associação com os dados clínico-patológicos.

4.2 *FBXL7* COMO MARCADOR DE TRANSFORMAÇÃO DO EPITÉLIO LIGADO À EXPOSIÇÃO AOS FATORES DE RISCO

Buscando entender as causas da hipometilação de *FBXL7* nos tumores epidermóides do trato aerodigestivo superior, realizamos uma série de análises com tumores epidermóides de outros sítios anatômicos e com tumores de outras histopatologias, mas associados ao álcool e tabaco. Assim, esperamos responder se essa alteração é causada pela transformação do epitélio em carcinoma epidermoide ou pela exposição aos fatores de risco. Utilizando dados de microarranjo de metilação depositados na plataforma Gene Expression Omnibus (GEO), verificamos o perfil de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7*. Os tumores selecionados foram: adenocarcinoma de esôfago (ADE), adenocarcinoma de pulmão, carcinoma epidermoide de pulmão, carcinoma epidermoide cervical e carcinoma epidermoide de orofaringe (CEOF).

4.2.1 METILAÇÃO DE *FBXL7* EM ADE

Os dados depositados de ADE (GEO: GSE72874) nos permitiram avaliar não só o perfil de metilação de *FBXL7* em tumores, mas também em tecido não transformado de indivíduos expostos aos fatores de risco associados ao tumor, como doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), e lesões precursoras (metaplasia do esôfago de Barrett) (**Figura 4.9**). Em relação ao epitélio não tumoral (mediana de valor de beta = 0,8253), o perfil de metilação de *FBXL7* não se altera pela DRGE (mediana de valor de beta = 0,8360, $p > 0,05$), mas uma hipometilação é observada no esôfago de Barrett (mediana de valor de beta = 0,6044, $p = 0,0055$). No ADE (mediana de valor de beta = 0,3596), *FBXL7* está hipometilado em relação ao tecido não tumoral ($p < 0,0001$), indivíduos com DRGE ($p < 0,0001$) e indivíduos com esôfago de Barrett ($p = 0,0319$).

Quando estratificamos os tumores de acordo com a exposição ao álcool e ao tabaco, não foram observadas diferenças significativas de metilação entre indivíduos não tabagistas e tabagistas (medianas de valores de beta de 0,3777 e 0,3499, respectivamente, e $p = 0,6830$) ou não etilistas e etilistas (medianas de valores de beta de 0,3564 e 0,3596, respectivamente, e $p = 0,8826$) (**Figura 4.9A-C**).

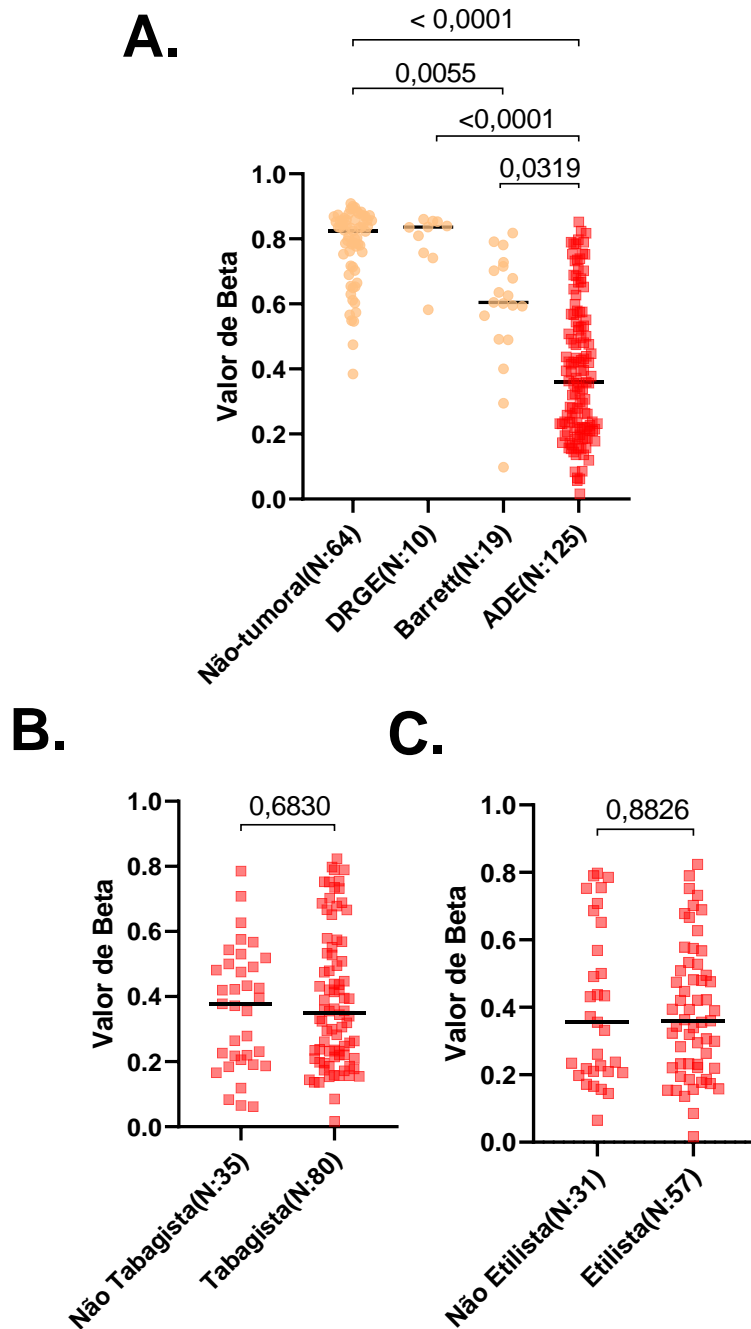


Figura 4.9 - Perfil de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* em adenocarcinoma de esôfago. A. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em tecidos não tumorais (inclui adjacente não tumoral e indivíduos sem evidência de doenças), indivíduos com doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), esôfago de Barrett e tecido tumoral (ADE). Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de múltiplas comparações de Dunn. B. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em ADE de acordo com a exposição ao tabaco. Teste de Mann-Whitney. C. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em ADE de acordo com o consumo de álcool. Teste de Mann-Whitney.

4.2.2 METILAÇÃO DE *FBXL7* EM ADENOCARCINOMAS E CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE PULMÃO

Em adenocarcinoma de pulmão (GEO: GSE56044), *FBXL7* está hipometilado, com mediana de valor de beta de 0,5045 no tecido adjacente não tumoral e 0,3730 no tecido tumoral ($p = 0,0494$). A metilação apresenta associação com o hábito tabagista, com uma hipometilação do gene nos pacientes tabagistas em relação a não tabagistas (medianas de valores de beta de 0,3325 e 0,50, respectivamente, com $p = 0,0003$) (**Figura 4.10A-B**). Em carcinoma epidermoide de pulmão (GEO: GSE68825), *FBXL7* também está hipometilado com mediana de valor de beta de 0,28, enquanto no tecido adjacente não tumoral este valor é de 0,5210 ($p < 0,0001$). Contudo, seu perfil de metilação não tem associação com o hábito tabagista ($p = 0,4393$) (**Figura 4.10C-D**).

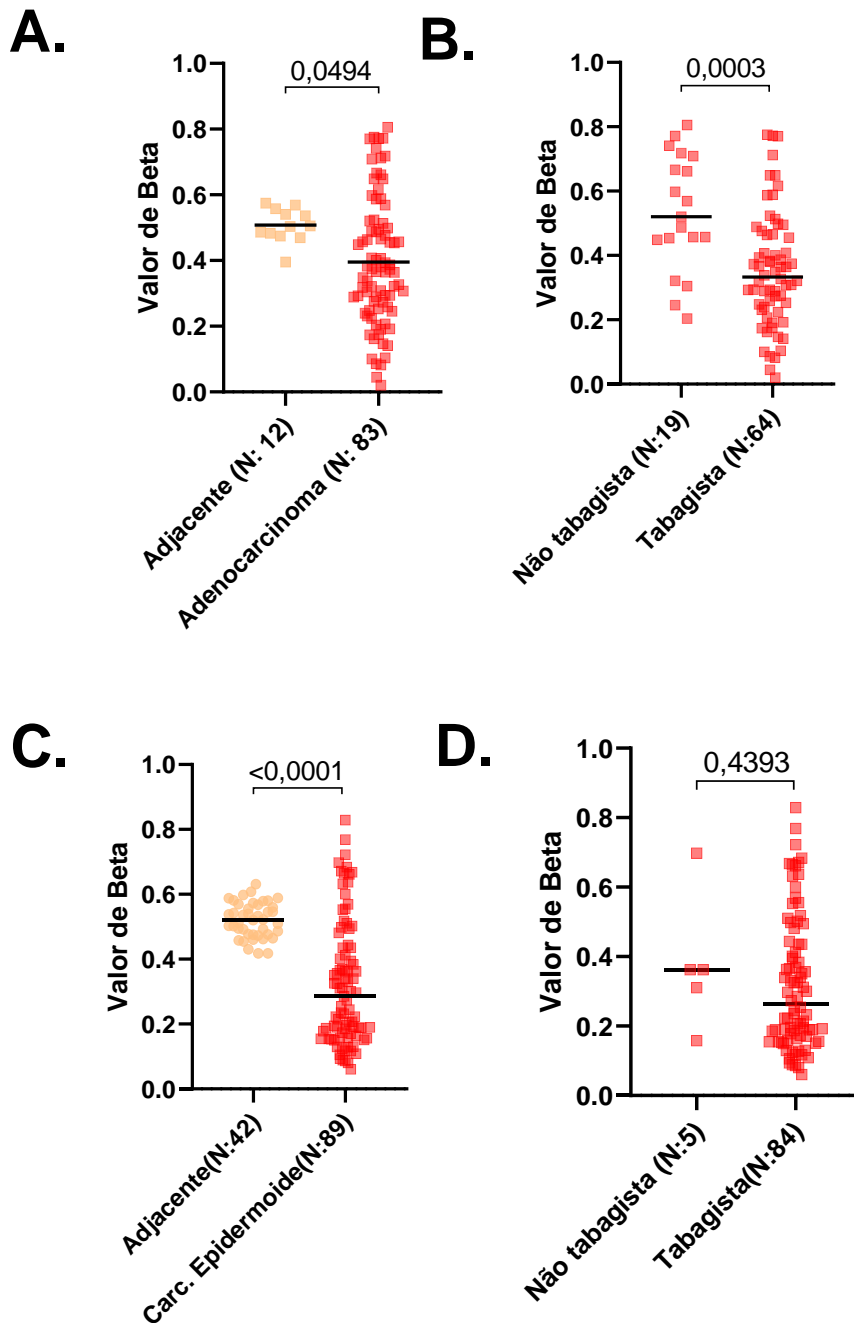


Figura 4.10 - Perfil de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* em tumores de pulmão, de acordo com a exposição ao tabaco. A. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em adenocarcinoma de pulmão e no tecido adjacente não tumoral. Teste de t de Student não pareado. B. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em adenocarcinoma de pulmão de acordo com o hábito tabagista. Teste de t de Student não pareado. C. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de pulmão e no tecido adjacente não tumoral. Teste de Mann-Whitney. D. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de pulmão de acordo com o hábito tabagista. Teste de Mann-Whitney.

4.2.3 METILAÇÃO DE *FBXL7* EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE CERVICAL

Para esta análise, utilizamos os dados depositados de dois trabalhos distintos, que apresentam além do tecido tumoral, tecidos não-tumorais (um trabalho apenas HPV+ e o outro apenas HPV-) e displasias de alto grau (CIN3) (GEO: GSE99511 e GSE46306).

Não foram encontradas diferenças de metilação entre tecidos adjacentes não tumorais, lesões CIN3 e tumores dos trabalhos GSE99511 e GSE46306 ($p > 0,05$ em ambos) (Figura 4.11A-B).

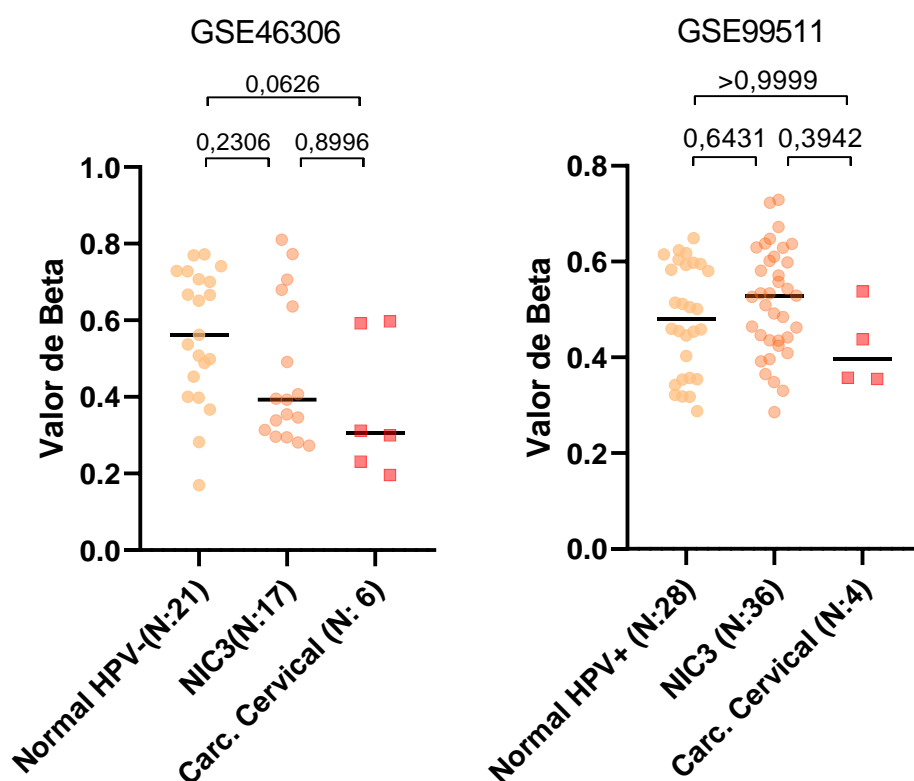


Figura 4.11 – Perfil de metilação da sonda cg11339964 de *FBXL7* na cérvix e carcinoma epidermoide cervical. A. GSE99511 incluiu amostras de colo de útero sem alterações histológicas infectadas pelo HPV, amostras de lesões precursoras (NIC3) e do tumor. B. GSE46306 incluiu amostras de colo de útero sem alterações histológicas não infectadas pelo HPV, amostras de lesões precursoras (NIC3) e do tumor. Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de múltiplas comparações de Dunn.

4.2.4 METILAÇÃO DE FBXL7 EM CEOF

Por fim, avaliamos o perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de orofaringe (CEOF). Este tumor afeta o trato aerodigestivo superior e pode ser dividido em dois grupos de fatores de risco: os CEOF-HPV positivos (+) e negativos (-), sendo o último associado à exposição ao álcool e tabaco. Entre pacientes do INCA, casos de CEOF-HPV+ apresentaram maiores níveis de metilação de *FBXL7* em relação aos CEOF-HPV- (medianas de metilação de 26,59 e 11,27, respectivamente, e $p < 0,0001$), não havendo diferença dentro do grupo CEOF-HPV- de acordo com a exposição ao álcool e/ou tabaco (**Figura 4.12A**). Buscamos validar esta diferença de metilação em um set de amostras externo, a partir de dados de microarranjo de metilação em pacientes CEOF-HPV+ e CEOF-HPV- depositados (GEO: GSE38271). Neste set, *FBXL7* está hipermetilado nos tumores CEOF-HPV+ em relação aos CEOF-HPV- (mediana de valor de beta de 0,5406 e 0,3187, respectivamente, com $p < 0,0001$) (**Figura 4.12B**).

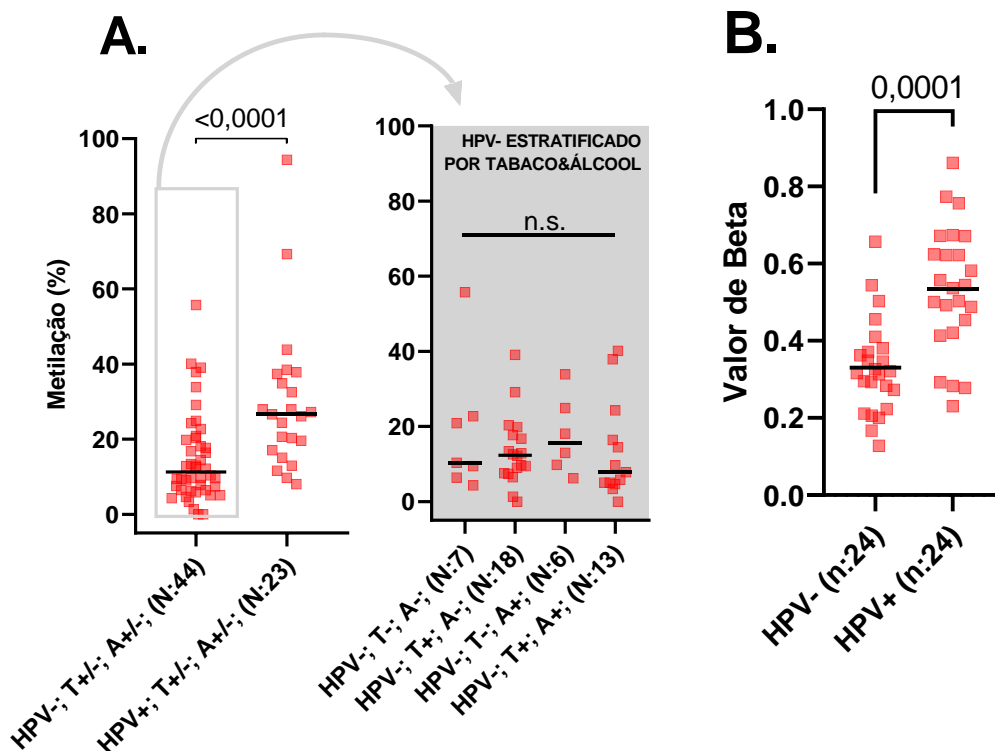


Figura 4.12 – Perfil de metilação de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de orofaringe de acordo com a presença da infecção por HPV. A. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7* analisado por pirosequenciamento em pacientes do INCA, de acordo com status de HPV. Teste de Mann-Whitney. No detalhe, o grupo HPV- foi estratificado de acordo com a exposição ao álcool e/ou tabaco. Teste de Kruskal-Wallis com pós teste de múltiplas comparações de Dunn. B. Gráfico de pontos mostrando o perfil de metilação de *FBXL7*, de acordo com status de HPV, analisado por microarranjo de metilação em pacientes do estudo GSE38271. Teste t de Student não pareado. HPV-: HPV negativo; HPV+: HPV positivo; T-: Não tabagista; T+: Tabagista; A-: Não etilista; A+: Etilista.

4.3 METILAÇÃO E REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE RNAm DE *FBXL7*

Após a análise do perfil de metilação de *FBXL7* em diferentes tumores, avaliamos se este poderia estar associado à expressão do gene em CEE e CEL.

Para isso, foram desenhados ensaios a fim de detectar a expressão das três isoformas do gene. O RNAm da segunda isoforma não foi detectado em nenhum dos tumores avaliados, assim como em sangue periférico de indivíduos sem as doenças,

nas linhagens celulares de glioblastoma (U251) ou Jurkat (linfócitos T), ou mesmo em um *pool* de amostras de tecidos adjacente não tumorais e de CEE. Esse resultado condiz com os dados depositados na plataforma GTEx (AGUET; BARBEIRA; BONAZZOLA; BROWN *et al.*, 2019) (**Suplementar 1**), apenas as isoformas principal e terceira são detectáveis na mucosa esofágica e na maioria dos tecidos avaliados.

4.3.1 CEE

Não houve diferença de expressão da isoforma principal (isoforma 1) entre o tecido adjacente não tumoral (mediana de unidades relativas de 2,52E-03) e o tumor (mediana de 3,24E-03) nos pacientes com CEE ($p = 0,4446$) (**Figura 4.13A**). Não observamos também correlação entre o perfil de metilação da sonda cg11339964 e os níveis de RNAm do gene ($\rho = 0,1795$, $p = 0,1777$, **Figura 4.13B**).

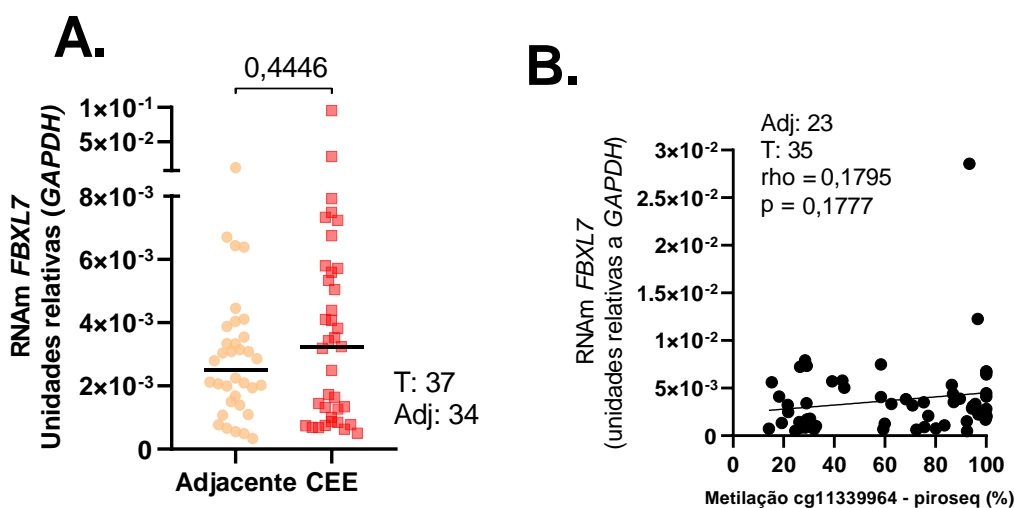


Figura 4.13 – Avaliação da expressão gênica da isoforma 1 de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de esôfago. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de RNAm da isoforma 1 de *FBXL7*, detectados por PCRq e normalizados com os níveis de *GAPDH*, no tecido adjacente não tumoral e em CEE. Teste de Mann-Whitney. B. Correlação entre os níveis de RNAm da isoforma 1 de *FBXL7* e seu perfil de metilação, determinado por pirosequenciamento. Teste de Spearman. Adj: tecido adjacente não tumoral; T: tumor.

Os níveis de expressão da isoforma principal no tumor não mostraram associação com as características sociodemográficas ou clínicas dos pacientes com CEE (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4 – Dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago do INCA e suas associações com os níveis de RNAm da isoforma principal (isoforma 1) de *FBXL7*.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | Unidades relativas (<i>GAPDH</i>) Mediana (Min-Max) | p |
|--|----|-------------------------|--|--------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 30 | 39 | 3,67E-03 (5,09E-04 - 2,86E-02) | 0,0742 |
| Feminino | 9 | | | |
| Idade (Mediana = 59) | | | | |
| < 59 | 19 | 39 | 3,24E-03 (5,09E-04 - 9,54E-02) | 0,3803 |
| ≥ 59 | 20 | | | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 34 | 35 | 3,22E-03 (5,09E-04 - 2,86E-02) | ND |
| Nunca | 1 | | | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 30 | 34 | 3,38E-03 (5,09E-04 - 2,86E-02) | 0,7769 |
| Nunca | 4 | | | |
| Diferenciação | | | | |
| Moderado | 30 | 36 | 0,00214 (0,000509 - 0,09539) | 0,2330 |
| Pouco | 6 | | | |
| Estadiamento | | | | |
| II | 8 | 34 | 2,55E-03 (5,09E-04 - 7,92E-03) | 0,6759 |
| III-IV | 26 | | | |
| Sobrevida | | | | |
| | | Mediana em Meses | | |
| < Mediana (3,24E-03) | 19 | 38 | 8,2 | 0,8795 |
| ≥ Mediana | 19 | | 9,5 | |

ND: Não disponível

Em seguida, avaliamos a expressão da terceira isoforma de *FBXL7*, porém não foram encontradas diferenças significativas entre o CEE e o tecido adjacente não tumoral ($p = 0,3$) (Figura 4.14A). Também não encontramos uma correlação significativa entre a metilação na posição cg11339964 e a expressão desta isoforma ($\rho = -0,1655$, $p = 0,5227$) (Figura 4.14B). Já a expressão da isoforma principal foi correlacionada significativamente com a expressão da terceira isoforma ($\rho = 0,5065$, $p = 0,0162$, FI) (Figura 4.14C).

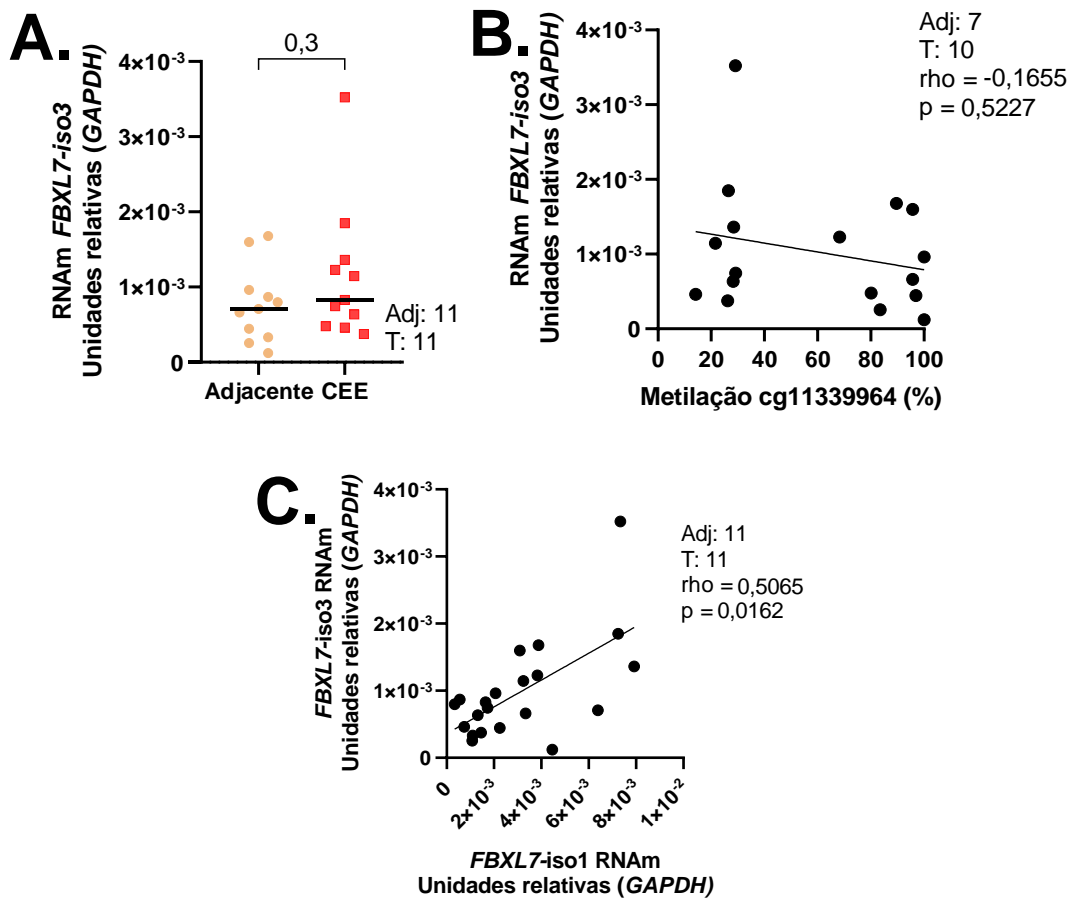


Figura 4.14 - Avaliação da expressão gênica da isoforma 3 de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de esôfago. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de expressão gênica da terceira isoforma de *FBXL7*, determinada por PCRq e normalizada com a expressão de *GAPDH*, em tecido adjacente não tumoral (Adjacente) e tecido tumoral (CEE) de pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago. Os traços ligam as amostras pareadas. Teste de Mann-Whitney. B. Correlação entre os níveis de expressão da terceira isoforma e a metilação de *FBXL7* em CEE. Teste de Spearman. C. Correlação entre os níveis de expressão da primeira isoforma e os níveis de expressão da terceira isoforma de *FBXL7* em CEE. Teste de Spearman. Adj: tecido adjacente não tumoral; T: tumor.

4.3.2 CEL

Não houve diferença significativa de expressão da isoforma principal (isoforma 1) entre o tecido adjacente não tumoral (mediana de $5,26E-03$) e o tumor (mediana de $3,62E-03$) de pacientes com CEL ($p = 0,3584$, **Figura 4.15A**). Também não observamos correlação significativa entre o perfil de metilação da sonda cg11339964 e os níveis de expressão da isoforma 1 em CEL ($\rho = -0,08489$, $p = 0,5417$, **Figura 4.15B**).

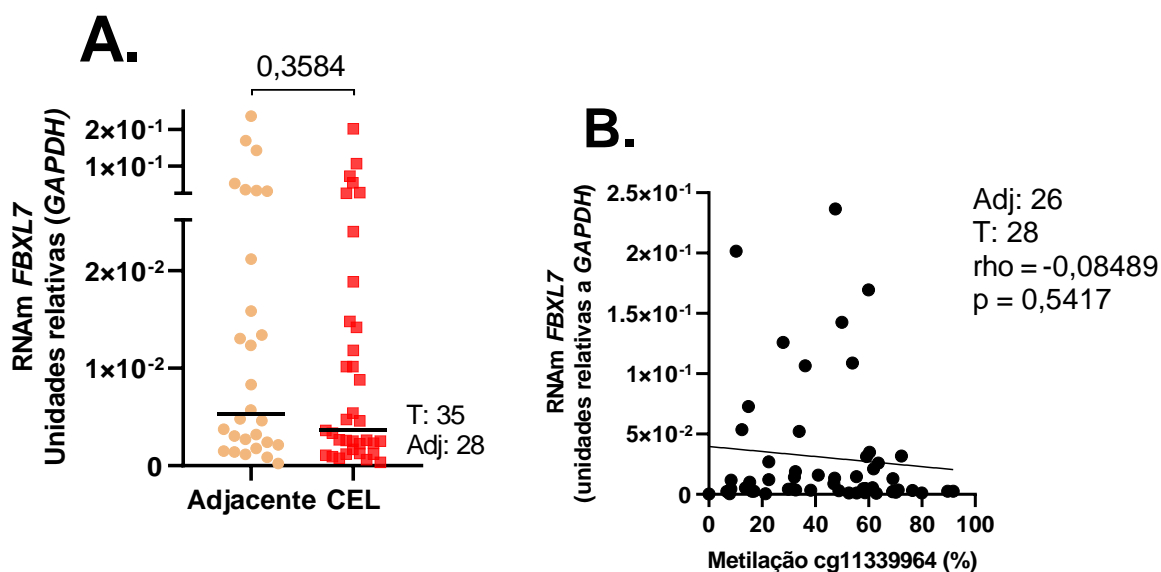


Figura 4.15 - Avaliação da expressão gênica da isoforma 1 de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de laringe. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de expressão gênica da terceira isoforma 1 de *FBXL7*, determinada por PCRq e normalizada com a expressão de *GAPDH*, em tecido adjacente não tumoral (Adjacente) e tecido tumoral (CEL) de pacientes com carcinoma epidermoide de laringe. Os traços ligam as amostras pareadas. Teste de Mann-Whitney. B. Correlação entre os níveis de expressão da isoforma 1 e a metilação de *FBXL7* em CEE. Teste de Spearman. Adj: tecido adjacente não tumoral; T: tumor.

Os níveis de RNAm da isoforma 1 de *FBXL7* não foram associados significativamente com características clínicas ou sociodemográficas dos pacientes com CEL (**Tabela 4.5**)

Tabela 4.5 - Níveis de RNAm de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de laringe e sua associação com características clínicas e sociodemográficas dos pacientes.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | Unidades relativas (<i>GAPDH</i>) Mediana (Min-Max) | p |
|--|----|---------|--|--------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 35 | 39 | 3,62E-03 (3,53E-04 - 2,02E-01) | 0,3606 |
| Feminino | 4 | | 1,25E-02 (2,52E-03 - 1,88E-02) | |
| Idade (Mediana = 65) | | | | |
| < 65 | 19 | 39 | 4,74E-03 (3,53E-04 - 7,28E-02) | 0,906 |
| ≥ 65 | 20 | | 2,61E-03 (9,18E-04 - 2,02E-01) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 30 | 38 | 5,08E-03 (3,53E-04 - 2,02E-01) | 0,4976 |
| Nunca | 8 | | 2,55E-03 (6,18E-04 - 1,07E-01) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 24 | 38 | 7,31E-03 (3,53E-04 - 2,02E-01) | 0,1984 |
| Nunca | 14 | | 2,56E-03 (6,18E-04 - 1,07E-01) | |
| Diferenciação | | | | |
| Bem | 5 | 39 | 4,58E-03 (6,18E-04 - 2,70E-02) | 0,86 |
| Moderado | 27 | | 4,74E-03 (3,53E-04 - 2,02E-01) | |
| Pouco | 7 | | 3,35E-03 (9,18E-04 - 2,59E-02) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 3 | 39 | 1,18E-02 (2,65E-03 - 2,40E-02) | 0,3987 |
| III-IV | 36 | | 4,10E-03 (3,53E-04 - 2,02E-01) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | | Mediana em Meses | |
| < Mediana (3,49E-03) | 17 | 34 | 38,10 | 0,3199 |
| ≥ Mediana | 17 | | 31,40 | |

Quanto à terceira isoforma, não encontramos diferença de expressão entre o CEL e o tecido adjacente não tumoral ($p = 0,0676$) (Figura 4.14A). Porém, uma correlação direta significativa entre a metilação na posição cg11339964 e a expressão da isoforma 3 foi observada ($\rho = 0,4727$, $p = 0,0111$) (Figura 4.14B). A expressão da terceira isoforma também apresentou correlação significativa com a expressão da isoforma principal em CEL ($\rho = 0,5065$, $p = 0,0162$, FI) (Figura 4.14C).

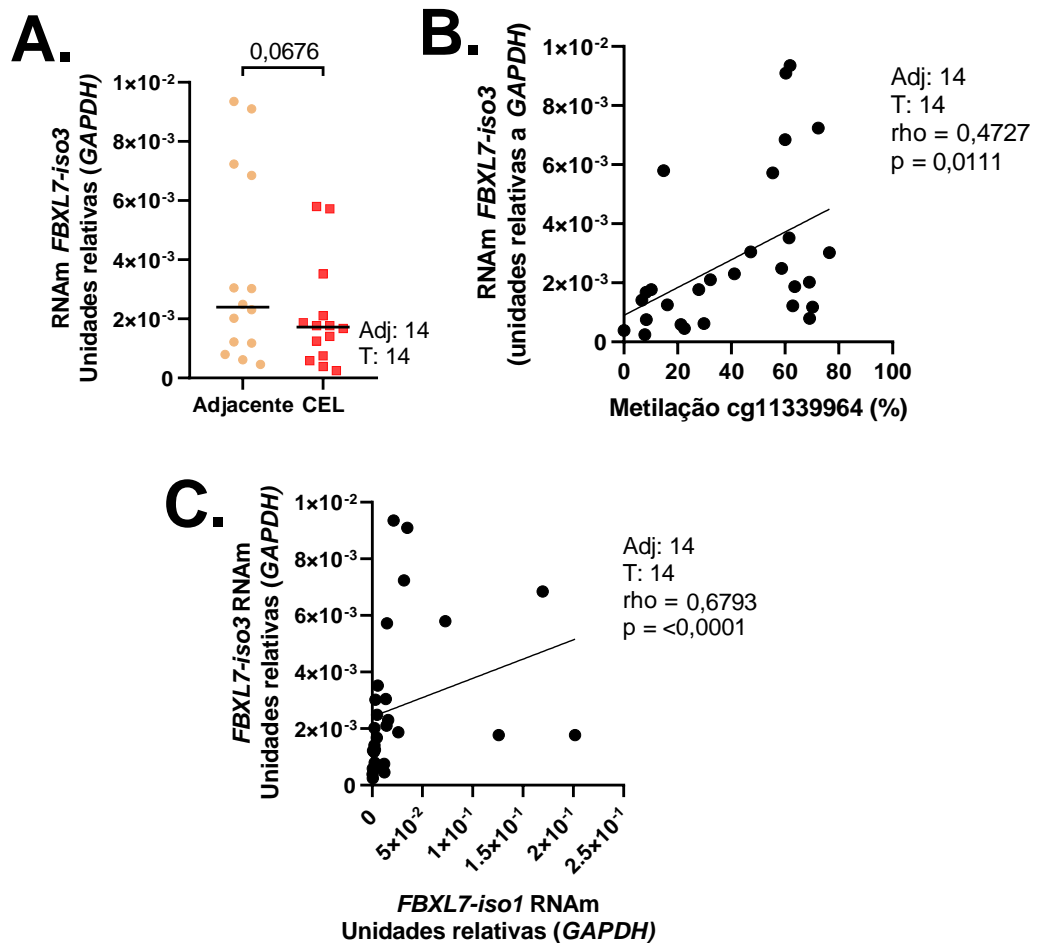


Figura 4.16 - Avaliação da expressão gênica da isoforma 3 de *FBXL7* em carcinoma epidermoide de laringe. A. Gráfico de pontos mostrando os níveis de expressão gênica da terceira isoforma de *FBXL7*, determinada por PCRq e normalizada com a expressão de *GAPDH*, em tecido adjacente não tumoral (Adjacente) e tecido tumoral (CEL) de pacientes com carcinoma epidermoide de laringe. Os traços ligam as amostras pareadas. Teste pareado de Wilcoxon. B. Correlação entre os níveis de expressão da terceira isoforma e a metilação de *FBXL7* em CEL. Teste de Spearman. C. Correlação entre os níveis de expressão da primeira isoforma e os níveis de expressão da terceira isoforma de *FBXL7* em CEL. Teste de Spearman. Adj: tecido adjacente não tumoral; T: tumor.

4.4 ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS E SUA ASSOCIAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA

Para tentar responder essa heterogênea expressão do gene e não correlação com o perfil de metilação, analisamos a frequência de alterações de número de cópias (amplificação ou deleção) nas amostras do nosso microarranjo de metilação. Em CEE, detectamos amplificação em 12,5% dos casos, em CEL em 10% e em CECO em 7% dos casos. A deleção do gene foi detectada em apenas um caso (5%) de CEL (**Figura 4.17A**). Para validar nossos dados, utilizamos os dados de CEE e CECF depositados no TCGA e observamos amplificação em 15,62% dos casos de CEE, 5,17% nos de CEL e 4,8% no CECO (**Figura 4.17B**). Nenhum caso apresentou deleção. Não encontramos diferença de expressão entre amostras sem e com amplificação de *FBXL7* nos pacientes de CEE, CEL e CECO do TCGA (**Figura 4.17C**).

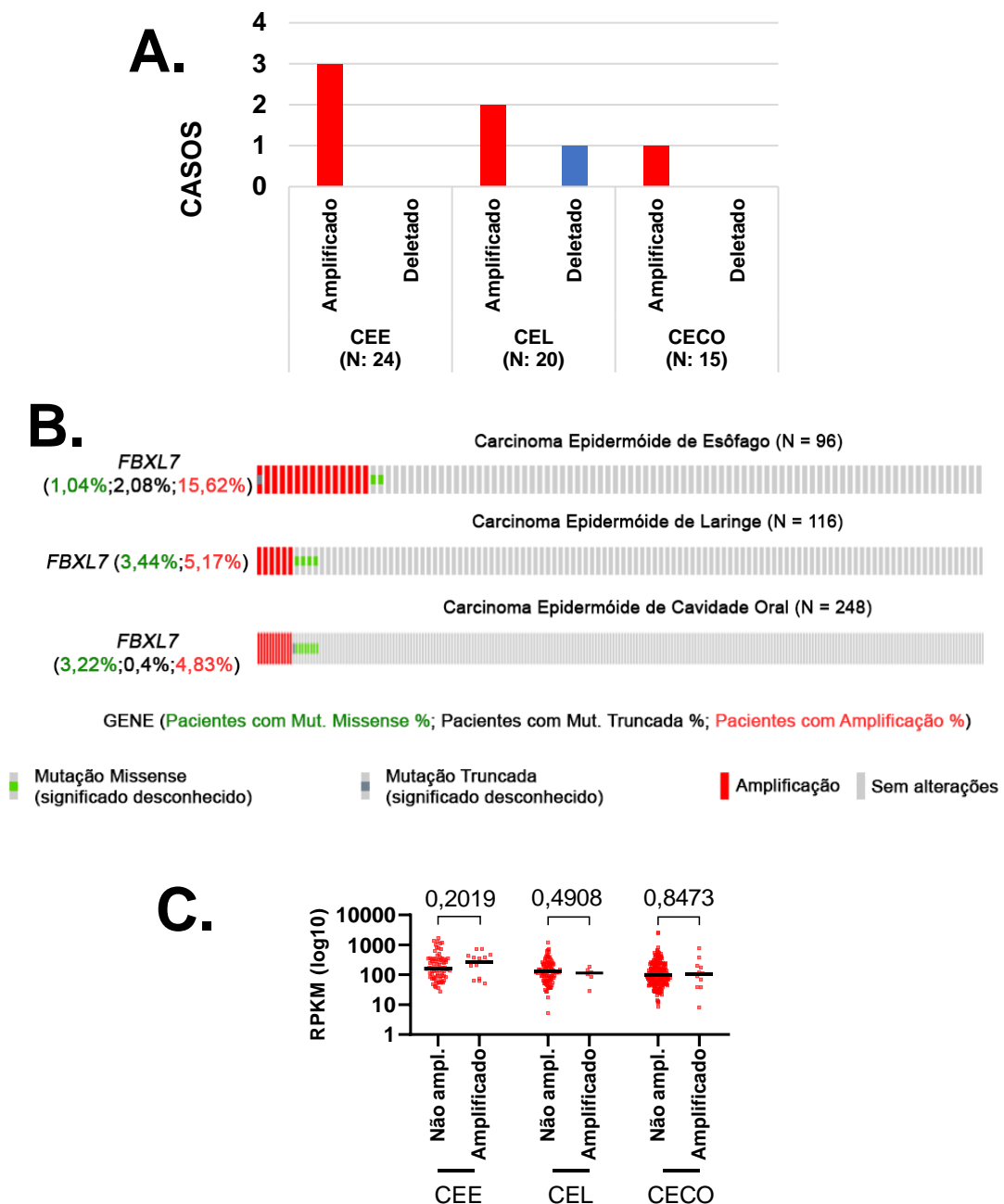


Figura 4.17 – Frequência de alterações de número de cópias de *FBXL7* em carcinomas epidermóides de esôfago, laringe e cavidade oral. A. Frequência de alterações de número de cópias de *FBXL7*, determinadas pelo microarranjo de metilação, em amostras de carcinoma epidermóide de esôfago (CEE), laringe (CEL) e cavidade oral (CECO) de pacientes do INCA. B. Frequência de alterações de número de cópias de *FBXL7*, determinadas pelo microarranjo cgh, em amostras de CEE, CEL e CECO de pacientes do TCGA. C. Avaliação da expressão de *FBXL7*, determinada por sequenciamento de RNA, em amostras de CEE, CEL e CECO de pacientes do TCGA, de acordo com a ocorrência de ampliações do gene. Teste de Mann-Whitney.

4.5 NÍVEIS PROTEICOS DE FBXL7 E SEUS ALVOS BIRC5 E AURKA

Conforme mencionado anteriormente, FBXL7 é uma proteína membro do complexo E3 responsável por reconhecer, ubiquitinar e encaminhar para a degradação outras proteínas. Portanto, avaliamos os níveis de expressão proteica de FBXL7 e seus alvos AURKA e BIRC5 em CEE e CEL e CEOF.

4.5.1 CEE

4.5.1.1 FBXL7

Detectamos a imunexpressão de FBXL7 no citoplasma e núcleo tanto no tecido adjacente não tumoral quanto no tecido tumoral de pacientes com CEE (Figura 4.18A-C). A marcação citoplasmática de FBXL7 foi detectada em todas as amostras analisadas, com medianas de porcentagem de células marcadas de 55% e 100% no tecido adjacente não tumoral e no tumor, respectivamente ($p < 0,0001$). Quanto à marcação nuclear da proteína no tecido adjacente não tumoral, em três amostras (15%) detectamos a marcação em menos de 5% das células e entre as demais amostras foi observada uma mediana de 40% de células marcadas. No tumor, a marcação nuclear foi menos frequente ($p = 0,0031$), sendo que em três amostras (20%) a marcação foi negativa, em nove amostras (60%) a marcação foi detectada em menos de 5% das células e o restante das amostras apresentou uma mediana de marcação de 10% (**Figura 4.19**).

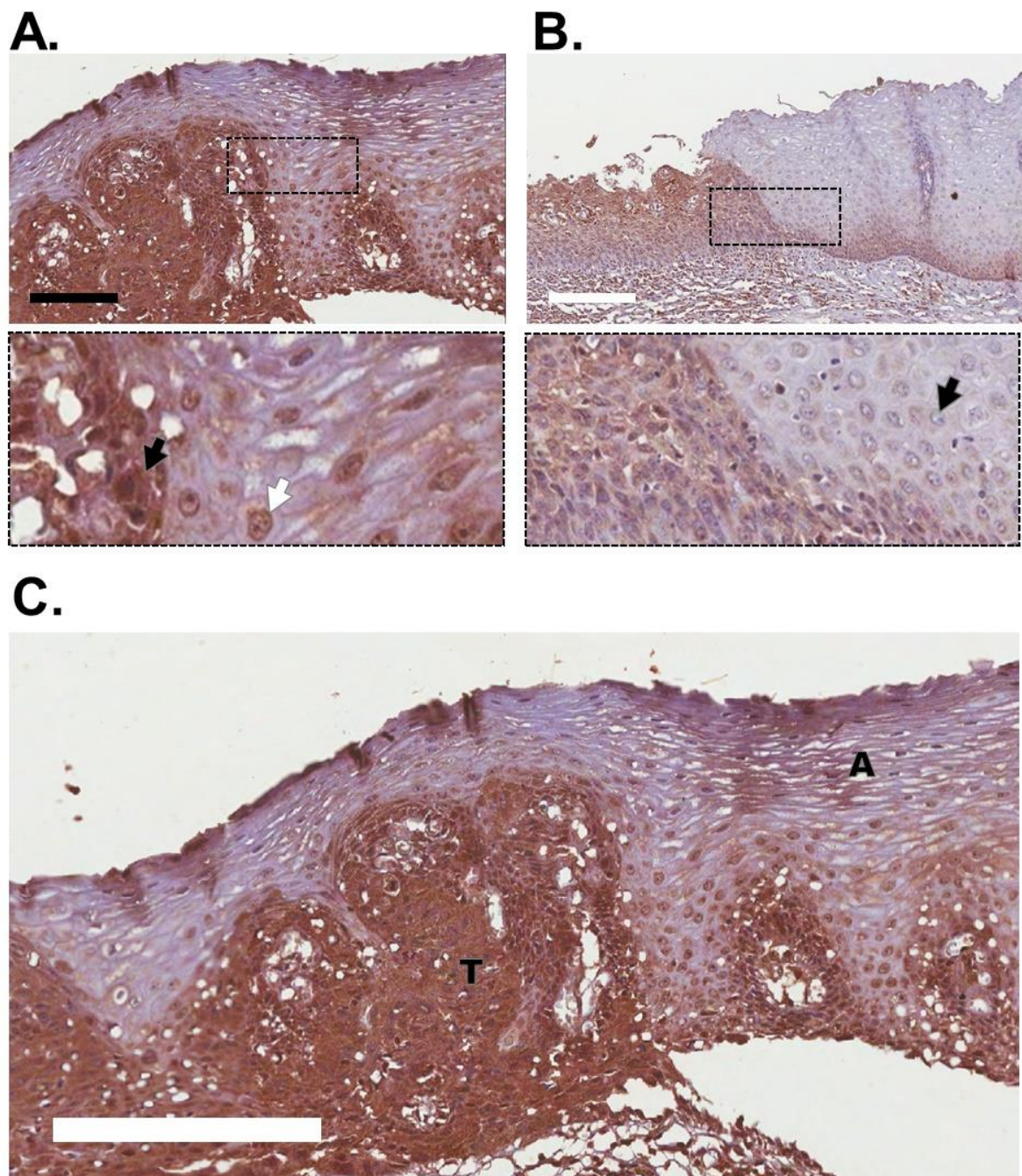


Figura 4.18 - Imunoexpressão de FBXL7 em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago e tecido adjacente não tumoral. A. Marcação positiva de FBXL7 no citoplasma (seta preta) e núcleo (seta branca). B. Marcação negativa de FBXL7 em citoplasma e núcleo (seta preta). C. Representação da imunomarcção de FBXL7 em CEE (T) e tecido adjacente não tumoral (A). Barra preta: Escala 100 μm ; Barras brancas: Escala 200 μm .

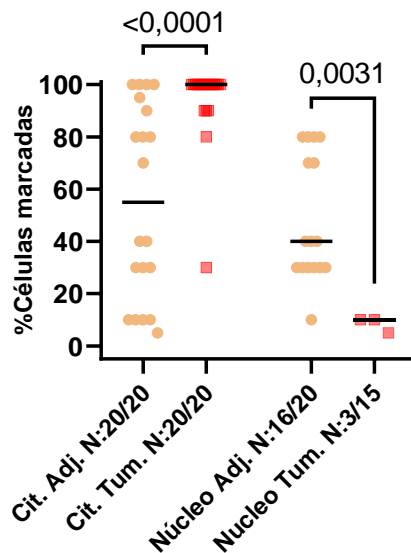


Figura 4.19 – Quantificação da imunomarcagem de FBXL7 em carcinoma epidermoide de esôfago. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células marcadas para FBXL7 no citoplasma ou núcleo (apenas quando marcação detectada em $\geq 5\%$ das células) do tecido adjacente não tumoral ou tumoral dos pacientes com CEE. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

Não foram identificadas associações significativas entre a imunomarcagem de FBXL7 no citoplasma e características sociodemográficas ou clínicas dos pacientes com CEE (**Tabela 4.6**).

Tabela 4.6 - Associação entre características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de FBXL7 em carcinoma epidermoide de esôfago.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|----------------|---|----------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 17 | 19 | 100 (30 - 100) | >0,9999 |
| Feminino | 2 | | 100 (100-100) | |
| Idade (Mediana/57) | | | | |
| < 57 | 8 | 19 | 100 (90 - 100) | >0,9999 |
| ≥ 57 | 11 | | 100 (30 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 14 | 16 | 100 (30 - 100) | >0,9999 |
| Nunca | 2 | | 100 (100 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 12 | 14 | 100 (30 - 100) | >0,9999 |
| Nunca | 2 | | 100 (100 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 3 | 17 | 100 (100 - 100) | 0,5412 |
| Moderado | 14 | | 100 (30 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 15 | 18 | 100 (30 - 100) | 0,7652 |
| III-IV | 3 | | 100 (100 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| 100% marcação | 3 | 18 | Não definido | 0,5241 |
| < 100% marcação | 15 | | 131,6 | |

4.5.1.2 AURKA

A imunomarcção de AURKA (**Figura 4.20A-C**) foi detectada no citoplasma de todas as amostras do tecido adjacente não tumoral e tumoral de pacientes com CEE com medianas de células marcadas de 30% e 80% ($p < 0,0001$), respectivamente. A porcentagem de imunomarcção nuclear também diferiu entre os tecidos ($p = 0,0364$). No tecido adjacente não tumoral, a marcação nuclear foi negativa em 10 amostras (45%) e menor que 5% em 9 amostras (41%), as demais apresentaram mediana de marcação de 5%. Já no tumor, nove amostras (43%) foram negativas e uma amostra (5%) foi menor que 5%, as demais apresentaram mediana de marcação de 30% (**Figura 4.21**).

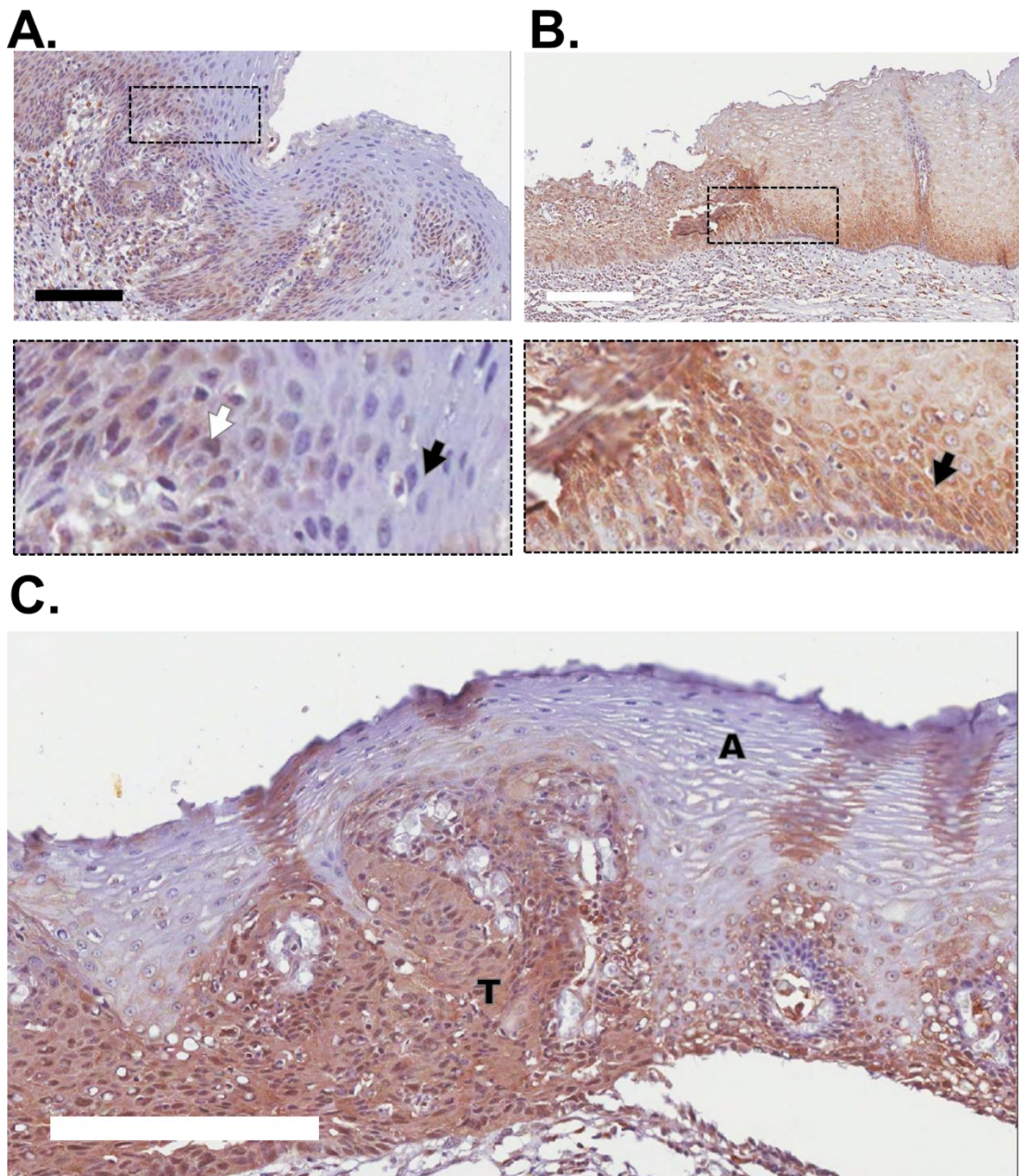


Figura 4.20 - Imunoexpressão de AURKA em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago e tecido adjacente não tumoral. A. Marcação negativa de AURKA no citoplasma (seta preta) e positiva no núcleo (seta branca). B. Marcação positiva de AURKA em citoplasma (seta preta). C. Representação da marcação proteica de AURKA no CEE (T) e tecido adjacente (A). Barra preta: Escala 100 μm ; Barras brancas: Escala 200 μm .

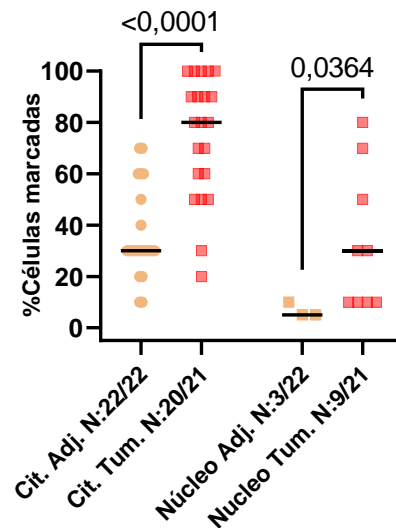


Figura 4.21 - Quantificação da imunomarcação de AURKA em carcinoma epidermoide de esôfago. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação de AURKA no citoplasma ou núcleo (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) do tecido adjacente não tumoral ou tumoral de pacientes com CEE. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

Observamos uma associação estatisticamente significativa apenas entre a imunomarcação de AURKA no citoplasma e o sexo dos pacientes com CEE (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7 - Associação das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunoposição citoplasmática de AURKA em carcinoma epidermoide de esôfago.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|----------------|---|---------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 17 | 20 | 80 (20 - 100) | 0,0140 |
| Feminino | 3 | | 100 (100 - 100) | |
| Idade (Mediana/57) | | | | |
| < 57 | 8 | 20 | 65 (50 - 100) | 0,3430 |
| ≥ 57 | 12 | | 85 (20 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 14 | 17 | 85 (20 - 100) | 0,4132 |
| Nunca | 3 | | 100 (60 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 12 | 15 | 80 (20 - 100) | 0,0154 |
| Nunca | 3 | | 100 (100 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 3 | 18 | 90 (80 - 100) | 0,4841 |
| Moderado | 15 | | 80 (20 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 15 | 20 | 80 (50 - 100) | 0,4841 |
| III-IV | 5 | | 80 (20 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | | Mediana em meses | |
| < 80% marcação | 7 | 18 | 152,1 | 0,5991 |
| ≥ 80% marcação | 11 | | 131,6 | |

4.5.1.3 BIRC5

A imunomarcação de BIRC5 (**Figura 4.22A-C**) foi detectada no citoplasma de todas as amostras do tecido adjacente não tumoral (n = 22) e tumoral (n = 20) de pacientes com CEE, com medianas de 50% e 75% de células marcadas (p = 0,0091), respectivamente. Quanto   marcação nuclear, não houve diferenç a entre o tecido adjacente não tumoral e o tumoral (p=0,2749). No tecido adjacente, a marcação foi negativa em 13 amostras (59%) e inferior a 5% das células em três amostras (14%), as demais apresentaram mediana de marcação de 7,5%. Já entre os tumores, 13 amostras (65%) foram negativas e uma amostra (5%) apresentou marcação inferior a 5% das células, as demais apresentaram mediana de marcação de 20% (**Figura 4.23**).

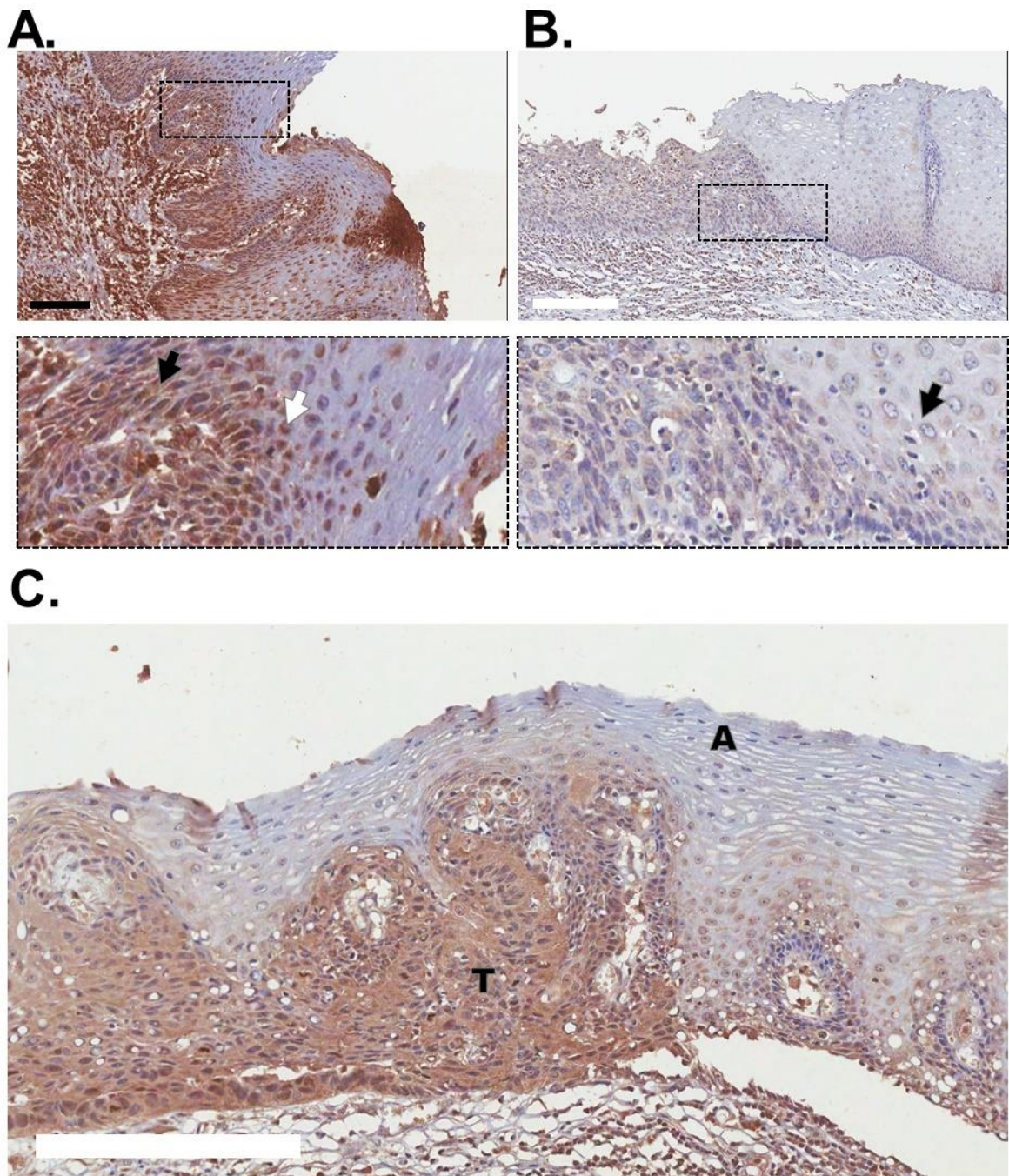


Figura 4.22 - Imunoexpressão de BIRC5 em amostras de carcinoma epidermoide de esôfago e tecido adjacente não tumoral. A. Marcação positiva de BIRC5 no citoplasma (seta preta) e positiva no núcleo (seta branca). B. Marcação negativa de BIRC5 em citoplasma e núcleo (seta preta). C. Representação da marcação proteica de BIRC5 no CEE (T) e tecido adjacente não tumoral (A). Barra preta: Escala 100 μm ; Barra branca: Escala 200 μm .

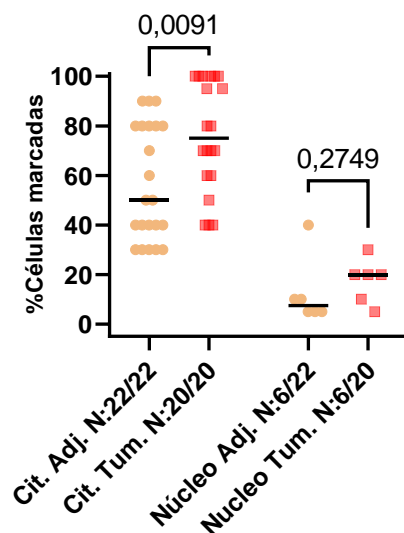


Figura 4.23 - Quantificação da imunomarcação de BIRC5 em carcinoma epidermoide de esôfago. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação de BIRC5 (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e tumoral de pacientes com CEE. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

Encontramos associação apenas entre a porcentagem de células com marcação citoplasmática de BIRC5 e a sobrevida dos pacientes com CEE (**Tabela 4.8**).

Tabela 4.8 - Associação das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunoposição citoplasmática de BIRC5 em carcinoma epidermoide de esôfago.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|-------------------------|---|----------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 17 | 19 | 80 (40 - 100) | 0,9240 |
| Feminino | 2 | | 70 (40 - 100) | |
| Idade (Mediana/57) | | | | |
| < 57 | 8 | 19 | 75 (40 - 100) | 0,9918 |
| ≥ 57 | 11 | | 80 (40 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 14 | 16 | 75 (40 - 100) | 0,7 |
| Nunca | 2 | | 80 (60 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 12 | 14 | 70 (40 - 100) | 0,2967 |
| Nunca | 2 | | 97,5 (95 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 3 | 17 | 80 (40 - 100) | 0,9765 |
| Moderado | 14 | | 75 (40 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 15 | 19 | 80 (40 - 100) | 0,8142 |
| III-IV | 4 | | 75 (70 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | Mediana em meses | | |
| < 75% marcação | 8 | 18 | Não definido | 0,01411 |
| ≥ 75% marcação | 10 | | 131,6 | |

4.5.2 CEL

4.5.2.1 FBXL7

A imunomarcação de FBXL7 (**Figura 4.24A-C**) foi detectada no citoplasma de todas as amostras do tecido adjacente não tumoral (n = 34) e tumoral (n = 46) de pacientes com CEL, com medianas de 70% e 80% (p = 0,3349), respectivamente. Por outro lado, houve diferença do percentual de células com marcação nuclear entre o tecido adjacente não tumoral e o tumoral (p = 0,0331). No tecido adjacente, a marcação foi negativa em sete amostras (20%) e inferior a 5% das células em nove amostras (26%), as demais apresentaram mediana de marcação de 25%. No tumor, 33 amostras (72%) foram negativas e nove amostras (20%) apresentaram marcação em menos de 5% das células, as demais apresentaram mediana de marcação de 5% (**Figura 4.25**).

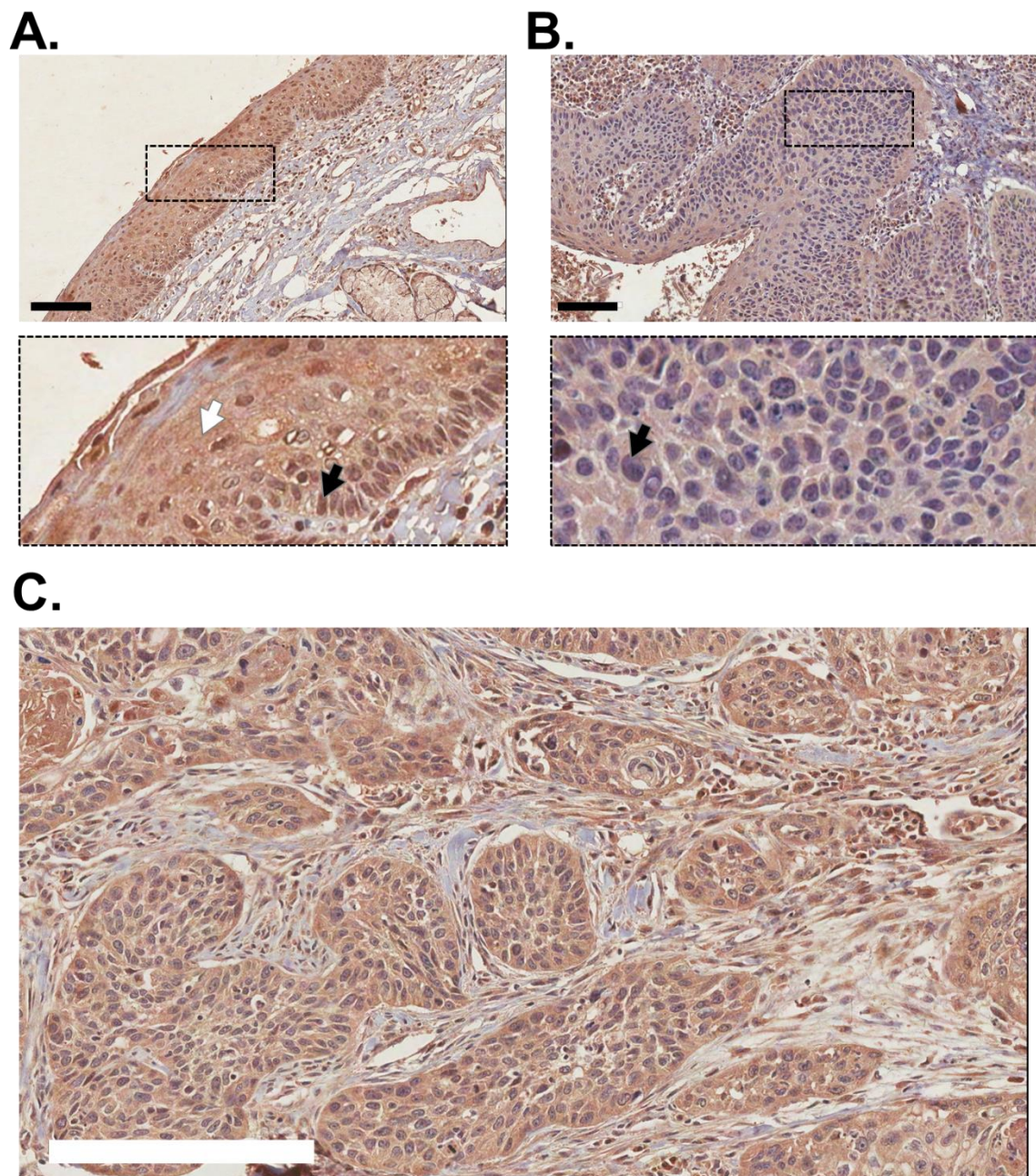


Figura 4.24 – Imunomarcacão de FBXL7 em carcinoma epidermoide de laringe por imuno-histoquímica. A. Representacão da marcaçao positiva de FBXL7 no citoplasma (seta branca) e no núcleo (seta preta). B. Marcaçao negativa de FBXL7 no núcleo. C. Representacão da marcaçao de FBXL7 no tumor, com marcaçao predominante no citoplasma. Barra preta: Escala 100 µm; Barras brancas: Escala 200 µm.

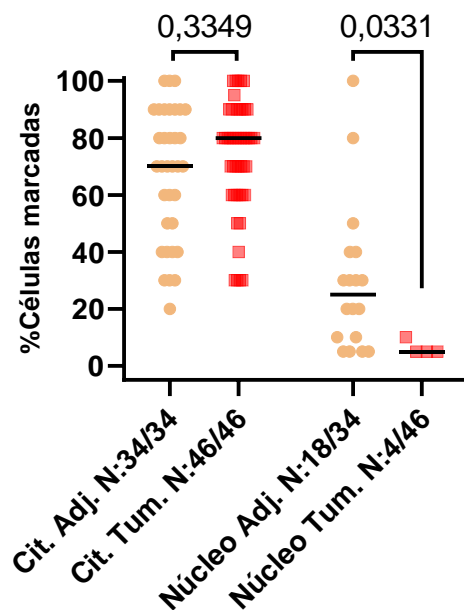


Figura 4.25 – Quantificação da imunomarcaçao de FBXL7 em carcinoma epidermoide de laringe. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células positivas para a marcaçao de FBXL7 (apenas amostras com marcaçao $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e o tumoral de pacientes com CEL. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcaçao citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcaçao citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcaçao nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcaçao nuclear no tecido tumoral.

A imunomarcaçao citoplasmática de FBXL7 foi significativamente associada com o estadiamento dos pacientes com CEL, sendo que os estádios I-II apresentaram maior mediana de marcaçao (95%) em comparaçao aos estádios III-IV (80%) ($p = 0,0225$). Não foram observadas associaçoes significativas para as demais características (**Tabela 4.9**).

Tabela 4.9 - Associação das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes com a imunomarcagem citoplasmática de FBXL7 em CEL.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|--|----|---------|---|---------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 41 | 46 | 80 (30 - 100) | 0,4264 |
| Feminino | 5 | | 70 (30 - 90) | |
| Idade (Mediana/63) | | | | |
| < 63 | 23 | 46 | 70 (30 - 100) | 0,2415 |
| ≥ 63 | 23 | | 80 (30 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 35 | 42 | 80 (30 - 100) | 0,6972 |
| Nunca | 7 | | 80 (60 - 90) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 30 | 42 | 80 (30 - 100) | 0,7832 |
| Nunca | 12 | | 80 (50 - 90) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 4 | 42 | 80 (70 - 100) | 0,1801 |
| Moderado | 32 | | 75 (30 - 100) | |
| Bem | 6 | | 85 (80 - 90) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 4 | 43 | 95 (80 - 100) | 0,0225 |
| III-IV | 39 | | 80 (30 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| < 80% marcação | 20 | 46 | 137,9 | 0,2574 |
| ≥ 80% marcação | 26 | | 38,07 | |

4.5.2.2 AURKA

No tecido adjacente não tumoral de pacientes com CEL, a marcação citoplasmática de AURKA (**Figura 4.26A-C**) foi negativa em uma amostra (3%) e detectada no restante das amostras com uma mediana de 85%. Quanto ao tecido tumoral, três amostras (6%) foram negativas para a marcação e o restante positivo com uma mediana de marcação em 100% das células ($p < 0,0001$). Já a marcação nuclear não foi detectada no tecido adjacente não tumoral de 20 casos (61%), enquanto 13 amostras (39%) apresentaram marcação em menos de 5% das células. No tumor, a marcação nuclear não foi detectada em 20 amostras (43%), 22 amostras (34%) apresentaram marcação nuclear em menos de 5% das células e o restante apresentou mediana de 5% de marcação (**Figura 4.27**).

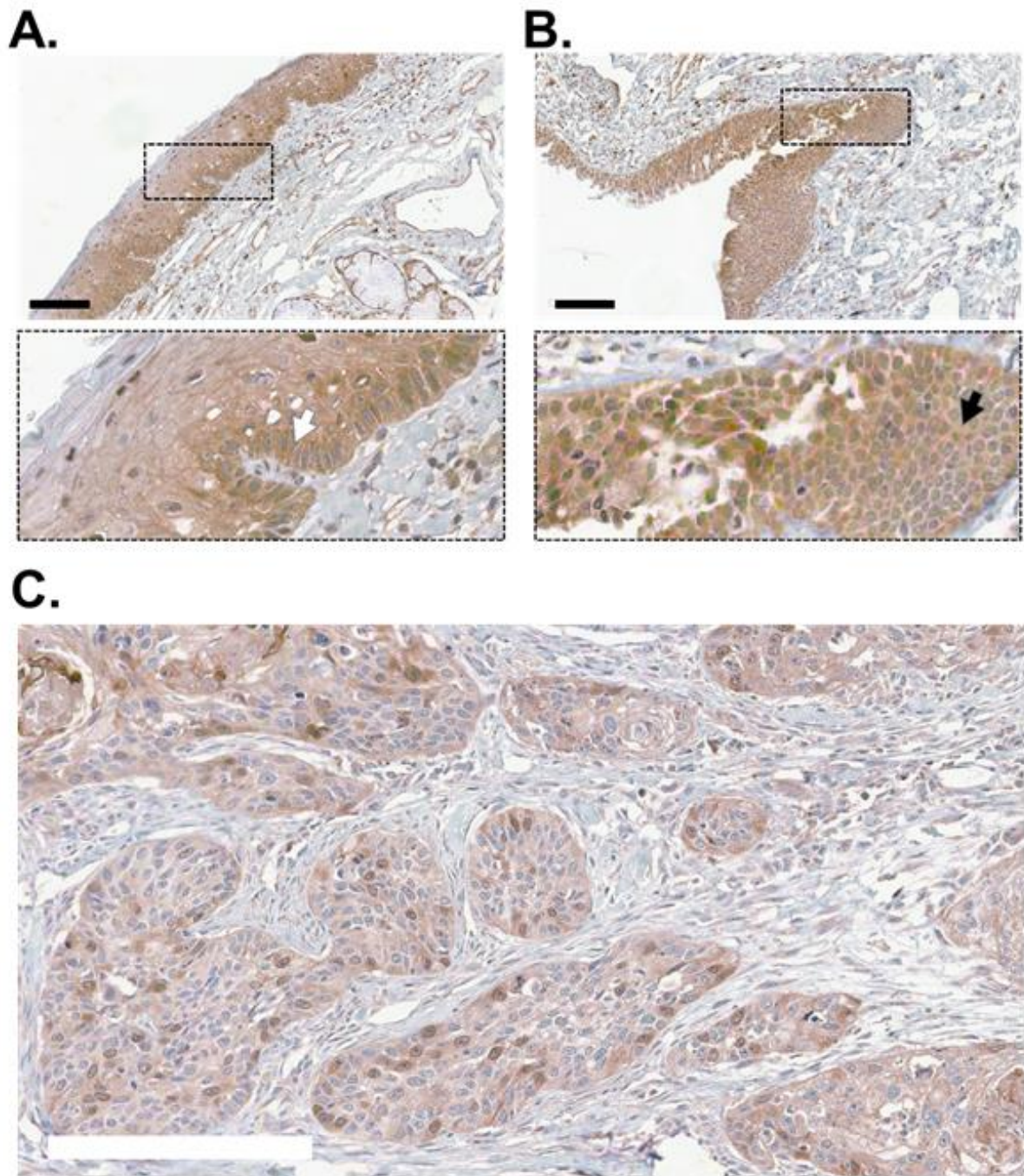


Figura 4.26 - Imunomarcção de AURKA em carcinoma epidemroide de laringe por imuno-histoquímica. A. Representação da marcação negativa nuclear de AURKA (seta branca). B. Marcação positiva de AURKA no citoplasma (seta preta). C. Representação da marcação de AURKA no CEL. Barra preta: Escala 100 μ m; Barras brancas: Escala 200 μ m.

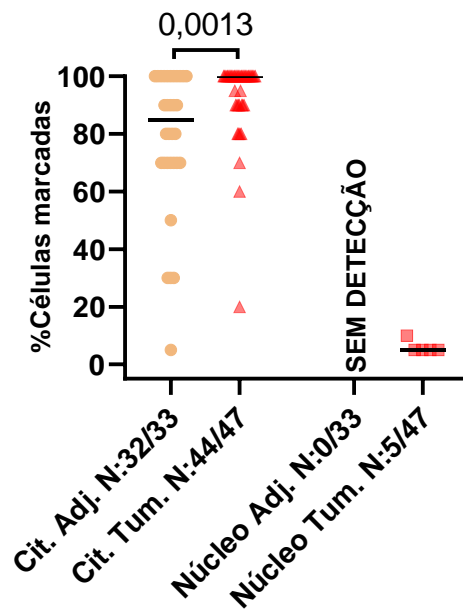


Figura 4.27 - Quantificação da imunomarcção de AURKA em carcinoma epidermoide de laringe. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação de AURKA (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e o tumoral de pacientes com CEL. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

Não foram observadas associações significativas entre a imunomarcção citoplasmática de AURKA e as características clínicas e sociodemográficas de pacientes com CEL (**Tabela 4.10**).

Tabela 4.10 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcção citoplasmática de AURKA em CEL.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|----------------|---|----------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 39 | 44 | 100 (20 - 100) | 0,4549 |
| Feminino | 5 | | 100 (90 - 100) | |
| Idade (Mediana/63) | | | | |
| < 63 | 21 | 44 | 100 (70 - 100) | 0,4625 |
| ≥ 63 | 23 | | 100 (20 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 34 | 40 | 100 (20 - 100) | 0,5353 |
| Nunca | 6 | | 100 (80 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 29 | 40 | 100 (20 - 100) | 0,6055 |
| Nunca | 11 | | 100 (80 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 4 | 40 | 90 (90 - 100) | 0,2671 |
| Moderado | 31 | | 100 (20 - 100) | |
| Bem | 5 | | 100 (80 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 4 | 41 | 100 (90 - 100) | 0,7193 |
| III-IV | 37 | | 100 (20 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| < 100% marcação | 28 | 47 | 20,93 | 0,0983 |
| = 100% marcação | 19 | | 56,17 | |

4.5.2.3 BIRC5

A marcação citoplasmática de BIRC5 (**Figura 4.28A-C**) foi negativa em 11 amostras (33%) e detectada no restante dos tecidos adjacentes não tumorais de pacientes com CEL com uma mediana de 30%. No tecido tumoral, 12 amostras (26%) foram negativas para a marcação citoplasmática e o restante positivo com uma mediana de marcação em 50% das células ($p = 0,1364$). No tecido adjacente não tumoral, a marcação nuclear de BIRC5 não foi detectada em 31 amostras (94%), presente em menos de 5% dos núcleos em uma amostra (3%) e uma amostra apresentou marcação nuclear em 5% das células. No tecido tumoral, a marcação nuclear de BIRC5 não foi detectada em 39 amostras (83%), detectada em menos de 5% das células em uma amostra (2%) e as demais amostras apresentaram mediana de marcação em 5% das células (**Figura 4.29**).

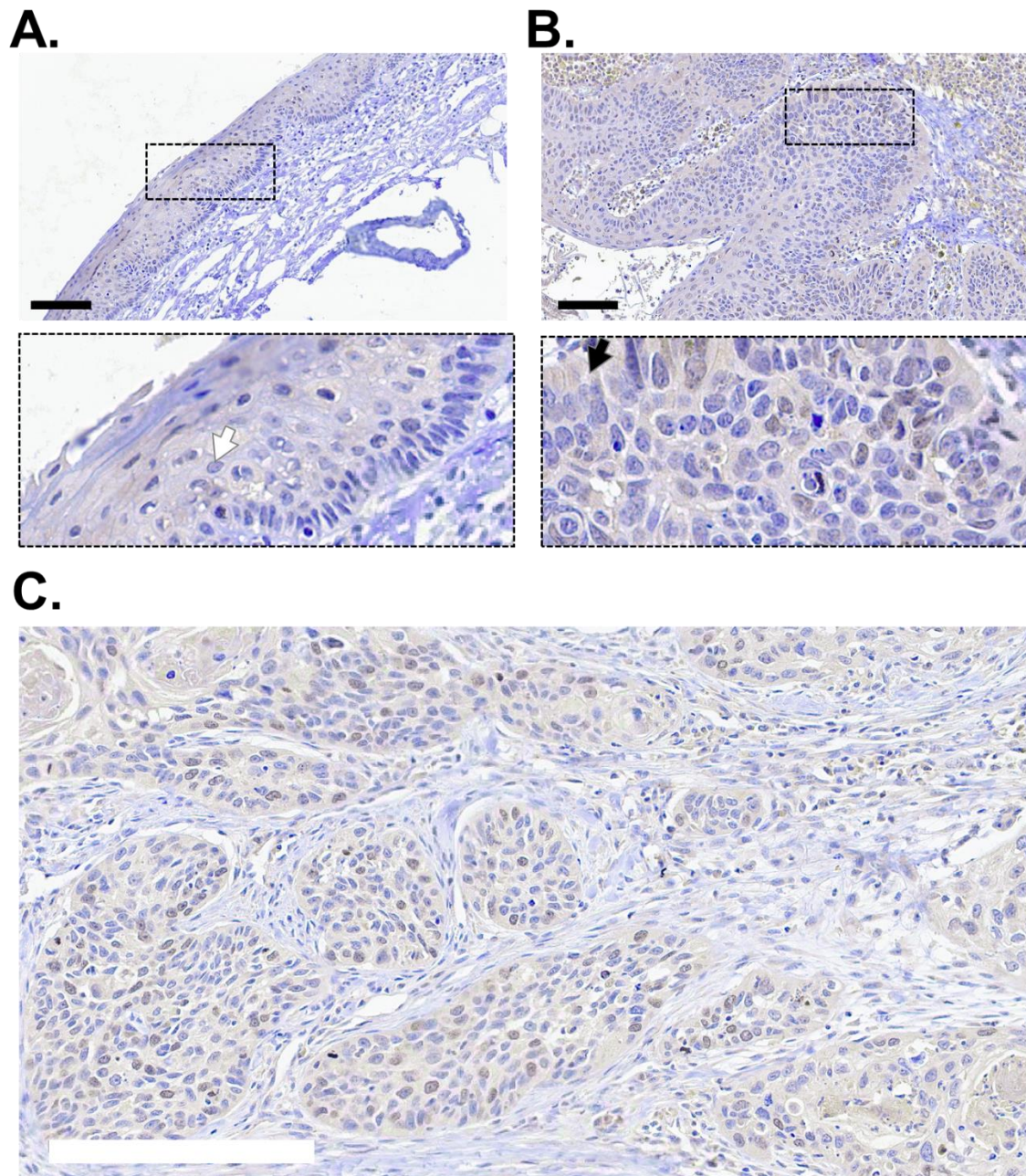


Figura 4.28 - Imunomarcacão de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe por imuno-histoquímica. A. Representacão da marcao negativa nuclear de BIRC5 (seta branca). B. Marcao positiva de BIRC5 no citoplasma (seta preta). C. Representacão da marcao de BIRC5 no CEL. Barra preta: Escala 100 μ m; Barras brancas: Escala 200 μ m.

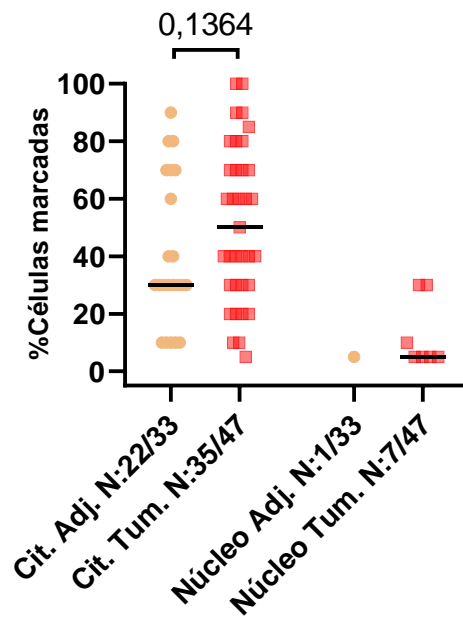


Figura 4.29 - Quantificação da imunomarcagem de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação de BIRC5 (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e o tumoral de pacientes com CEL. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

BIRC5 apresentou menor frequência de marcação citoplasmática em indivíduos etilistas (mediana de 40%) em relação ao não etilistas (mediana de 75%) ($p = 0,0184$). As demais características não apresentaram associação com a imunomarcagem citoplasmática da proteína (**Tabela 4.11**).

Tabela 4.11 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|----------------|---|---------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 32 | 35 | 45 (5 - 100) | 0,3386 |
| Feminino | 3 | | 80 (30 - 90) | |
| Idade (Mediana/63) | | | | |
| < 63 | 18 | 35 | 45 (10 - 100) | 0,8146 |
| ≥ 63 | 17 | | 60 (5 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 28 | 32 | 45 (5 - 100) | 0,3905 |
| Nunca | 4 | | 75 (10 - 85) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 24 | 32 | 40 (5 - 100) | 0,0184 |
| Nunca | 8 | | 75 (10 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 3 | 32 | 70 (30 - 100) | 0,5601 |
| Moderado | 25 | | 50 (5 - 100) | |
| Bem | 4 | | 60 (20 - 85) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 3 | 32 | 60 (40 - 60) | 0,9526 |
| III-IV | 29 | | 50 (5 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | | Mediana em meses | |
| < 50% marcação | 29 | 47 | 45,90 | 0,2709 |
| ≥ 50% marcação | 18 | | 44,53 | |

4.5.3 CEOF

Por fim, nos perguntamos se a expressão proteica de FBXL7 e seus alvos poderia se alterar, em outro tumor epidermoide, não apenas pela transformação do epitélio, mas também pela exposição aos fatores de risco. Para tal, escolhemos o CEOF, que pode se originar pela exposição aos mesmos fatores de risco de CEE e CEL (álcool e tabaco), mas também pela infecção pelo HPV.

4.5.3.1 FBXL7

A imunomarcção citoplasmática de FBXL7 (**Figura 4.30A-C**) foi detectada em todas as amostras, sendo que a mediana de marcação para o tecido adjacente não tumoral foi de 80% enquanto no tumor foi de 100% das células ($< 0,0001$). A marcação nuclear de FBXL7 no tecido adjacente não tumoral foi negativa em 23 das amostras (45%) e inferior a 5% das células em sete casos (13%). No restante das amostras, a mediana de marcação foi de 10%. No tumor, a marcação foi negativa em 23 amostras (30%) e em menos de 5% das células em 21 amostras (28%), apresentando mediana de marcação de 10%. Não houve diferença na marcação nuclear de FBXL7 entre os tecidos ($p = 0,5952$) (**Figura 4.31**).

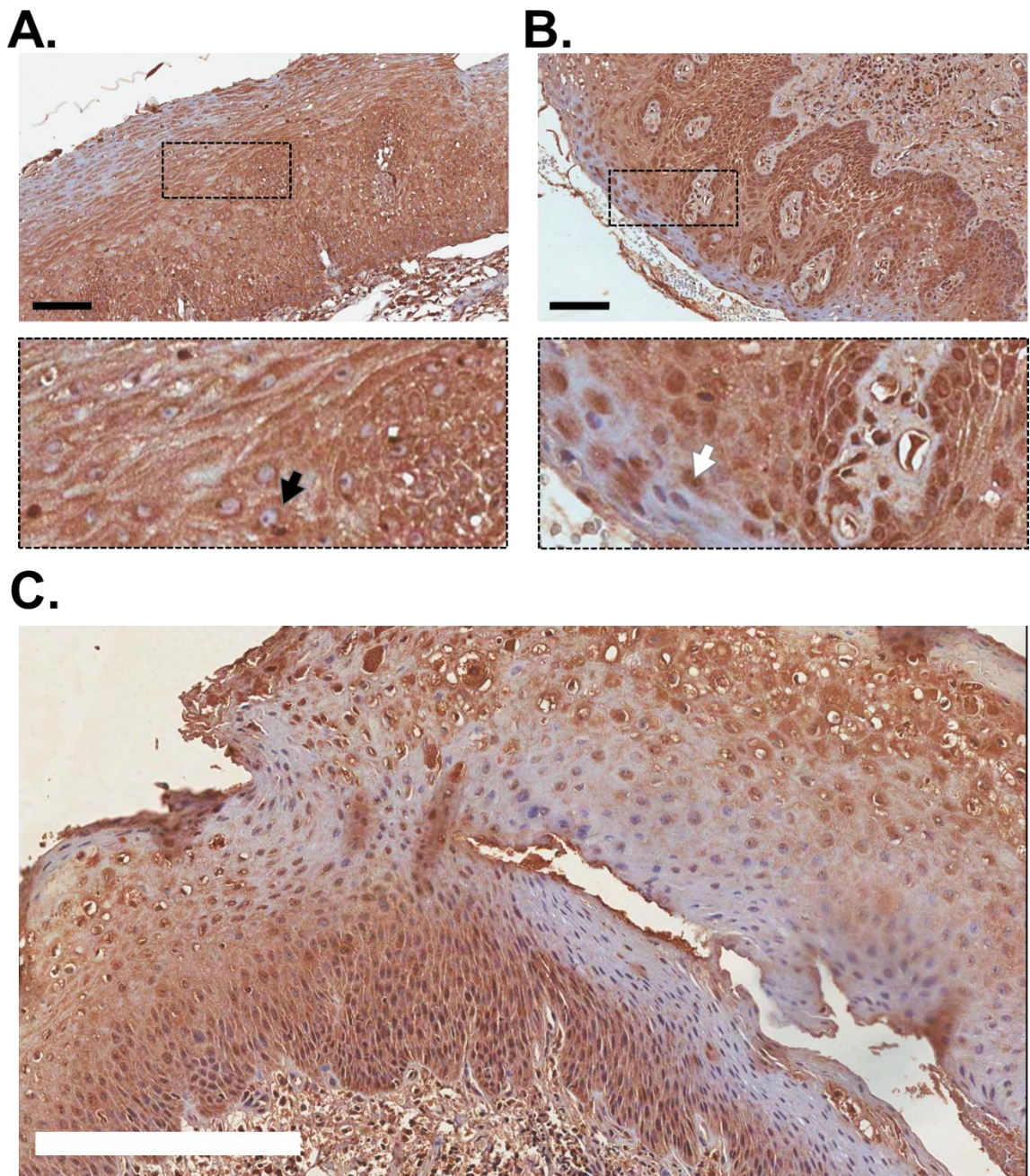


Figura 4.30 - Imunoexpressão de FBXL7 em carcinoma epidermoide de orofaringe. A. Marcação positiva de FBXL7 no citoplasma (seta preta). B. Marcação positiva de FBXL7 no núcleo (seta branca). C. Representação da marcação proteica de FBXL7 no CEOF. Barra preta: Escala 100 μm ; Barra branca: Escala 200 μm .

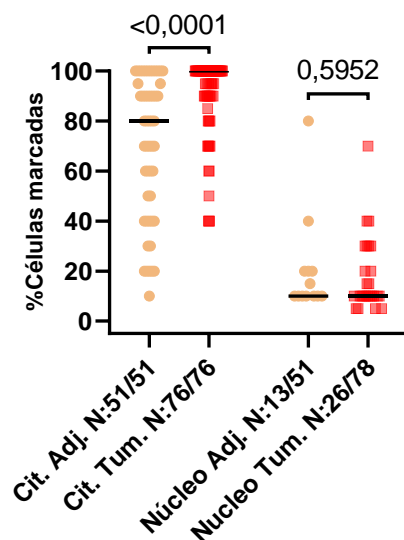


Figura 4.31 - Quantificação da imunomarcação de FBXL7 em carcinoma epidermoide de orofaringe. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e o tumoral de pacientes com CEOF. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

Não encontramos associações significativas entre a marcação citoplasmática de FBXL7 e as características sociodemográficas ou clínicas dos pacientes com CEOF (**Tabela 4.12**).

Tabela 4.12 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcção citoplasmática de FBXL7 em carcinoma epidermoide de orofaringe.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|-------------------------|---|----------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 59 | 76 | 100 (40 - 100) | 0,1891 |
| Feminino | 17 | | 95 (40 - 100) | |
| Idade (Mediana/59) | | | | |
| < 59 | 37 | 76 | 100 (50 - 100) | 0,5817 |
| ≥ 59 | 39 | | 100 (40 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 19 | 76 | 100 (40 - 100) | 0,2386 |
| Nunca | 57 | | 100 (40 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 42 | 76 | 95 (40 - 100) | 0,1222 |
| Nunca | 34 | | 100 (40 - 100) | |
| HPV | | | | |
| Negativo | 57 | 76 | 40 (40 - 100) | 0,9554 |
| Positivo | 19 | | 100 (60 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 15 | 74 | 100 (60 - 100) | 0,3391 |
| Moderado | 53 | | 100 (40 - 100) | |
| Bem | 6 | | 100 (90 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 14 | 76 | 95 (40 - 100) | 0,4135 |
| III-IV | 62 | | 100 (40 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | Mediana em meses | | |
| < 100% marcação | 32 | 76 | 33,37 | 0,1214 |
| = 100% marcação | 44 | | 18,97 | |

4.5.3.2 AURKA

A marcação citoplasmática de AURKA (**Figura 4.32A-C**) foi positiva para todas as amostras, tanto no tecido adjacente não tumoral quanto no tumoral. A mediana de células marcadas no tecido adjacente foi de 40% enquanto no tumor foi de 90% ($p < 0,0001$). No tecido adjacente não tumoral, a marcação nuclear foi negativa em 13 amostras (28%) e inferior a 5% das células em 25 amostras (54%), com uma mediana de marcação de 15%. Enquanto no tumor a marcação nuclear foi negativa em 11 amostras (15%) e inferior a 5% das células em 18 amostras (25%), com mediana de marcação de 20%, superior ao tecido adjacente ($p = 0,0329$) (**Figura 4.33**).

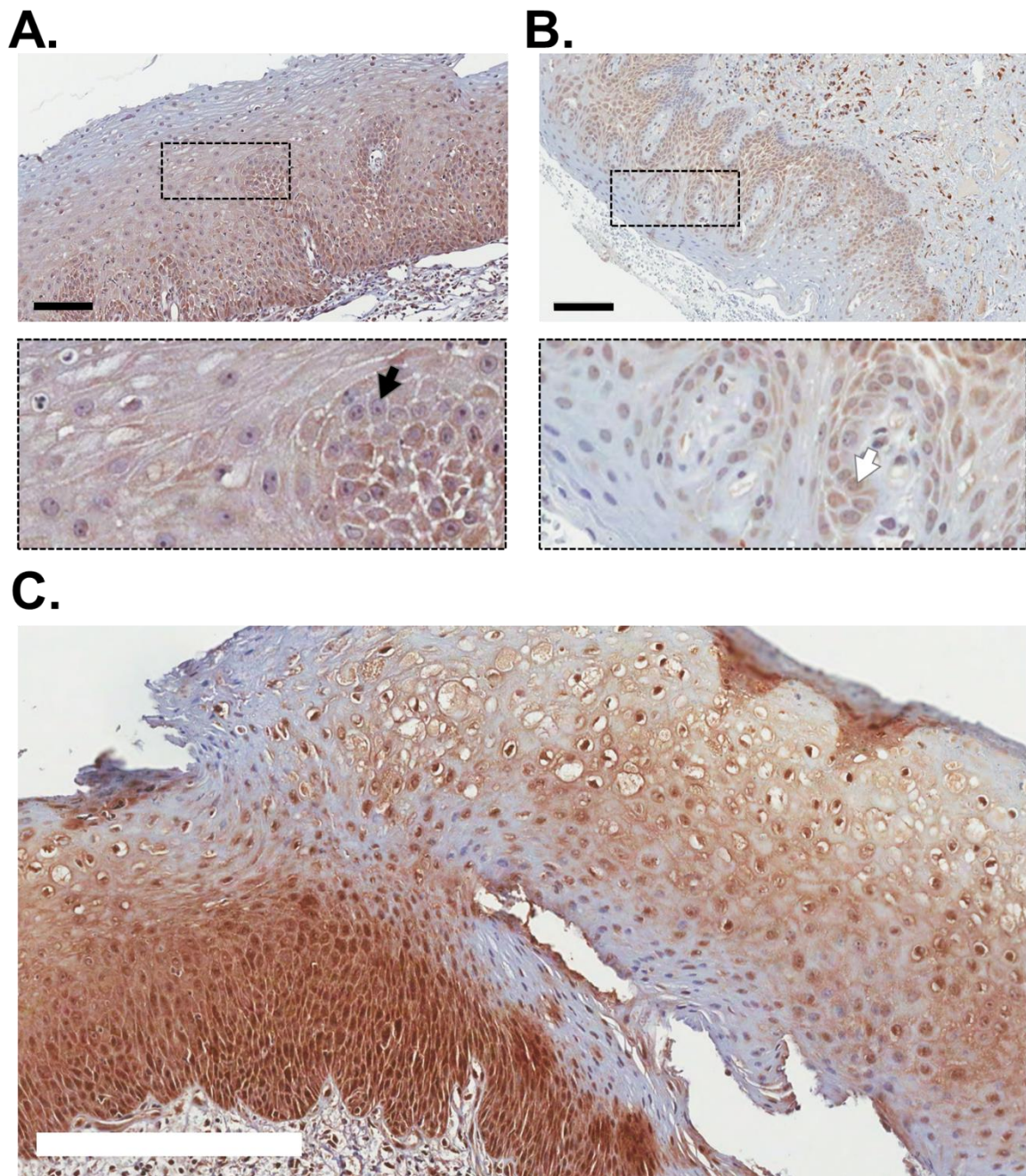


Figura 4.32 - Imunoexpressão de AURKA em carcinoma epidermóide de orofaringe. A. Marcação negativa de AURKA no núcleo (seta branca). B. Marcação positiva de AURKA no núcleo (seta preta). C. Representação da marcação proteica de AURKA no CEOF. Barra preta: Escala 100 μm ; Barra branca: Escala 200 μm .

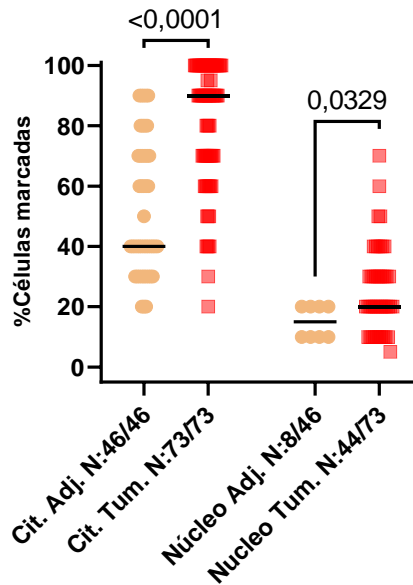


Figura 4.33 - Quantificação da imunomarcação de AURKA em carcinoma epidermoide de orofaringe. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação de AURKA (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e o tumoral de pacientes com CEOF. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

Pacientes com menor frequência de marcação citoplasmática de AURKA apresentaram mediana de sobrevida de 14,73 meses, enquanto entre pacientes com maior marcação essa mediana foi de 27,37 meses ($p = 0,0416$). As demais características sociodemográficas e clínicas não apresentaram associação com a imunomarcação da proteína (**Tabela 4.13**).

Tabela 4.13 - Associação entre as características sociodemográficas ou clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de AURKA em carcinoma epidermoide de orofaringe.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|-------------------------|---|---------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 57 | 73 | 90 (20 - 100) | 0,6485 |
| Feminino | 16 | | 90 (40 - 100) | |
| Idade (Mediana/59) | | | | |
| < 59 | 34 | 73 | 90 (20 - 100) | 0,6577 |
| ≥ 59 | 39 | | 90 (40 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 54 | 73 | 90 (20 - 100) | 0,1165 |
| Nunca | 19 | | 100 (40 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 42 | 73 | 90 (20 - 100) | 0,9840 |
| Nunca | 31 | | 90 (40 - 100) | |
| HPV | | | | |
| Negativo | 54 | 73 | 90 (30 - 100) | 0,8160 |
| Positivo | 19 | | 90 (20 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 15 | 71 | 90 (40 - 100) | 0,8675 |
| Moderado | 50 | | 90 (20 - 100) | |
| Bem | 6 | | 90 (70 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 14 | 73 | 85 (50 - 100) | 0,8184 |
| III-IV | 59 | | 90 (20 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | Mediana em meses | | |
| < 90% marcação | 31 | 73 | 14,73 | 0,0416 |
| ≥ 90% marcação | 42 | | 24,37 | |

4.5.3.3 BIRC5

A marcação citoplasmática de BIRC5 (**Figura 4.34A-C**) foi detectada em todas as amostras do tecido adjacente não tumoral, sendo que em quatro (9%) destas a marcação foi < 5% das células e no restante a mediana de marcação foi de 60%. No tecido tumoral, um caso (1,5%) apresentou marcação negativa e nas demais a mediana de marcação foi de 90%, superior ao adjacente ($p < 0,0001$). A marcação nuclear foi inferior a 5% das células em 38 amostras (90%) e negativa em quatro amostras (10%) de tecido adjacente não tumoral. No tumor, a marcação nuclear foi detectada em menos de 5% das células em 27 amostras (39%) e negativa em 15 amostras (22%), com mediana de células marcadas de 10% nos demais casos (**Figura 4.35**).

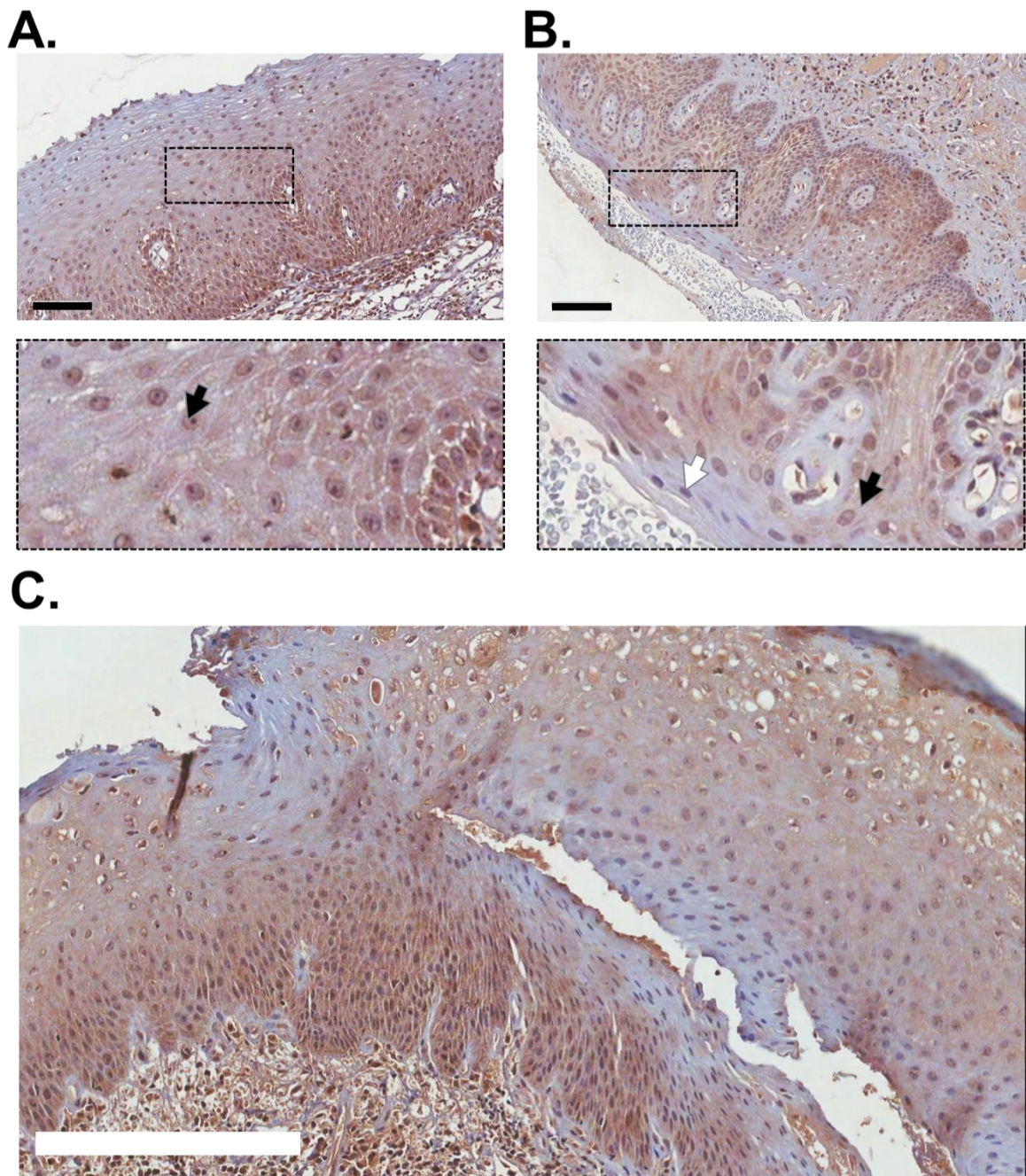


Figura 4.34 - Imunoexpressão de BIRC5 em carcinoma epidermoide de orofaringe. A. Marcação positiva de BIRC5 no núcleo (seta preta). B. Marcação positiva de BIRC5 no citoplasma (seta preta). C. Representação da marcação proteica de BIRC5 no CEOF Barra preta: Escala 100 μ m; Barra branca: Escala 200 μ m.

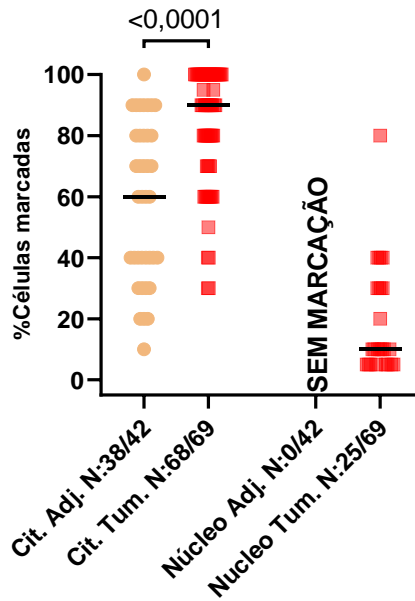


Figura 4.35 - Quantificação da imunomarcação de BIRC5 em carcinoma epidermoide de laringe. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de células com marcação de BIRC5 (apenas amostras com marcação $\geq 5\%$ das células) no citoplasma ou núcleo do tecido adjacente não tumoral e o tumoral de pacientes com CEOF. Teste de Mann-Whitney. Cit. Adj.: marcação citoplasmática no tecido adjacente não tumoral; Cit. Tum: marcação citoplasmática no tecido tumoral; Núcleo Adj.: marcação nuclear no tecido adjacente não tumoral; Núcleo Tum: marcação nuclear no tecido tumoral.

A imunomarcação citoplasmática de BIRC5 não foi associada com as características clínicas e sociodemográficas de pacientes com CEOF (**Tabela 4.14**).

Tabela 4.14 - Associação entre as características sociodemográficas e clínicas dos pacientes e a imunomarcagem citoplasmática de BIRC5 em carcinoma epidermoide de orofaringe.

| Característica clínica ou sociodemográfica | n | n total | % Células marcadas Mediana (Min-Max) | p |
|---|----------|----------------|---|----------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 53 | 68 | 90 (30 - 100) | 0,6775 |
| Feminino | 15 | | 90 (60 - 100) | |
| Idade (Mediana/59) | | | | |
| < 59 | 34 | 68 | 90 (30 - 100) | 0,5935 |
| ≥ 59 | 34 | | 90 (40 - 100) | |
| Tabagismo | | | | |
| Sim/Ex | 51 | 68 | 95 (60 - 100) | 0,4648 |
| Nunca | 17 | | 90 (30 - 100) | |
| Etilismo | | | | |
| Sim/Ex | 38 | 68 | 85 (50 - 100) | 0,6631 |
| Nunca | 30 | | 90 (30 - 100) | |
| HPV | | | | |
| Negativo | 49 | 68 | 90 (30 - 100) | 0,7714 |
| Positivo | 19 | | 90 (30 - 100) | |
| Diferenciação | | | | |
| Pouco | 15 | 66 | 80 (40 - 100) | 0,8019 |
| Moderado | 45 | | 90 (30 - 100) | |
| Bem | 6 | | 85 (60 - 100) | |
| Estadiamento | | | | |
| I-II | 12 | 68 | 90 (60 - 100) | 0,9461 |
| III-IV | 56 | | 90 (30 - 100) | |
| Sobrevida | | | | |
| | | | Mediana em meses | |
| 100% marcação | 29 | 69 | 23,70 | 0,3006 |
| ≥ 90% marcação | 40 | | 26,53 | |

A **Tabela 4.15** resume todos os achados desta seção de avaliação proteica.

Tabela 4.15 - Resumo das quantificações de imunomarcacão das proteínas FBXL7, AURKA e BIRC5 nos CEE e CECP.

| | FBXL7 | | AURKA | | BIRC5 | |
|------|------------|--------|------------|--------|------------|--------|
| | Citoplasma | Núcleo | Citoplasma | Núcleo | Citoplasma | Núcleo |
| CEE | + | - | + | + | + | 0 |
| CEL | 0 | - | + | 0 | 0 | 0 |
| CEOF | + | 0 | + | + | + | + |

+ : Maior marcação no tumor.

- : Menor marcação no tumor.

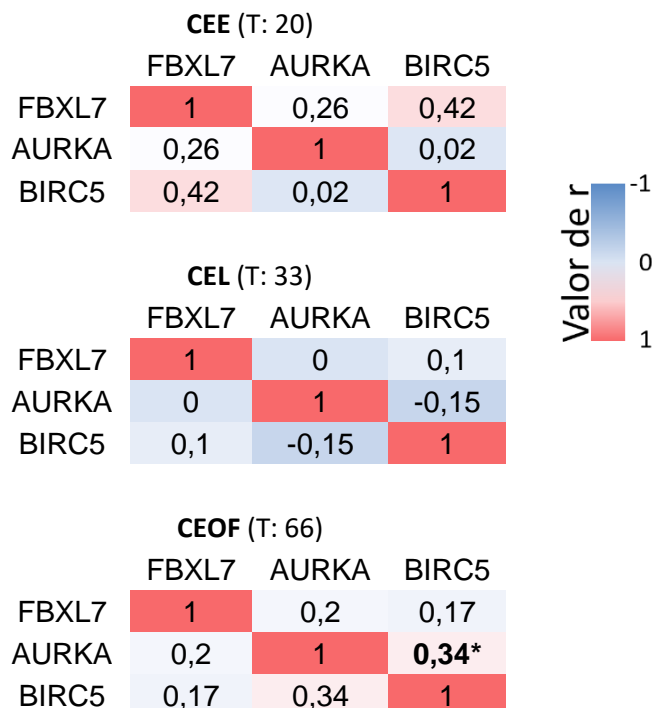
0 : Sem diferença de marcação entre o tecido adjacente não tumoral e o tumor.

+* : Apenas detectado em tecido tumoral, sem confirmação estatística.

4.5.3.4 ATUAÇÃO DE FBXL7 NOS NÍVEIS PROTEICOS DE AURKA E BIRC5

Finalmente, analisamos as correlações entre a porcentagem de células com marcação citoplasmática para FBXL7, AURKA e BIRC5 em cada amostra tumoral. Apenas amostras tumorais em que a marcação foi observada em pelo menos 5% das células foram consideradas. Já as correlações para a marcação nuclear não foram realizadas pela alta frequência de casos com marcação negativa ou inferior a 5% das células. Não foram observadas correlações entre FBXL7 e seus alvos em CEE, CEL e CEOF ($p > 0,05$) (**Figura 4.36A**). Por outro lado, em CEOF, foi observada uma correlação direta significativa entre a marcação de AURKA e BIRC5 ($\rho = 0,3392$, $p = 0,0053$) (**Figura 4.36B**).

A.



B.

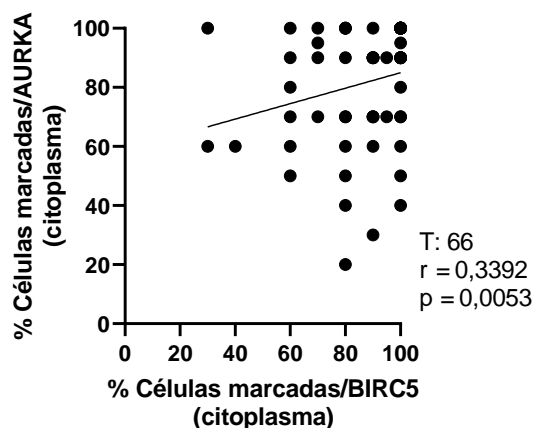


Figura 4.36 - Correlação entre a marcação citoplasmática de FBXL7 e de seus alvos em carcinomas epidermoides de esôfago e cabeça e pescoço. A. Matrizes de correlação entre a porcentagem de células tumorais com marcação citoplasmática de FBXL7 e seus alvos, AURKA e BIRC5 em CEE, CEL e CEOF. Teste de Spearman, valores em negrito são significativos ($p < 0,05$). B. Gráfico da correlação entre a o percentual de células com marcação citoplasmática de AURKA e BIRC5 em CEOF. Teste de Spearman. T: amostras tumorais.

4.6 PERFIL DE METILAÇÃO EM cg11339964 COMO REGULADOR DE ENHANCER OU DE RETROVÍRUS HUMANO ENDÓGENO

A hipometilação quase universal de cg11339964, sonda anotada em *FBXL7*, no epitélio transformado nos chamou atenção por ter ligação com os fatores de risco em alguns sítios anatômicos e não apresentar correlação com a expressão do gene. Assim, nos perguntamos se esta hipometilação poderia estar associada a outros elementos regulatórios. Inicialmente, buscamos se essa região poderia conter alguma outra função ou elemento. Para isso, utilizamos as ferramentas disponíveis no UCSC Genome Browser ChromHMM para visualização dos estados da cromatina e RepeatMasker para verificar a presença de elementos repetitivos. Verificamos que a sonda cg11339964 abriga uma região de enhancer e um elemento repetitivo *MER4A1* (Figura 4.37).

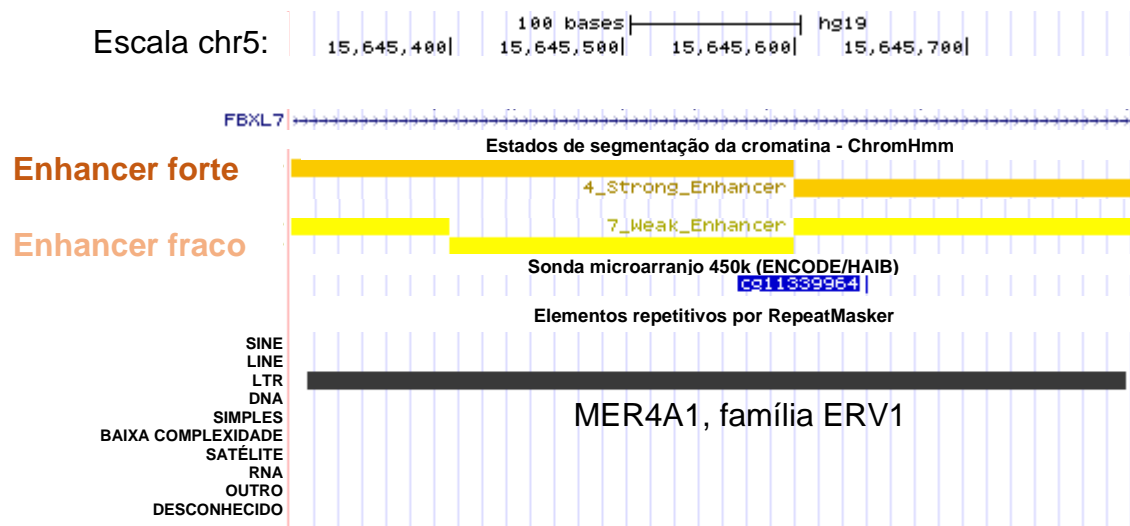


Figura 4.37 – Visualização no UCSC GenomeBrowser da região genômica que inclui a sonda cg11339964 com trackers de ChromHMM e RepeatMasker ativos. A imagem aponta uma marcação de Enhancer e a presença do elemento repetitivo MER4A1. O Enhancer forte está caracterizado em uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas (H1-hESC) e o forte numa linhagem de fibroblastos de pulmão humano (NHLF).

4.6.1 PERFIL DE METILAÇÃO EM cg11339964 COMO REGULADOR DA ATIVIDADE DE ENHANCER

Primeiramente, verificamos a ação da metilação como reguladora da atividade do enhancer. Com esta finalidade, realizamos a correlação, em CEL, entre o perfil de

metilação de cg11339964 e a expressão de todos os genes avaliados pela plataforma de microarranjo de expressão Human Exon 1.0 ST (Affymetrix), experimento realizado anteriormente pelo grupo (GSE143224). Nesta análise, identificamos dois genes cuja expressão foi significativamente correlacionada com os níveis de metilação de cg11339964, *TARBP2* ($\rho = -0,9043$, p-ajustado = 0,01) e *TYK2* ($\rho = -0,889$, p-ajustado = 0,031) (**Figura 4.38A-B**). Ambos superexpressos nos microarranjos de expressão de CEL e CEE do grupo (GSE75241 (NICOLAU-NETO; DA COSTA; DE SOUZA SANTOS; GONZAGA *et al.*, 2018)) (**Figura 4.38C-D**).

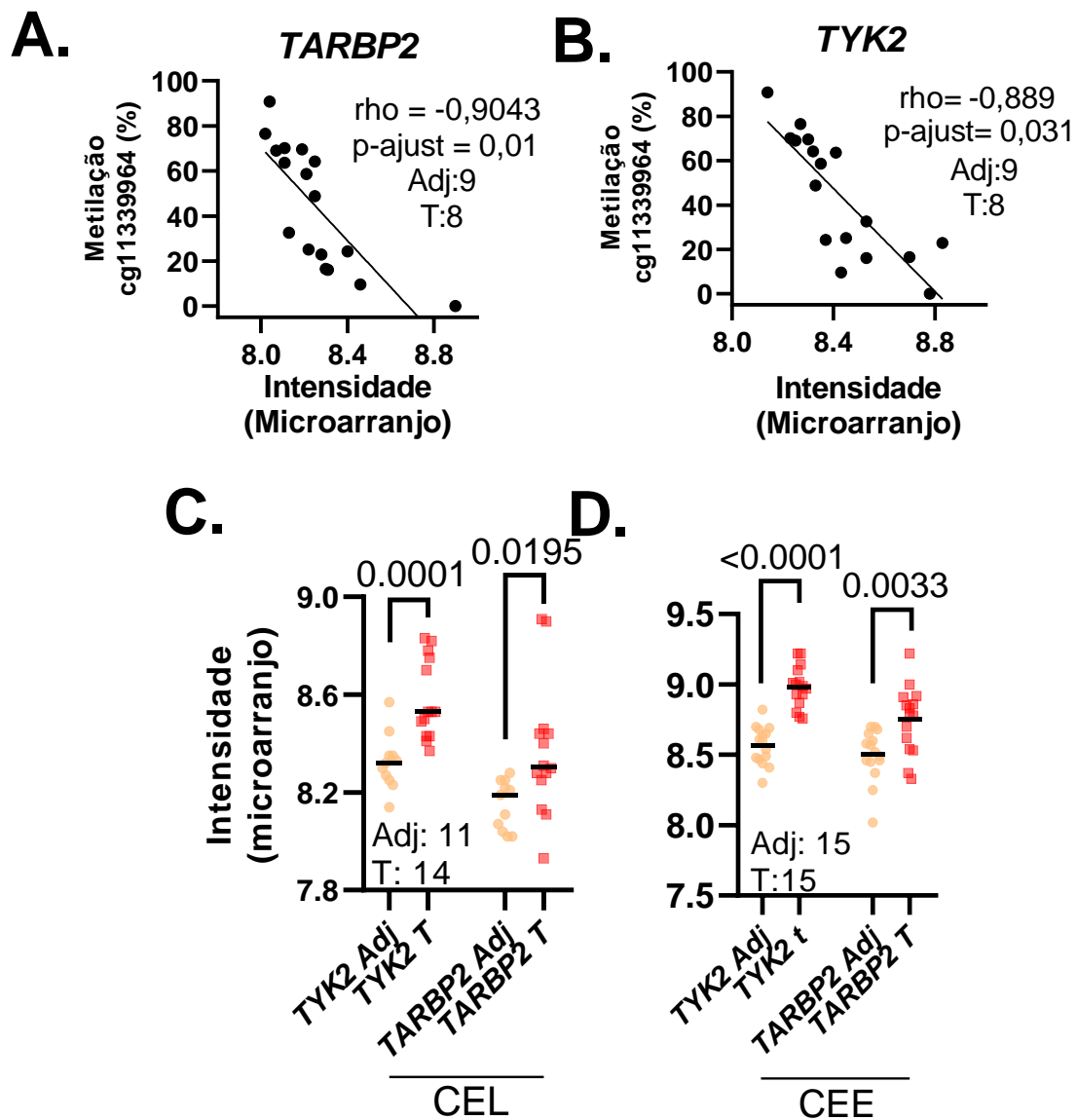


Figura 4.38 – Avaliação dos possíveis genes regulados pela metilação diferencial da sonda cg11339964, anotada no corpo de *FBXL7*. A-B. Correlação entre o perfil de metilação de *FBXL7* e a intensidade relativa de expressão, determinada pelo microarranjo Human Exon 1.0 ST (Affymetrix), dos genes *TARBP2* e *TYK2*, respectivamente, em CEL. Teste de Spearman. C-D. Níveis de expressão de *TARBP2* e *TYK2* em CEL e CEE e seus tecidos adjacentes não tumorais, respectivamente. Teste de Mann-Whitney para *TYK2* no CEL e t de Student não pareado para as outras análises. Adj: tecido adjacente não tumoral; T: tumor.

A partir desses achados, iniciamos uma validação biológica e experimental da expressão destes genes em um subgrupo de amostras de CEE e CEL. Em CEL, não

encontramos diferença de expressão de *TARBP2* ($p = 0,2676$) e *TYK2* ($p = 0,1928$) entre o tecido adjacente não tumoral e o tecido tumoral (**Figura 4.39A e C**). Também não observamos correlação entre a metilação de cg11339964 e os níveis de expressão de *TARBP2* ($\rho = -0,06897$, $p = 0,7273$) ou *TYK2* ($\rho = -0,07711$, $p = 0,6909$) nestes tecidos.

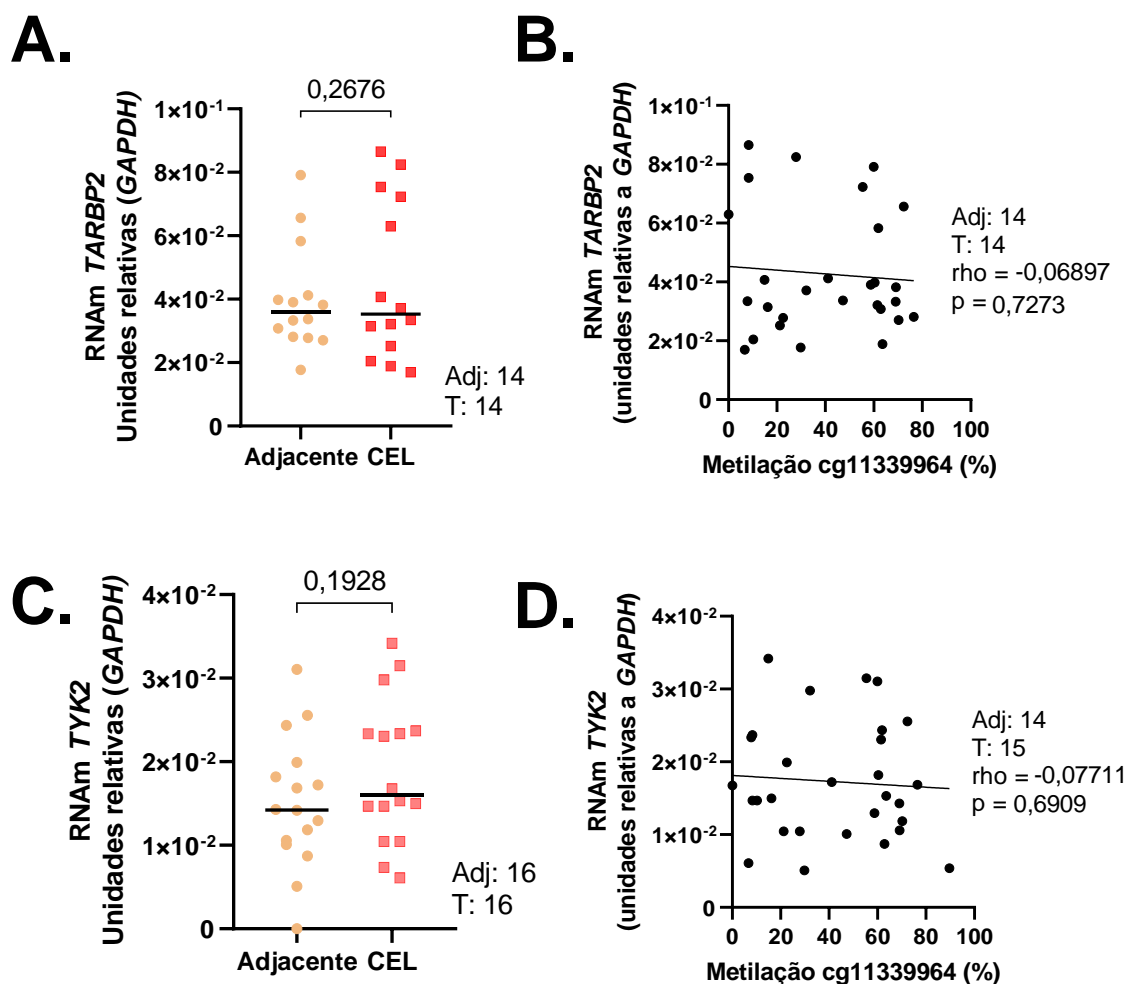


Figura 4.39 – Avaliação da expressão de *TARBP2* e *TYK2* em carcinoma epidermoide de laringe. A e C. Gráficos de pontos mostrando a expressão de *TARBP2* (A) e *TYK2* (C), determinada por PCRq, em CEL e tecido adjacente não tumoral (Adjacente). Teste pareado de Wilcoxon. B e D: Correlação entre os níveis de expressão gênica de *TARBP2* (B) e *TYK2* (D) e os níveis de metilação de cg11339964 em CEL. Teste de Spearman.

Em CEE, *TARBP2* não demonstrou diferença de expressão entre o tecido adjacente não tumoral e o tecido tumoral ($p = 0,9658$) ou correlação com o perfil de

metilação em cg11339964 ($\rho = 0,1177$, $p = 0,6506$) (**Figura 4.40A-B**). *TYK2* apresentou maior expressão no tumor em relação à mucosa adjacente não tumoral ($p = 0,0195$) e uma correlação com o perfil de metilação em cg11339964 ($\rho = -0,5973$, $p = 0,0128$) (**Figura 4.40C-D**).

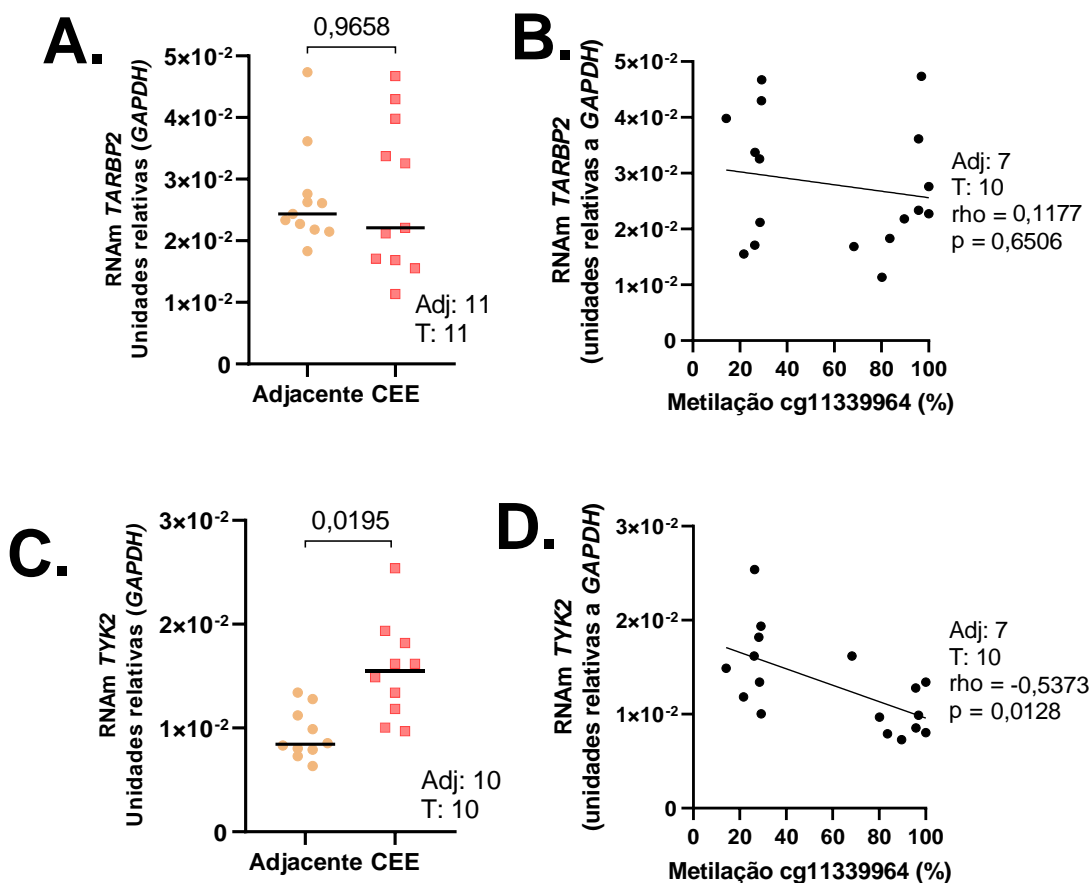


Figura 4.40 – Avaliação da expressão de *TARBP2* e *TYK2* em carcinoma epidermoide de esôfago. A e C. Gráficos de pontos mostrando a expressão de *TARBP2* (A) e *TYK2* (C), determinada por PCRq, em CEE e tecido adjacente não tumoral (Adjacente). Teste pareado de Wilcoxon. B e D: Correlação entre os níveis de expressão gênica de *TARBP2* (B) e *TYK2* (D) e os níveis de metilação de cg11339964 em CEE.

4.6.2 PERFIL DE METILAÇÃO EM cg11339964 COMO REGULADOR DA ATIVIDADE DO RETROVÍRUS ENDÓGENO *MER4A1*

Antes de analisar exclusivamente *MER4A1* anotado da região genômica da sonda cg11339964, verificamos se essa alteração de metilação não seria uma característica comum dessa família de retrovírus endógenos. Nos microarranjos de

metilação realizados em CEE e CECP (CEL e CECO) pelo grupo junto ao microarranjo de metilação de CEOF (GSE38271), o perfil de metilação dos MER4A1 passíveis de análise não seguiram um padrão de metilação, seja entre o tecido adjacente não tumoral e o tumor ou pela exposição aos fatores de risco (**Figura 4.41**).

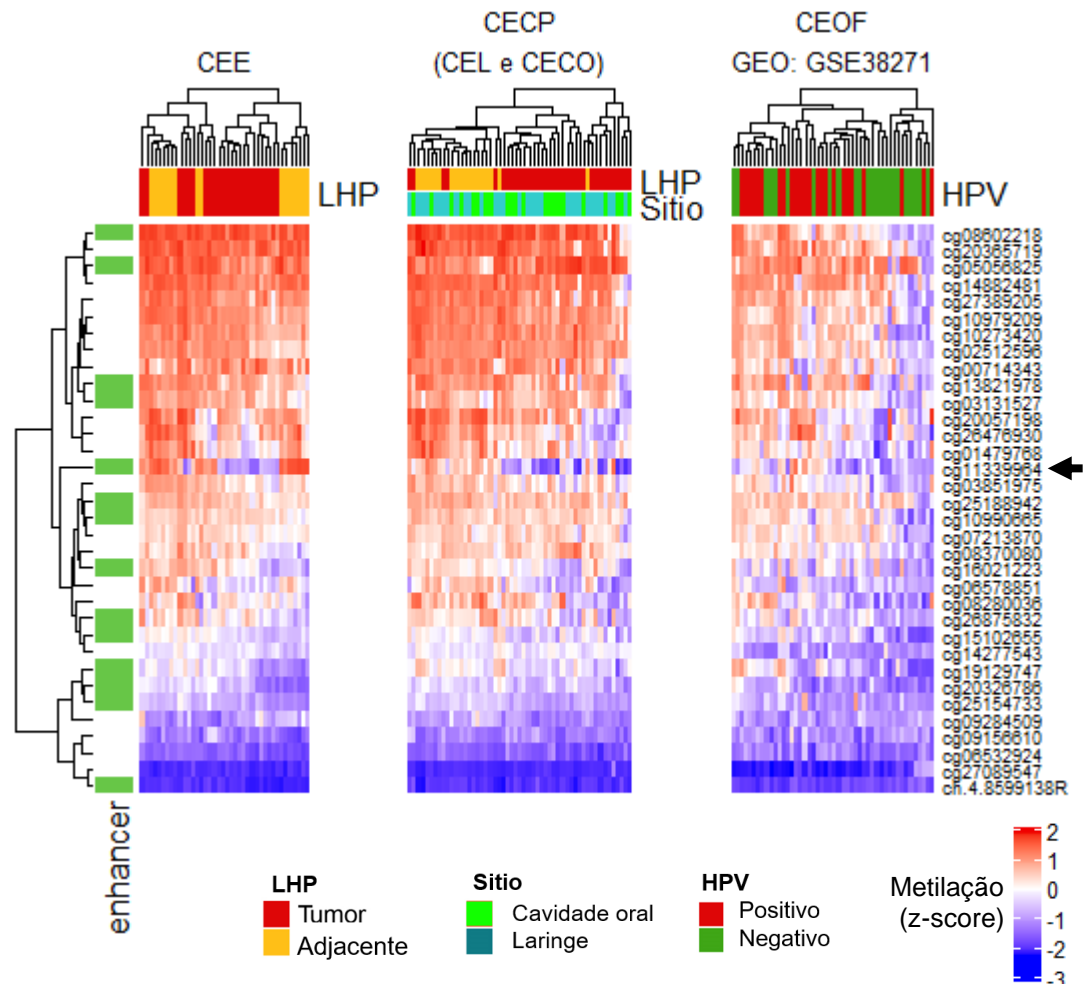


Figura 4.41 – Perfil de metilação de todos os retrovírus endógenos humanos MER4A1 presentes no genoma humano e passíveis de análise pelo microarranjo de metilação nos pacientes de CEE, CEL e CECO do INCA e CEOF (GSE38271). *Heatmap* com clusterização não supervisionada. As sondas dos três heatmaps estão agrupadas pelo perfil de metilação das mesmas no CEE. Seta indica linha correspondente à sonda cg11339964. LHP: Laudo histopatológico.

Em CEE, não foi observada diferença de expressão de MER4A1 entre o tecido adjacente não tumoral e o tumor ($p = 0,5566$), também não encontramos correlação entre os níveis de metilação de cg11339964 e a expressão do elemento ($\rho = 0,1407$, $p = 0,5542$). MER4A1 não mostrou correlação com a expressão de TYK2 ($\rho = 0,1639$, $p = 0,4899$).

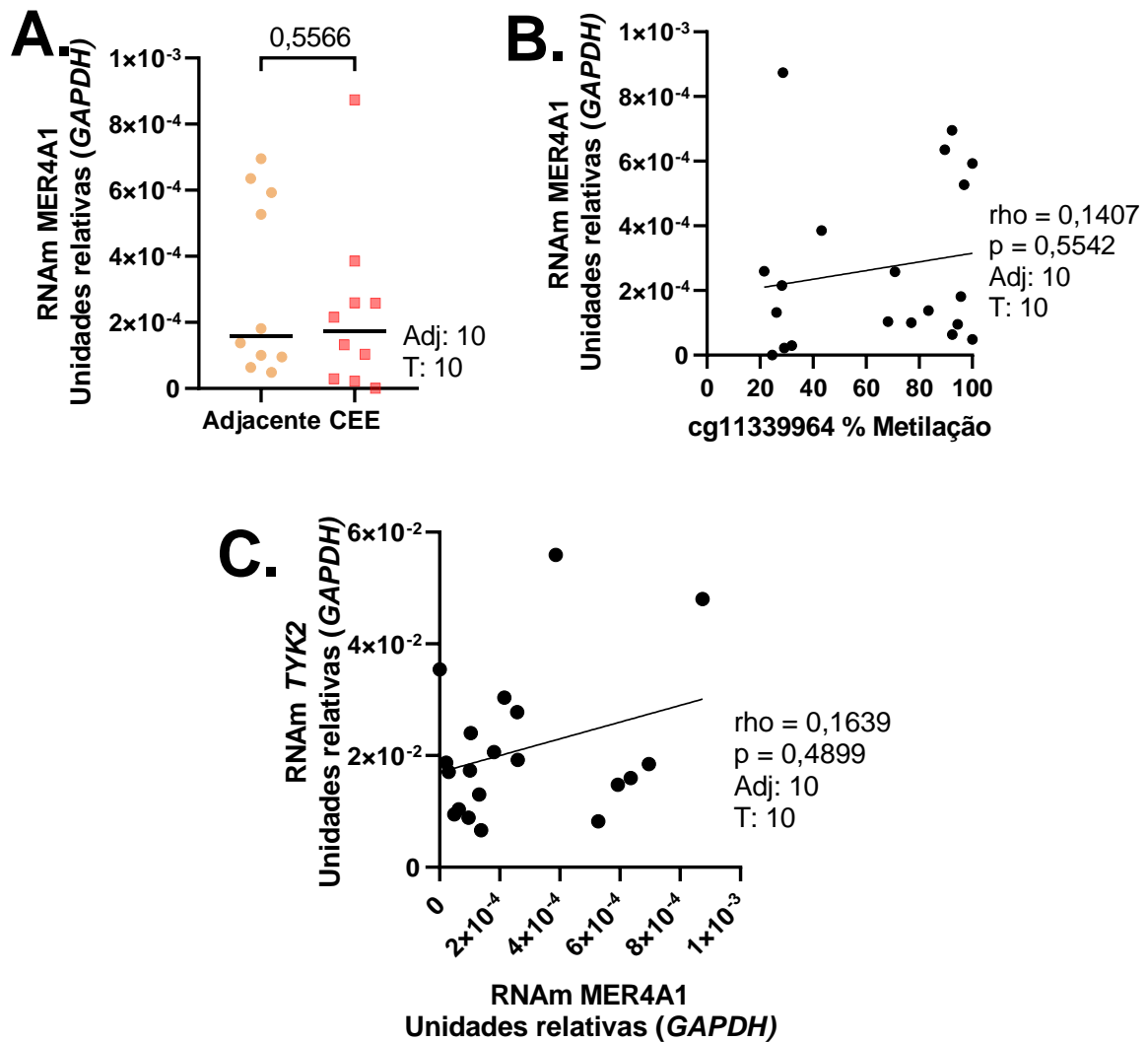


Figura 4.42 – Avaliação da expressão de MER4A1 em carcinoma epidermoide de esôfago. A. Gráfico de pontos mostrando a expressão de MER4A1 no tecido adjacente não tumoral (Adjacente) e no tumor de pacientes com CEE. Teste pareado de Wilcoxon. B. Correlação entre a expressão de MER4A1 e o perfil de metilação de cg11339964 em CEE. Teste de Spearman. C. Correlação entre a expressão de TYK2 e MER4A1 em CEE. Teste de Spearman. Adj: tecido adjacente não tumoral; T: tumor.

5 DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço agrupa tumores de diversos sítios anatômicos que, em sua maioria, acometem a laringe, orofaringe e cavidade oral (DIGIULIO, 2014; ALAM; SIDDIQUI; PERWEEN, 2017; STOYANOV; KITANOVA; DZHENKOV; GHENEV *et al.*, 2017). Mais de 650.000 novos casos são diagnosticados todos os anos com sobrevida de 30-60%, sendo a histologia epidermoide predominante e ocorrendo em até 90% dos casos (GUPTA; JOHNSON; KUMAR, 2016; BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Seus principais fatores de risco são álcool e tabaco, com exceção de um subgrupo de CEOF que se desenvolve pela infecção do HPV (DELEYIANNIS; THOMAS; VAUGHAN; DAVIS, 1996; VAN IMHOFF; KRANENBURG; MACCO; NIJMAN *et al.*, 2016). Uma parcela significativa dos pacientes com CECP apresentam pior prognóstico pela ocorrência de STP, sendo um dos sítios mais acometidos o esôfago (LEÓN; QUER; DIEZ; ORÚS *et al.*, 1999; PRIANTE; CARVALHO; KOWALSKI, 2010; MORRIS; SIKORA; PATEL; HAYES *et al.*, 2011).

Assim como para os CCP, o principal tipo histológico do CE é o epidermoide e surge em decorrência da exposição aos mesmos fatores de risco, álcool e tabaco (ARNOLD; SOERJOMATARAM; FERLAY; FORMAN, 2015). O CEE tem desenvolvimento assintomático e diagnóstico tardio resultando no pior prognóstico da doença com uma sobrevida de 13-22% (DUBECZ; GALL; SOLYMOSI; SCHWEIGERT *et al.*, 2012; ZENG; ZHENG; GUO; ZHANG *et al.*, 2015; TUSTUMI; TAKEDA; KIMURA; SALLUM *et al.*, 2016). A ocorrência de STP metacrônicos ou sincrônicos no TAS pode ser justificada pelo campo de cancerização, termo criado por Slaughter e colaboradores em 1953 para descrever alterações em extensas áreas teciduais pela exposição comum a fatores de risco (SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953). Assim, esses tumores que compartilham o mesmo epitélio de origem e a exposição aos mesmos fatores de risco podem compartilhar diversas características moleculares (BRAAKHUIS; TABOR; KUMMER; LEEMANS *et al.*, 2003).

Alterações epigenéticas emergem como potenciais biomarcadores dessa transformação: são altamente estáveis e tecido-específicas (GARCÍA-GIMÉNEZ; SECO-CERVERA; TOLLEFSBOL; ROMÁ-MATEO *et al.*, 2017). Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é o melhor caracterizado na biologia e câncer. A metilação aberrante é uma característica comum em diversos tumores, incluindo CEE e CECP (LIMA; HERNANDEZ-VARGAS; SIMÃO; DURAND *et al.*,

2011; KOCH; JOOSTEN; FENG; DE RUIJTER *et al.*, 2018). Nesse contexto, um estudo em andamento no grupo identificou que o perfil de metilação de apenas um gene, o *FBXL7*, era capaz de distinguir os CEE do tecido adjacente não tumoral com alta especificidade e sensibilidade. Portanto, avaliamos o potencial de utilização do perfil molecular de *FBXL7* como biomarcador de transformação tecidual, podendo ser aplicado no diagnóstico diferencial da doença.

Pelo CEE apresentar um desenvolvimento assintomático e trazer maior letalidade como tumor primário ou STP (RENNEMO; ZÄTTERSTRÖM; BOYSEN, 2008; CHEN; HUANG; CHAN; CHEN *et al.*, 2010; MWACHIRO; BURGERT; LANDO; CHEPKWONY *et al.*, 2016), buscamos nele a caracterização inicial do nosso biomarcador comparando com o tecido adjacente não tumoral. Verificamos o poder discriminatório de todas as sondas disponíveis no microarranjo de metilação para *FBXL7* e uma delas localizada no corpo do gene, a cg11339964, está hipometilada no CEE apresentando altos valores de sensibilidade (95,83%), especificidade (93,75%) e acurácia (98,18%). Validamos esse achado por uma técnica padrão-ouro para análises de metilação, o pirosequenciamento, nas mesmas amostras desenvolvendo um set de treino e encontramos novamente hipometilação no tumor e semelhantes valores de sensibilidade (87,5%), especificidade (100%) e acurácia (92,19%) a partir do valor de corte < 71,95%.

Como todo biomarcador precisa ser testado após seu desenvolvimento antes da aplicação clínica (STRIMBU; TAVEL, 2010), desenvolvemos um set de validação para *FBXL7*. Avaliamos o perfil de metilação do tecido adjacente não tumoral e do tumor em outros pacientes com CEE por pirosequenciamento. O tumor apresentou hipometilação e obtivemos os valores de 73,08% de sensibilidade, 94,12% de especificidade e 85,0% de acurácia a partir do valor de corte estabelecido no set de treino.

Nos perguntamos se a queda da sensibilidade e especificidade pelos menores níveis de metilação em amostras da mucosa adjacente e maiores níveis no tumor, respectivamente, seria pela presença de subpopulações clonais com diferentes perfis de metilação e o quanto ela realmente representaria toda a massa tumoral (HAO; LIN; DINH; MAYAKONDA *et al.*, 2016). Para responder essa pergunta, realizamos um estudo piloto de heterogeneidade intratumoral, analisando o perfil de metilação em diversas biópsias da mucosa adjacente não tumoral e do CEE do mesmo paciente. Com exceção de um paciente (Pt264), *FBXL7* apresenta uma hipometilação nas

múltiplas regiões tumorais em relação às adjacentes não tumorais dos mesmos pacientes.

Ainda, o perfil de metilação do paciente Pt264 revelou que uma das áreas adjacentes tem nível de metilação semelhante a outras áreas tumorais, levantando duas hipóteses: esse perfil de metilação pode ser resultado de uma contaminação durante o procedimento endoscópico ou em decorrência do campo de cancerização. A contaminação pode estar acontecendo pelo contato do tecido adjacente coletado com a área coletada do tumor (KOMORI; TAKEMASA; YAMASAKI; MOTOORI *et al.*, 2008) durante a trajetória do equipamento pela luz virtual do esôfago, pela não troca do fórceps endoscópico (KINNEY; KOZAREK; RALTZ; ATTIA, 2002) ou, em um caso mais extremo, pelo erro de identificação do tecido (BURKE; MCCAFFREY; MACKLE, 2009; SANAVIO; CARNEVALI; SEVERINI; TOMMOLINI *et al.*, 2019). Um cenário inverso onde o tecido tumoral pode ter sua avaliação afetada devido ao procedimento endoscópico também pode ocorrer, aumentando a taxa de falsos negativos. Essa errônea caracterização molecular (WOJNO; MINUTELLA; MOYLAN; BUSH *et al.*, 2018) de *FBXL7* pelo procedimento endoscópico destaca uma de suas limitações como biomarcador.

Ainda, a hipometilação em algumas amostras no tecido adjacente não tumoral pode indicar uma alteração precoce, caracterizada pelo campo de cancerização resultante da exposição aos fatores de risco e/ou progressão da transformação do epitélio, auxiliando na detecção precoce da doença. No CEE, Lima e colaboradores (2011) (LIMA; HERNÁNDEZ-VARGAS; SIMÃO; DURAND *et al.*, 2011) e Gonzaga e colaboradores (2017) (GONZAGA; LIMA; NICOLAU; NICOLAU-NETO *et al.*, 2017) observaram que o perfil de metilação de *TFF1* antecedia as alterações morfológicas no campo de cancerização. Lee e colaboradores (LEE; WANG; WANG; KO *et al.*, 2011) mostraram que na medida que a intensidade de exposição aos fatores de risco aumentava e o epitélio se transformava, o perfil de metilação dos genes *HOXA9*, *NEFH*, *UCHL1* e *MT1M* era alterado.

Trabalhos desenvolvendo biomarcadores de diagnóstico baseados no perfil de metilação de CEE reportam outros genes potenciais como *PAX1* (sensibilidade: 96%; especificidade: 51%; acurácia: 75%), *SOX1* (sensibilidade: 89%; especificidade: 59%; acurácia: 78%) e *ZNF582* (sensibilidade: 93%; especificidade: 75%; acurácia: 89%) (TANG; LIOU; WAN; TANG *et al.*, 2019) e até painéis com 12 CpGs em diferentes regiões genômicas analisadas (acurácia: 99%) (LI; ZHANG; LIU; SUN *et al.*, 2019).

Um número crescente de estudos também propõe diagnosticar o CEE pela metilação do DNA circulante de origem tumoral (ctDNA) no plasma sanguíneo dos pacientes, como o painel gênico de *RAR-β*, *DAPK*, *CDH1*, *p16* e *RASSF1A* com sensibilidade de 82.2%, especificidade de 100% e acurácia de 91% (LI; WANG; NIU; JIANG *et al.*, 2011). Os valores de discriminação apresentados por *FBXL7* em um único sítio CpG (cg11339964) são semelhantes aos da literatura e futuros trabalhos podem incluir sua avaliação em painéis gênicos e até mesmo em plasma, facilitando o procedimento diagnóstico.

Pelo CEE e CECP terem o mesmo epitélio e etiologia de origem, analisamos o perfil de metilação de *FBXL7* na posição cg11339964 em pacientes de CEL e CECO. Semelhante ao CEE, *FBXL7* estava hipometilado no tecido tumoral em relação ao tecido adjacente não tumoral de ambos os sítios. Experimentamos aplicar o mesmo valor de corte de metilação estabelecido no CEE nos tumores de CEL e CECO e apesar de bons valores de sensibilidade, os valores de especificidade caíram drasticamente. Então, estabelecemos novos pontos de corte de metilação para CEL e CECO, e em ambos, os valores de metilação com maior especificidade e acurácia foram menores que o do CEE. Os novos e menores valores de corte para CEL e CECO podem ser uma questão tecido-específica da própria mucosa não transformada. A mediana de metilação de cg11339964 por pirosequenciamento da mucosa adjacente não tumoral é 95,23% nos pacientes de CEE (set de validação) enquanto nos pacientes de CEL e CECO é 59,21% e 61,09%, respectivamente.

Assim como nos pacientes com CEE, uma parcela das mucosas adjacentes não tumorais do CECP apresenta níveis de metilação baixos, semelhante aos tumores, ressaltando a ocorrência do campo de cancerização e indicando que *FBXL7* pode sofrer uma hipometilação precoce ainda no tecido adjacente não tumoral pela exposição aos fatores de risco ou transformação do epitélio não tumoral. No TAS, lesões precursoras (displasias e leucoplasias) são pouco estudadas em comparação ao tumor primário (TAYLOR; ABNET; DAWSEY, 2013). No CECP, *ZNF282* e *PAX1* são hipermetilados à medida que o epitélio se transforma em lesões precursoras (CHENG; CHANG; LEE; CHEN *et al.*, 2016). Para responder essa pergunta pode ser feita a análise do perfil de metilação de *FBXL7* na mucosa de indivíduos sem tumores, com ou sem exposição ao tabaco e álcool e em lesões precursoras de tumores epidermóides do TAS. Numa análise mais robusta, verificar em indivíduos expostos aos fatores de risco se essa alteração é dose-dependente da exposição ao álcool e

tabaco. Nossa casuística não permitiu a realização desta última pela predominância de tabagistas e/ou etilistas predominantemente pesados, mantendo a dúvida se essa hipometilação nos tumores seria um fenômeno exclusivo da transformação do epitélio ou da exposição aos fatores de risco.

A fim de iluminar essa questão analisamos o perfil de metilação de *FBXL7* na posição genômica de cg11339964 em tumores epidermóides ou relacionados aos mesmos fatores de risco: ADE; adenocarcinoma de pulmão; carcinoma epidermoide de pulmão; carcinoma epidermoide cervical; e CEOF. O principal fator de risco para o ADE é a metaplasia do esôfago de Barrett causada pela DRGE, sendo o álcool e o tabaco fatores secundários (MAO; ZHENG; LING, 2011). No pulmão, ambos adenocarcinoma e carcinoma epidermoide têm como principal fator de risco o tabaco (MALHOTRA; MALVEZZI; NEGRI; LA VECCHIA *et al.*, 2016). Virtualmente, todos os carcinomas epidermóides cervicais têm como agente a infecção por HPV (CROSBIE; EINSTEIN; FRANCESCHI; KITCHENER, 2013) e, como já citado, o CEOF pode se formar pela exposição do álcool e tabaco ou pela infecção pelo HPV.

FBXL7 já apresenta menores níveis de metilação na metaplasia do esôfago de Barrett. No ADE, essa hipometilação é mais evidente, enquanto a exposição ao álcool e tabaco não implica diferenças de metilação no tumor. Nos tumores de pulmão, *FBXL7* está hipometilado em ambos os adenocarcinomas e carcinomas epidermóides, só demonstrando associação com o tabaco no adenocarcinoma. Contudo, o baixo número amostral de não tabagistas no carcinoma epidermoide pode ter inviabilizado a análise. No colo de útero, *FBXL7* não aparenta diferenças de metilação entre o tecido normal, a lesão precursora (CIN3) e o tumor cervical em de ambos trabalhos avaliados. *FBXL7* tanto de pacientes com CEOF do INCA quanto de dados depositados em bancos públicos apresentou hipometilação em tumores não infectados pelo HPV em comparação àqueles infectados.

O mecanismo exato pelo qual os fatores de risco provocam a carcinogênese no TAS e alterações em genes específicos não é completamente conhecido (PEZZUTO; BUONAGURO; CAPONIGRO; IONNA *et al.*, 2015), podendo ter diversas origens como agentes químicos ou biológicos. A carcinogênese química é um processo estocástico, provocando alterações genéticas e epigenéticas nas células, conferindo uma vantagem seletiva de crescimento que, num ponto final, pode levar ao desenvolvimento do câncer (LOEB; HARRIS, 2008). Tumores causados por processos químicos geralmente atingem tecidos com o maior contato com o

carcinógeno, como é o caso do álcool, tabaco e o DRGE no TAS (LOEB; HARRIS, 2008). No tabaco, mais de 70 substâncias capazes de causar câncer já foram descritas (HOFFMANN; HOFFMANN; EL-BAYOUMY, 2001; HECHT, 2002). A produção de espécies reativas de oxigênio e acetaldeído são os principais agentes mutagênicos associados ao álcool, enquanto na DRGE o ambiente pró-inflamatório e a geração de espécies reativas de oxigênio são motores na carcinogênese do ADE (RIEDER; BIANCANI; HARNETT; YERIAN *et al.*, 2010).

Na carcinogênese biológica causada por agentes virais (os chamados vírus tumorais), os mecanismos de ação não estão diretamente ligados à geração direta de danos ao DNA, mas em controlar a maquinaria de divisão celular. Cada vírus orchestra a célula de acordo com seu arsenal genômico de oncoproteínas que controlam o crescimento da célula (COOPER; HAUSMAN, 2000). A carcinogênese pela infecção do HPV vem de suas proteínas E6 e E7 que interferem com as funções das proteínas Rb e p53, respectivamente (NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007).

A hipometilação de genes parece ser predominante após exposição ao tabaco, como nos genes *AHRR* e *F2RL3* (SHENKER; POLIDORO; VAN VELDHOFEN; SACERDOTE *et al.*, 2013; ZEILINGER; KÜHNEL; KLOPP; BAURECHT *et al.*, 2013; ZHANG; YANG; BURWINKEL; BREITLING *et al.*, 2014). A própria assinatura de metilação do tabaco já foi proposta como ferramenta de diagnóstico em tumores do TAS (TESCHENDORFF; YANG; WONG; PIPINIKAS *et al.*, 2015), por exemplo. Diversas diferenças e assinaturas de metilação entre os CECP HPV+ e HPV- já foram propostas e, apesar da boa discriminação entre esses dois grupos, o perfil dentro dos tumores HPV+ é bastante heterogêneo (LECHNER; FENTON; WEST; WILSON *et al.*, 2013; LLERAS; SMITH; ADRIEN; SCHLECHT *et al.*, 2013). Uma característica comum dos CECP-HPV- é sua hipometilação global menos acentuada em comparação aos HPV+ (RICHARDS; ZHANG; BAGGERLY; COLELLA *et al.*, 2009; SARTOR; DOLINOY; JONES; COLACINO *et al.*, 2011; VAN KEMPEN; NOORLAG; BRAUNIUS; STEGEMAN *et al.*, 2014), também visto na nossa casuística de CEOF por BUEXM e colaboradores (2018) pela análise do elemento repetitivo LINE-1. Os pacientes de CEOF do INCA são da mesma casuística deste estudo (BUEXM; LOURENÇO; PINTO, 2018), que não encontrou diferenças nas frequências de exposição ao álcool e tabaco entre os grupos CEOF-HPV- e CEOF-HPV+, ressaltando a necessidade de uma carcinogênese primariamente química para a hipometilação de *FBXL7*. A hipometilação em *FBXL7* nos tumores de CEE e CECP sugeria uma

alteração consequente da transformação do epitélio, contudo as diferenças de metilação de acordo com a infecção pelo HPV no CEOF implicam num mecanismo mais específico de transformação, ligado aos agentes carcinogênicos. Somando a essa hipótese a hipometilação de *FBXL7* no esôfago de Barrett, e sua alteração no campo de cancerização, temos a indicação de um potencial biomarcador de alterações precoces induzidas por carcinogênese química no TAS.

Mesmo afetando milhões de pessoas no mundo anualmente, os CEE e CECP continuam sendo doenças de difícil diagnóstico precoce (ARNAL; ARENAS; ARBELOA, 2015; SPECTOR; FARLOW; HARING; BRENNER *et al.*, 2018) e o desenvolvimento de biomarcadores diferenciados com altíssimo poder discriminatório se faz necessário. O potencial discriminatório de cg11339964 pode complementar o diagnóstico por biópsia endoscópica-histopatológica ou em painéis gênicos. A identificação de uma carcinogênese causada pelo álcool ou tabaco pode auxiliar no tratamento dos pacientes de CEE e CECP na ausência ou dúvida da anamnese e história natural da doença, aumentando a atenção dos profissionais de saúde. Pacientes tabagistas e/ou etilistas tendem a apresentar maior resistência ao tratamento, mais recidivas e piores prognósticos (FORTIN; WANG; VIGNEAULT, 2009; WU; WU; LU; HSU *et al.*, 2013; VAN IMHOFF; KRANENBURG; MACCO; NIJMAN *et al.*, 2016). Assim, a metilação de *FBXL7* pode ter um potencial explorado como indicador precoce de risco de câncer ligado aos fatores de risco (KOTURBASH; BELAND; POGRIBNY, 2011; KUPPUSAMY; KAISER; WESSELKAMPER, 2015) ou trabalhos que necessitem de uma caracterização etiológica da transformação.

Além de seu potencial como biomarcador, *FBXL7* pode atuar como gene supressor de tumor (GST) encaminhando para degradação as oncoproteínas AURKA (COON; GLASSER; MALLAMPALLI; CHEN, 2012) e BIRC5 (LIU; LEAR; IANNONE; SHIVA *et al.*, 2015). Em tumores, existe um padrão de perda de expressão, deleções ou mutações com perda de função nos GST (WANG; WU; RAJASEKARAN; SHIN, 2018). Além disso, o perfil de metilação no GST tem papel fundamental no controle de sua expressão (EHRlich; LACEY, 2013)

Pela utilização da plataforma Ensembl, listamos os transcritos preditos de *FBXL7* e identificamos três isoformas. Na plataforma GTEX, apenas as isoformas principal e terceira apresentam algum nível de expressão detectável na maioria dos tecidos, inclusive na mucosa esofágica. Validamos esses dados em nossas amostras por

PCRq e apenas os níveis da segunda isoforma não foram detectados, excluindo-a de posteriores análises.

A isoforma principal não apresenta diferença de expressão no CEE e CEL comparado com o tecido adjacente dos respectivos sítios. Também não encontramos correlação entre o perfil de metilação na posição genômica de cg11339964 e sua expressão nestes grupos. O perfil de metilação também está ligado ao splicing alternativo até o momento por dois mecanismos principais: controlando a taxa de alongação da RNA polimerase II e recrutando proteínas da maquinaria de splicing (MAOR; YEARIM; AST, 2015). Verificamos, então, se a alteração de metilação estaria alterando a expressão da terceira isoforma, não encontrando diferença de expressão entre o tecido adjacente não tumoral e o CEE, e sem correlação significativa entre a metilação de cg11339964 e sua expressão. No CEL, verificamos uma correlação entre a expressão da terceira isoforma e os níveis de metilação, já sua expressão não apresentou diferença entre a mucosa não tumoral e o CEL. Contudo, o valor de p é limiar e tanto a análise de diferença de expressão quanto de correlação com a metilação carecem de um maior número de amostras.

A perda de metilação no corpo do gene, como observada em nosso *heatmap* de CEE e na posição genômica de cg11339964, normalmente está associada com uma redução da expressão gênica (MENDIZABAL; ZENG; KELLER; YI, 2017). Entretanto, em nossos achados, a metilação do corpo de *FBXL7*, pelo menos na posição avaliada, parece não influenciar suas taxas de transcrição no CEE e CEL. A metilação aberrante em outras regiões de *FBXL7* podem estar relacionadas com sua expressão gênica, como outros sítios CpG do corpo ou região promotora e mais estudos são necessários para avaliar essa regulação (KULIS; ESTELLER, 2010). Além da metilação no gene, outros mecanismos por trás da regulação de *FBXL7* podem incluir modificadores de histonas, RNAs não codificantes e até mesmo a metilação em regiões de *enhancer*.

Uma elevada heterogeneidade dos níveis de RNAm foi observada tanto nos CEE e CEL para as isoformas principal e terceira de *FBXL7*, implicando outros mecanismos de regulação como a alteração no número de cópias (CNA) do gene. CNA no câncer são comuns e, quando ocorrem, tendem a atingir GST com deleções e oncogenes com ampliações (WANG; WU; RAJASEKARAN; SHIN, 2018; ZACK; SCHUMACHER; CARTER; CHERNIACK *et al.*, 2013). O CNA pode afetar o prognóstico e a conduta terapêutica, como a amplificação e superexpressão de HER2 no câncer de mama, ligados à pior sobrevida e direcionador de terapia-alvo (GAJRIA;

CHANDARLAPATY, 2011). Buscamos nos dados do TCGA, pela plataforma cBioPortal, a frequência de CNA de *FBXL7* e sua associação com a expressão em CEE e CECP. A taxa de CNA de *FBXL7* encontrada na casuística do TCGA é semelhante àquela encontrada em nossa casuística e, de forma interessante, *FBXL7* está amplificado na maioria das amostras alteradas, especialmente no CEE. Sua expressão não sofre alteração pelo CNA nas amostras do TCGA. Além disso, seus níveis de RNAm (isoforma principal) determinados por PCRq em nossa casuística não estão associados com as características sociodemográficas, como os fatores de risco álcool e tabaco, ou clínicas, como a sobrevida e estadiamento. A taxa de amplificação do gene e seus níveis de expressão gênica sem associações clínicas levantam a hipótese de uma alteração consequente da transformação, sem impacto na carcinogênese. *FBXL7* é pouco estudado e novos trabalhos podem corroborar esses achados.

Quanto aos fatores de transcrição de *FBXL7*, o único relatado é FOXP1 em câncer gástrico (KAMRAN; LONG; XU; LV *et al.*, 2017). No CEE, a maior expressão nuclear de FOXP1 já foi associada ao melhor prognóstico dos pacientes (WEI; LI; ZHU; YU *et al.*, 2019). AURKA pode interagir a nível proteico com FOXP1, inibindo sua função como fator de transcrição, reduzindo os níveis de expressão de *FBXL7* (KAMRAN; LONG; XU; LV *et al.*, 2017). AURKA contribui para regulação da progressão do ciclo celular participando de eventos críticos da divisão celular, como formação do fuso bipolar mitótico e alinhamento dos cromossomos (NIKONOVA; ASTSATUROV; SEREBRIISKII; DUNBRACK *et al.*, 2013). Esta proteína é comumente superexpressa em diversos tumores e associada a piores prognósticos, inclusive em CEE e CECP (TONG; ZHONG; KONG; DONG *et al.*, 2004; REITER; GAIS; JÜTTING; STEUER-VOGT *et al.*, 2006). AURKA é alvo de ubiquitinação de *FBXL7* na fase de entrada e início da mitose (G2/M), encaminhando a proteína para degradação no proteossoma e causando arresto do ciclo celular (COON; GLASSER; MALLAMPALLI; CHEN, 2012). Outro alvo de ubiquitinação de *FBXL7* é BIRC5, proteína anti-apoptótica superexpressa em diversos tumores epidermóides e ligada a pior prognóstico (LIU; LEAR; IANNONE; SHIVA *et al.*, 2015).

Utilizando a técnica de imuno-histoquímica, buscamos verificar os níveis de *FBXL7* e seus alvos no CEE, CEL e CEOF. A marcação citoplasmática de *FBXL7* é mais frequente no citoplasma e menos frequente no núcleo das células do CEE, indicando uma translocação proteica. No CEL, os níveis de *FBXL7* não são alterados

no citoplasma, mas são reduzidos no núcleo, o que poderia sugerir um mecanismo de degradação nuclear da proteína. Até o momento, o único mecanismo descrito de regulação proteica de FBXL7 é sua ubiquitinação e degradação por FBXL18 (LIU; LEAR; ZHAO; ZHAO *et al.*, 2015), contudo o compartimento celular onde essa regulação estaria acontecendo é desconhecido. No CEOF, FBXL7 está mais expresso no citoplasma sem alterações nucleares. Comparando os três sítios, FBXL7 parece ter um comportamento tecido-específico e mais estudos são necessários para elucidar esses achados.

AURKA apresenta maior frequência de marcação no citoplasma de todos os sítios tumorais e maior frequência de marcação nuclear no CEE e CEOF, sem alterações nucleares no CEL. BIRC5 apresenta maior frequência de marcação citoplasmática no CEE e CEOF, sem alterações no CEL, e maior marcação nuclear apenas no CEOF, sem alterações nucleares nos demais sítios. Considerando a atuação clássica de FBXL7, esperávamos observar uma relação inversa de seu nível proteico com o de seus alvos, mas este fenômeno não ocorreu em nossa casuística. Apenas AURKA e BIRC5 apresentaram correlação significativa de seus níveis, como já descrito (KAMRAN; LONG; XU; LV *et al.*, 2017). Na literatura, a maior expressão de AURKA é relacionada ao aumento de BIRC5, pela inibição da transcrição de FBXL7 por AURKA (KAMRAN; LONG; XU; LV *et al.*, 2017). Contudo, o aumento de AURKA não impactou os níveis de FBXL7, apontando que BIRC5 e AURKA podem interagir de maneira diferente nos tumores do TAS.

A marcação de AURKA independente de FBXL7 pode estar ligada a mudanças na estabilidade da proteína ou interações com outras vias. A serina 51 de AURKA é constantemente fosforilada em CECP, garantindo sua estabilização (KITAJIMA; KUDO; OGAWA; TATSUKA *et al.*, 2007). Especula-se que FBXL7 seja responsável por degradar quantidades limitadas de AURKA, especialmente localizadas nos centrossomos e em momentos específicos do ciclo celular (LINDON; GRANT; MIN, 2016), não causando impacto tão significativo no nível global da proteína. Estabilização de BIRC5 e inibição de sua degradação podem ocorrer pela interação com HSP90 (FORTUGNO; BELTRAMI; PLESCIA; FONTANA *et al.*, 2003). HSP90 está superexpressa em tumores do TAS (HUANG; CHEN; HAN; LI *et al.*, 2014; PATEL; WEN; MAGLIOCCA; MULLER *et al.*, 2014) como CEE (96% dos casos) e sua inibição é proposta como possível terapia (MCLAUGHLIN; BARKER; KHAN; PEDERSEN *et al.*, 2017). Os níveis proteicos de FBXL7 não tiveram associação com

o status de HPV no CEOF, mais uma vez mostrando que a desregulação de sua expressão pode ser uma alteração consequente da transformação e não ligada ao status de metilação em cg11339964.

Em todos os sítios avaliados, os níveis proteicos de FBXL7 não tiveram associação com qualquer característica do tumor, ressaltando que a desregulação de FBXL7 nos tumores do TAS pode ser uma alteração passageira (“*passenger*”). Contudo, a falta de correlação com seus alvos AURKA e BIRC5 pode ter papel sobre a formação e/ou progressão do tumor e futuros trabalhos buscando a regulação tecido-específica de FBXL7 no esôfago e cabeça e pescoço podem esclarecer esse mecanismo. Associações dos níveis proteicos com a exposição ao álcool e tabaco no CEE, CEL e CEOF e com o status HPV no CEOF também não foram encontradas, reforçando que os níveis de metilação em cg11339964 e seu potencial como biomarcador são independentes da expressão e regulação gênica/proteica.

No presente trabalho, a expressão gênica e proteica de FBXL7 não apontaram qualquer associação com características dos pacientes, mas curiosamente a hipometilação em cg11339964 se associa com a pior sobrevida em CEE. Decidimos nos aprofundar em como uma alteração comum nos tumores do TAS e sem associação com a expressão do gene em que reside pode estar ligada ao prognóstico. Analisamos a região correspondente à posição genômica de cg11339964 com ferramentas de bioinformática e descobrimos ser ocupada por um retrovírus endógeno (ERV), o MER4A1, e por uma região de *enhancer*.

Correlacionamos os níveis de metilação na posição genômica de cg11339964 com a expressão de todos os genes avaliada por microarranjo de expressão em trabalho prévio do grupo (dados não publicados), encontrando dois possíveis alvos de regulação: *TYK2* e *TARP2*, ambos superexpressos nos nossos microarranjos de CEE e CEL. *TARBP2* é uma proteína que se liga a RNA envolvida no processamento e maturação de microRNAs (ZHONG; PETERS; LEE; BRAUN, 1999). Sua expressão está elevada em alguns tumores (mama, melanoma e linfoma) e reduzida em outros (tumores gastrointestinais e sarcoma de Ewing), revelando um papel oncogênico ou supressor tumoral dependendo do tipo de tumor (YU; LI, 2016). *TYK2* é membro da família *Janus Kinase* (JAK), ativada em resposta à ligação de citocinas, como interferons (GAMERO; POTLA; WEGRZYN; SZELAG *et al.*, 2006; PRCHAL-MURPHY; SEMPER; LASSNIG; WALLNER *et al.*, 2012) e fatores de crescimento, ativando a família de proteínas transdutoras e ativadoras de transcrição (STAT). Estas

são então translocadas para o núcleo regulando a transcrição de diversos genes relacionados à proliferação, migração, apoptose e resposta imune (WÖSS; SIMONOVIC; STROBL; MACHO-MASCHLER *et al.*, 2019). Níveis de expressão aberrantes de *TYK2* podem levar à transformação celular por ativação constante de *STAT3* (KNOOPS; HORNAKOVA; ROYER; CONSTANTINESCU *et al.*, 2008), e diversos tumores apresentam sua superexpressão (WÖSS; SIMONOVIC; STROBL; MACHO-MASCHLER *et al.*, 2019). Após validação por PCRq, apenas *TYK2* foi encontrado superexpresso e sua expressão foi correlacionada com a metilação em cg11339964 no CEE.

A inibição da metilação do DNA pode ocasionar uma ativação dos ERV e ativação da via de resposta interferon (CHIAPPINELLI; STRISSEL; DESRICHARD; LI *et al.*, 2015). *TYK2* participa da via de resposta a interferon pela infecção de agentes virais (KARAGHIOSOFF; NEUBAUER; LASSNIG; KOVARIK *et al.*, 2000; RAFTERY; STEVENSON, 2017). Com o intuito de avaliar se a maior expressão de *TYK2* seria estimulada pela expressão retroviral de *MER4A1* ou ativação do *enhancer*, analisamos a correlação de ambos. A hipometilação está associada à ativação de retrovírus endógenos no câncer (STONE; CHIAPPINELLI; LI; MURPHY *et al.*, 2017), mas avaliando a expressão de *MER4A1* por PCRq não encontramos diferenças entre o tecido adjacente não tumoral e o tecido tumoral em CEE. Também não encontramos correlação entre a metilação de cg11339964 e a expressão de *MER4A1* nos pacientes com CEE. Por fim, não foi observada uma correlação significativa entre a expressão de ambos, indicando que a ativação do *enhancer* poderia contribuir para a regulação de *TYK2*.

A estrutura do ERV denominada repetição longa do terminal (LTR) *per se* pode desempenhar atividades de *enhancer* (DOMANSKIĀ; AKOPOV; LEBEDEV; NIKOLAEV *et al.*, 2002). Essa função como *enhancer* provida pela LTR tem papel tecido-específico (RUDA; AKOPOV; TRUBETSKOY; MANUYLOV *et al.*, 2004; CHUONG; RUMI; SOARES; BAKER, 2013), parecendo estar mais associada a tecidos com hipometilação (CHUONG; RUMI; SOARES; BAKER, 2013). *Enhancers* em ERVs demonstraram papel regulatório na expressão de interferons, propondo um mecanismo para auxiliar no controle da replicação retroviral (CHUONG; ELDE; FESCHOTTE, 2016). Com base em nossos achados, propomos que essa co-ocupação também pode ser um controle endógeno da célula contra ativação de ERVs, desencadeando maior expressão de genes ligados a resposta antiviral e que esse

mecanismo poderia ser usado de forma oportunista pela célula tumoral. Contudo, mais estudos são necessários para entender essa regulação.

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações moleculares de *FBXL7* nos CEE e CECP e o impacto sobre seus alvos. Identificamos uma hipometilação em *FBXL7* comum a estes tumores e uma região, cg11339964, que pode ser usada como um potencial marcador de transformação do tecido ligada à carcinogênese química. Este foi o primeiro trabalho avaliando os mecanismos moleculares de *FBXL7* nos CEE e CECP.

Como limitações do trabalho e proposta para futuros trabalhos, sugerimos aumentar o número amostral nos grupos de treino para buscar um valor de corte mais acurado para cada sítio, em especial para o CECO, o menos representado no presente trabalho. Apesar dos indícios de alterações precoces apresentados, é necessária a avaliação de amostras de mucosas não tumorais do esôfago e cabeça e pescoço de pacientes sem lesões no TAS e com ou sem exposição aos fatores de risco para caracterização do perfil de metilação de cg11339964 e estabelecimento do campo de cancerização. A expressão gênica de *FBXL7* não está alterada no tumor, ao contrário de sua expressão proteica que sofre alterações no citoplasma e núcleo das células. Assim, procurar entender esse mecanismo de indução da degradação proteica mediada por *FBXL7* pode ser interessante de um ponto de vista biológico e terapêutico já que *FBXL7* parece não interagir de forma canônica com seus alvos. Esse mecanismo pode ter ligações tecido-específicas ou pela própria transformação do epitélio, neste último sugerindo um papel causal na carcinogênese. Estudos funcionais podem ajudar a solucionar essa questão. A hipometilação de cg11339964 está ligada ao pior prognóstico e curiosamente parece estar relacionada à ativação de um *enhancer* contido num ERV que regula a expressão de *TYK2*. Este mecanismo de regulação da expressão gênica ainda não foi descrito em tumores do TAS e poderia auxiliar na elucidação de como a hipometilação global observada em tumores de uma maneira geral pode induzir vias de sinalização específicas em células tumorais.

5.1 CONCLUSÕES

FBXL7 está hipometilado em CEE e CECP em comparação ao tecido adjacente não tumoral, não apresentando alterações de expressão gênica.

FBXL7 está hipermetilado em CEOF-HPV+ em comparação a CEOF-HPV-, indicando que sua hipometilação possa ser causada por uma carcinogênese química.

Os níveis de metilação na posição genômica de cg11339964 em *FBXL7* não estão correlacionados com a expressão do gene em CEE e CEL.

Pacientes com CEE que apresentam menores níveis de metilação de *FBXL7* têm pior prognóstico. Porém, o mesmo não foi observado para CEL ou para a expressão do gene.

CEE apresenta superexpressão citoplasmática de *FBXL7*, *AURKA* e *BIRC5*, enquanto no núcleo, foi observada menor expressão de *FBXL7*, maior expressão de *AURKA* e *BIRC5* não apresentou diferenças. A expressão de *AURKA* foi associada ao sexo dos pacientes.

Em CEL, foi observada maior expressão de *AURKA* no citoplasma e maior expressão de *FBXL7* no núcleo. Associações significativas foram observadas entre a marcação citoplasmática de *FBXL7* e o estadiamento dos pacientes; e entre a expressão citoplasmática de *BIRC5* e o estadiamento.

Em CEOF, *FBXL7*, *AURKA* e *BIRC5* estão superexpressas no citoplasma, enquanto no núcleo apenas *AURKA* e *BIRC5* apresentaram superexpressão. O maior percentual de marcação citoplasmática de *AURKA* foi associada à melhor sobrevida.

FBXL7 parece não regular seus alvos em CEE e CECP.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUET, F.; BARBEIRA, A. N.; BONAZZOLA, R.; BROWN, A. *et al.* The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. **BioRxiv**, p. 787903, 2019.

ALAM, M. S.; SIDDIQUI, S. A.; PERWEEN, R. Epidemiological profile of head and neck cancer patients in Western Uttar Pradesh and analysis of distributions of risk factors in relation to site of tumor. **J Cancer Res Ther**, 13, n. 3, p. 430-435, 2017 Jul-Sep 2017.

ANANTHARAMAN, D.; GHEIT, T.; WATERBOER, T.; ABEDI-ARDEKANI, B. *et al.* Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCAGE study. **J Natl Cancer Inst**, 105, n. 8, p. 536-545, Apr 2013.

ANDERSEN, A. M.; DOGAN, M. V.; BEACH, S. R.; PHILIBERT, R. A. Current and future prospects for epigenetic biomarkers of substance use disorders. **Genes**, 6, n. 4, p. 991-1022, 2015.

ARANTES, L.; DE CARVALHO, A.; MELENDEZ, M.; CARVALHO, A. L. *et al.* Methylation as a biomarker for head and neck cancer. **Oral oncology**, 50, n. 6, p. 587-592, 2014.

ARNAL, M. J. D.; ARENAS, Á. F.; ARBELOA, Á. L. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. **World journal of gastroenterology: WJG**, 21, n. 26, p. 7933, 2015.

ARNOLD, M.; SOERJOMATARAM, I.; FERLAY, J.; FORMAN, D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. **Gut**, 64, n. 3, p. 381-387, 2015.

BABA, Y.; WATANABE, M.; BABA, H. A review of the alterations in DNA methylation in esophageal squamous cell carcinoma. **Surgery today**, 43, n. 12, p. 1355-1364, 2013.

BHAN, A.; DEB, P.; MANDAL, S. S. Epigenetic code: histone modification, gene regulation, and chromatin dynamics. **Gene regulation, epigenetics and hormone signaling. London: Wiley**, 2017.

BHUTANI, N.; BURNS, D. M.; BLAU, H. M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, 146, n. 6, p. 866-872, 2011.

BONNER, J. A.; HARARI, P. M.; GIRALT, J.; AZARNIA, N. *et al.* Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, 354, n. 6, p. 567-578, 2006.

BOONE, P. M.; PATERSON, S.; MOHAJERI, K.; ZHU, W. *et al.* Biallelic mutation of FBXL7 suggests a novel form of Hennekam syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 182, n. 1, p. 189-194, 2020.

BOSCH, J. A.; SUMABAT, T. M.; HAFEZI, Y.; PELLOCK, B. J. *et al.* The Drosophila F-box protein Fbxl7 binds to the protocadherin fat and regulates Dachs localization and Hippo signaling. **Elife**, 3, p. e03383, 2014.

BRAAKHUIS, B. J.; TABOR, M. P.; KUMMER, J. A.; LEEMANS, C. R. *et al.* A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Res**, 63, n. 8, p. 1727-1730, Apr 2003.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018.

BUEXM, L. A.; LOURENÇO, S. Q.; PINTO, L. F. R. **CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DEOROFARINGEEM PACIENTES DO INCA: CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS EMOLECULARES**. 2018. - Programa de Carcinogênese Molecular, INCA, Pós-Graduação em Oncologia.

BULLA, A.; DE WITT, B.; AMMERLAAN, W.; BETSOU, F. *et al.* Blood DNA yield but not integrity or methylation is impacted after long-term storage. **Biopreservation and biobanking**, 14, n. 1, p. 29-38, 2016.

BURKE, N. G.; MCCAFFREY, D.; MACKLE, E. Contamination of histology biopsy specimen-a potential source of error for surgeons: a case report. **Cases journal**, 2, n. 1, p. 7619, 2009.

CAMUZI, D.; DE AMORIM, Í. S. S.; RIBEIRO PINTO, L. F.; OLIVEIRA TRIVILIN, L. *et al.* Regulation is in the air: the relationship between hypoxia and epigenetics in cancer. **Cells**, 8, n. 4, p. 300, 2019.

CAO, W.; WU, W.; YAN, M.; TIAN, F. *et al.* Multiple region whole-exome sequencing reveals dramatically evolving intratumor genomic heterogeneity in esophageal squamous cell carcinoma. **Oncogenesis**, 4, n. 11, p. e175-e175, 2015.

CENCIARELLI, C.; CHIAUR, D.; GUARDAVACCARO, D.; PARKS, W. *et al.* Identification of a family of human F-box proteins. **Current Biology**, 9, n. 20, p. 1177-1173, 1999.

CERAMI, E.; GAO, J.; DOGRUSOZ, U.; GROSS, B. E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. **Cancer Discov**, 2, n. 5, p. 401-404, May 2012.

CHABER-CIOPINSKA, A.; KIPRIAN, D.; KAWECKI, A.; KAMINSKI, M. Surveillance of patients at high-risk of squamous cell esophageal cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, 30, n. 6, p. 893-900, 2016.

CHEN, M.-C.; HUANG, W.-C.; CHAN, C. H.; CHEN, P.-T. *et al.* Impact of second primary esophageal or lung cancer on survival of patients with head and neck cancer. **Oral oncology**, 46, n. 4, p. 249-254, 2010.

CHEN, Y. A.; LEMIRE, M.; CHOUFANI, S.; BUTCHER, D. T. *et al.* Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. **Epigenetics**, 8, n. 2, p. 203-209, Feb 2013.

CHENG, S.-J.; CHANG, C.-F.; LEE, J.-J.; CHEN, H.-M. *et al.* Hypermethylated ZNF582 and PAX1 are effective biomarkers for detection of oral dysplasia and oral cancer. **Oral oncology**, 62, p. 34-43, 2016.

CHIAPPINELLI, K. B.; STRISSEL, P. L.; DESRICHARD, A.; LI, H. *et al.* Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. **Cell**, 162, n. 5, p. 974-986, 2015.

CHIU, H.-W.; CHANG, J.-S.; LIN, H.-Y.; LEE, H.-H. *et al.* FBXL7 upregulation predicts a poor prognosis and associates with a possible mechanism for paclitaxel resistance in ovarian cancer. **Journal of clinical medicine**, 7, n. 10, p. 330, 2018.

CHUONG, E. B.; ELDE, N. C.; FESCHOTTE, C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. **Science**, 351, n. 6277, p. 1083-1087, 2016.

CHUONG, E. B.; RUMI, M. K.; SOARES, M. J.; BAKER, J. C. Endogenous retroviruses function as species-specific enhancer elements in the placenta. **Nature genetics**, 45, n. 3, p. 325, 2013.

COON, T. A.; GLASSER, J. R.; MALLAMPALLI, R. K.; CHEN, B. B. Novel E3 ligase component FBXL7 ubiquitinates and degrades Aurora A, causing mitotic arrest. **Cell cycle**, 11, n. 4, p. 721-729, 2012.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. The Cell: A Molecular Approach. **The Cell. 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates**, 2000.

CROSBIE, E. J.; EINSTEIN, M. H.; FRANCESCHI, S.; KITCHENER, H. C. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, 382, n. 9895, p. 889-899, 2013.

DE OLIVEIRA SANTOS, M. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 64, n. 1, p. 119-120, 2018.

DE STEFANI, E.; BOFFETTA, P.; DENEOPELLEGRINI, H.; RONCO, A. L. *et al.* The effect of smoking and drinking in oral and pharyngeal cancers: a case-control study in Uruguay. **Cancer Lett**, 246, n. 1-2, p. 282-289, Feb 2007.

DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, 445, n. 1-2, p. 2-10, Oct 2013.

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes & development**, 25, n. 10, p. 1010-1022, 2011.

DELEYIANNIS, F. W.; THOMAS, D. B.; VAUGHAN, T. L.; DAVIS, S. Alcoholism: independent predictor of survival in patients with head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst**, 88, n. 8, p. 542-549, Apr 1996.

DIGIULIO, S. Oropharyngeal Cancer Now Most Common Head & Neck Cancer. **LWW** 2014.

DOMANSKIĀ, A.; AKOPOV, S.; LEBEDEV, I.; NIKOLAEV, L. *et al.* Enhancer activity of solitary long terminal repeat of the human endogenous retrovirus of the HERV-K family. **Bioorganicheskaia khimiia**, 28, n. 4, p. 341-345, 2002.

DUBECZ, A.; GALL, I.; SOLYMOSI, N.; SCHWEIGERT, M. *et al.* Temporal trends in long-term survival and cure rates in esophageal cancer: a SEER database analysis. **Journal of Thoracic Oncology**, 7, n. 2, p. 443-447, 2012.

D'ASSORO, A. B.; HADDAD, T.; GALANIS, E. Aurora-A kinase as a promising therapeutic target in cancer. **Frontiers in oncology**, 5, p. 295, 2016.

EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic acids research**, 30, n. 1, p. 207-210, 2002.

EHRlich, M.; LACEY, M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *In: Epigenetic Alterations in Oncogenesis*: Springer, 2013. p. 31-56.

ERPOLAT, O.; GOCUN, P.; AKMANSU, M.; KARAKUS, E. *et al.* High expression of nuclear survivin and Aurora B predicts poor overall survival in patients with head and neck squamous cell cancer. **Strahlentherapie und Onkologie**, 188, n. 3, p. 248-254, 2012.

FARKAS, S. A.; MILUTIN-GAŠPEROV, N.; GRCE, M.; NILSSON, T. K. Genome-wide DNA methylation assay reveals novel candidate biomarker genes in cervical cancer. **Epigenetics**, 8, n. 11, p. 1213-1225, 2013.

FORNO, E.; WANG, T.; QI, C.; YAN, Q. *et al.* Nasal Methylation Panel Accurately Classifies Children by Atopy or Atopic Asthma. *In: A21. ADVANCES IN ASTHMA PATHOGENESIS*: American Thoracic Society, 2019. p. A1060-A1060.

FORTIN, A.; WANG, C. S.; VIGNEAULT, É. Influence of smoking and alcohol drinking behaviors on treatment outcomes of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 74, n. 4, p. 1062-1069, 2009.

FORTUGNO, P.; BELTRAMI, E.; PLESCIA, J.; FONTANA, J. *et al.* Regulation of survivin function by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, n. 24, p. 13791-13796, 2003.

FREEDMAN, N. D.; ABNET, C. C.; LEITZMANN, M. F.; MOUW, T. *et al.* A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *American journal of epidemiology*, 165, n. 12, p. 1424-1433, 2007.

GAJRIA, D.; CHANDARLAPATY, S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert review of anticancer therapy*, 11, n. 2, p. 263-275, 2011.

GAMERO, A. M.; POTLA, R.; WEGRZYN, J.; SZELAG, M. *et al.* Activation of Tyk2 and Stat3 is required for the apoptotic actions of interferon- β in primary pro-B cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281, n. 24, p. 16238-16244, 2006.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L.; SECO-CERVERA, M.; TOLLEFSBOL, T. O.; ROMÁ-MATEO, C. *et al.* Epigenetic biomarkers: Current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 54, n. 7-8, p. 529-550, 2017.

GARROTE, L. F.; HERRERO, R.; REYES, R. M.; VACCARELLA, S. *et al.* Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer*, 85, n. 1, p. 46-54, Jul 2001.

GEBERT, L. F.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20, n. 1, p. 21-37, 2019.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E. *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16–positive and human papillomavirus type 16–negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 100, n. 6, p. 407-420, 2008.

GLINGE, C.; CLAUSS, S.; BODDUM, K.; JABBARI, R. *et al.* Stability of circulating blood-based MicroRNAs—pre-analytic methodological considerations. *PloS one*, 12, n. 2, 2017.

GONZAGA, I. M.; LIMA, S. C. S.; NICOLAU, M. C.; NICOLAU-NETO, P. *et al.* TFF1 hypermethylation and decreased expression in esophageal squamous cell carcinoma and histologically normal tumor surrounding esophageal cells. **Clinical epigenetics**, 9, n. 1, p. 130, 2017.

GROUP, F.-N. B. W. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) resource. 2016.

GUNTINAS-LICHIUS, O.; WENDT, T.; BUENTZEL, J.; ESSER, D. *et al.* Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. **J Cancer Res Clin Oncol**, 136, n. 1, p. 55-63, Jan 2010.

GUPTA, B.; JOHNSON, N. W.; KUMAR, N. Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. **Oncology**, 91, n. 1, p. 13-23, 2016.

HAJIAN-TILAKI, K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. **Caspian journal of internal medicine**, 4, n. 2, p. 627, 2013.

HAO, J.-J.; LIN, D.-C.; DINH, H. Q.; MAYAKONDA, A. *et al.* Spatial intratumoral heterogeneity and temporal clonal evolution in esophageal squamous cell carcinoma. **Nature genetics**, 48, n. 12, p. 1500, 2016.

HARROW, J.; FRANKISH, A.; GONZALEZ, J. M.; TAPANARI, E. *et al.* GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. **Genome research**, 22, n. 9, p. 1760-1774, 2012.

HECHT, S. S. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. **Lancet Oncol**, 3, n. 8, p. 461-469, Aug 2002.

HERCEG, Z.; GHANTOUS, A.; WILD, C. P.; SKLIAS, A. *et al.* Roadmap for investigating epigenome deregulation and environmental origins of cancer. **International journal of cancer**, 142, n. 5, p. 874-882, 2018.

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. **Chemical research in toxicology**, 14, n. 7, p. 767-790, 2001.

HONG, A. M.; MARTIN, A.; CHATFIELD, M.; JONES, D. *et al.* Human papillomavirus, smoking status and outcomes in tonsillar squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, 132, n. 12, p. 2748-2754, Jun 2013.

HUANG, T.; CHEN, S.; HAN, H.; LI, H. *et al.* Expression of Hsp90 α and cyclin B1 were related to prognosis of esophageal squamous cell carcinoma and keratin pearl

formation. **International journal of clinical and experimental pathology**, 7, n. 4, p. 1544, 2014.

HYDE, L. K.; FRISO, S.; CHOI, S.-W. Introduction to Epigenetics. *In: Principles of Nutrigenetics and Nutrigenomics*: Elsevier, 2020. p. 129-139.

ISAYEVA, T.; LI, Y.; MASWAHU, D.; BRANDWEIN-GENSLER, M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. **Head Neck Pathol**, 6 Suppl 1, p. S104-120, Jul 2012.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. **Annu Rev Biochem**, 85, p. 375-404, Jun 2016.

KAMRAN, M.; LONG, Z.; XU, D.; LV, S. *et al.* Aurora kinase A regulates Survivin stability through targeting FBXL7 in gastric cancer drug resistance and prognosis. **Oncogenesis**, 6, n. 2, p. e298-e298, 2017.

KARAGHIOSOFF, M.; NEUBAUER, H.; LASSNIG, C.; KOVARIK, P. *et al.* Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. **Immunity**, 13, n. 4, p. 549-560, 2000.

KARLSSON, A.; JÖNSSON, M.; LAUSS, M.; BRUNNSTRÖM, H. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis of lung carcinoma reveals one neuroendocrine and four adenocarcinoma epitypes associated with patient outcome. **Clinical Cancer Research**, 20, n. 23, p. 6127-6140, 2014.

KARTHIGEYAN, D.; PRASAD, S. B. B.; SHANDILYA, J.; AGRAWAL, S. *et al.* Biology of Aurora A kinase: Implications in cancer manifestation and therapy. **Medicinal research reviews**, 31, n. 5, p. 757-793, 2011.

KATADA, C.; YOKOYAMA, T.; YANO, T.; ODA, I. *et al.* Drinking alcohol, smoking, multiple dysplastic lesions and the risk of field cancerization of squamous cell carcinoma in the esophagus and head and neck region. **Annals of Oncology**, 30, p. v296, 2019.

KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; ROSKIN, K. M. *et al.* The human genome browser at UCSC. **Genome research**, 12, n. 6, p. 996-1006, 2002.

KINNEY, T. P.; KOZAREK, R. A.; RALTZ, S.; ATTIA, F. Contamination of single-use biopsy forceps: a prospective in vitro analysis. **Gastrointestinal endoscopy**, 56, n. 2, p. 209-212, 2002.

KITAJIMA, S.; KUDO, Y.; OGAWA, I.; TATSUKA, M. *et al.* Constitutive phosphorylation of aurora-a on ser51 induces its stabilization and consequent overexpression in cancer. **PloS one**, 2, n. 9, 2007.

KNOOPS, L.; HORNAKOVA, T.; ROYER, Y.; CONSTANTINESCU, S. N. *et al.* JAK kinases overexpression promotes in vitro cell transformation. **Oncogene**, 27, n. 11, p. 1511-1519, 2008.

KOCH, A.; JOOSTEN, S. C.; FENG, Z.; DE RUIJTER, T. C. *et al.* Analysis of DNA methylation in cancer: location revisited. **Nat Rev Clin Oncol**, 15, n. 7, p. 459-466, 07 2018.

KOMORI, T.; TAKEMASA, I.; YAMASAKI, M.; MOTOORI, M. *et al.* Gene expression of colorectal cancer: preoperative genetic diagnosis using endoscopic biopsies. **International journal of oncology**, 32, n. 2, p. 367-375, 2008.

KOTURBASH, I.; BELAND, F. A.; POGRIBNY, I. P. Role of epigenetic events in chemical carcinogenesis—a justification for incorporating epigenetic evaluations in cancer risk assessment. **Toxicology mechanisms and methods**, 21, n. 4, p. 289-297, 2011.

KRAUSE, L.; NONES, K.; LOFFLER, K. A.; NANCARROW, D. *et al.* Identification of the CIMP-like subtype and aberrant methylation of members of the chromosomal segregation and spindle assembly pathways in esophageal adenocarcinoma. **Carcinogenesis**, 37, n. 4, p. 356-365, 2016.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 14, n. 2, p. 467-475, Feb 2005.

KRUPINSKI, E. A. Receiver Operating Characteristic (ROC) Analysis. **Frontline Learning Research**, 5, n. 3, p. 41-52, 2017.

KULIS, M.; ESTELLER, M. DNA methylation and cancer. *In: Advances in genetics*: Elsevier, 2010. v. 70, p. 27-56.

KUMAR, R.; INDRAYAN, A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. **Indian pediatrics**, 48, n. 4, p. 277-287, 2011.

KUPPUSAMY, S. P.; KAISER, J. P.; WESSELKAMPER, S. C. Epigenetic regulation in environmental chemical carcinogenesis and its applicability in human health risk assessment. **International journal of toxicology**, 34, n. 5, p. 384-392, 2015.

LECHNER, M.; FENTON, T.; WEST, J.; WILSON, G. *et al.* Identification and functional validation of HPV-mediated hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. **Genome medicine**, 5, n. 2, p. 15, 2013.

LECHNER, M.; FRAMPTON, G. M.; FENTON, T.; FEBER, A. *et al.* Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. **Genome Med**, 5, n. 5, p. 49, 2013.

LEE, Y. C.; WANG, H. P.; WANG, C. P.; KO, J. Y. *et al.* Revisit of field cancerization in squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract: better risk assessment with epigenetic markers. **Cancer Prev Res (Phila)**, 4, n. 12, p. 1982-1992, Dec 2011.

LEEMANS, C. R.; SNIJDERS, P. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, 18, n. 5, p. 269, 2018.

LEÓN, X.; QUER, M.; DIEZ, S.; ORÚS, C. *et al.* Second neoplasm in patients with head and neck cancer. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, 21, n. 3, p. 204-210, 1999.

LI, B.; WANG, B.; NIU, L.-J.; JIANG, L. *et al.* Hypermethylation of multiple tumor-related genes associated with DNMT3b up-regulation served as a biomarker for early diagnosis of esophageal squamous cell carcinoma. **Epigenetics**, 6, n. 3, p. 307-316, 2011.

LI, D.; ZHANG, L.; LIU, Y.; SUN, H. *et al.* Specific DNA methylation markers in the diagnosis and prognosis of esophageal cancer. **Aging (Albany NY)**, 11, n. 23, p. 11640, 2019.

LIANG, C.; MARSIT, C. J.; MCCLEAN, M. D.; NELSON, H. H. *et al.* Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer research**, 72, n. 19, p. 5004-5013, 2012.

LIGGETT, W. H.; SIDRANSKY, D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. **J Clin Oncol**, 16, n. 3, p. 1197-1206, Mar 1998.

LIM, H.; KIM, D. H.; JUNG, H. Y.; GONG, E. J. *et al.* Clinical significance of early detection of esophageal cancer in patients with head and neck cancer. **Gut Liver**, 9, n. 2, p. 159-165, Mar 2015.

LIMA, S. C.; HERNANDEZ-VARGAS, H.; SIMÃO, T.; DURAND, G. *et al.* Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. **Epigenetics**, 6, n. 10, p. 1217-1227, 2011.

LIMA, S. C.; HERNÁNDEZ-VARGAS, H.; SIMÃO, T.; DURAND, G. *et al.* Identification of a DNA methylome signature of esophageal squamous cell carcinoma and potential epigenetic biomarkers. **Epigenetics**, 6, n. 10, p. 1217-1227, Oct 2011.

LINDON, C.; GRANT, R.; MIN, M. Ubiquitin-mediated degradation of aurora kinases. **Frontiers in oncology**, 5, p. 307, 2016.

LIU, C.; MARIONI, R. E.; HEDMAN, Å. K.; PFEIFFER, L. *et al.* A DNA methylation biomarker of alcohol consumption. **Molecular psychiatry**, 23, n. 2, p. 422-433, 2018.

LIU, Y.; LEAR, T.; IANNONE, O.; SHIVA, S. *et al.* The proapoptotic F-box protein Fbx17 regulates mitochondrial function by mediating the ubiquitylation and proteasomal degradation of survivin. **Journal of Biological Chemistry**, 290, n. 19, p. 11843-11852, 2015.

LIU, Y.; LEAR, T.; ZHAO, Y.; ZHAO, J. *et al.* F-box protein Fbx18 mediates polyubiquitylation and proteasomal degradation of the pro-apoptotic SCF subunit Fbx17. **Cell death & disease**, 6, n. 2, p. e1630-e1630, 2015.

LLERAS, R. A.; SMITH, R. V.; ADRIEN, L. R.; SCHLECHT, N. F. *et al.* Unique DNA methylation loci distinguish anatomic site and HPV status in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 19, n. 19, p. 5444-5455, 2013.

LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer research**, 68, n. 17, p. 6863-6872, 2008.

MALHOTRA, J.; MALVEZZI, M.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. *et al.* Risk factors for lung cancer worldwide. **European Respiratory Journal**, 48, n. 3, p. 889-902, 2016.

MAO, W.-M.; ZHENG, W.-H.; LING, Z.-Q. Epidemiologic risk factors for esophageal cancer development. **Asian Pac J Cancer Prev**, 12, n. 10, p. 2461-2466, 2011.

MAOR, G. L.; YEARIM, A.; AST, G. The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. **Trends in Genetics**, 31, n. 5, p. 274-280, 2015.

MCLAUGHLIN, M.; BARKER, H. E.; KHAN, A. A.; PEDERSEN, M. *et al.* HSP90 inhibition sensitizes head and neck cancer to platin-based chemoradiotherapy by modulation of the DNA damage response resulting in chromosomal fragmentation. **BMC cancer**, 17, n. 1, p. 86, 2017.

MEHRA, R.; SEREBRIISKII, I. G.; BURTNESS, B.; ASTSATUROV, I. *et al.* Aurora kinases in head and neck cancer. **The lancet oncology**, 14, n. 10, p. e425-e435, 2013.

MENDIZABAL, I.; ZENG, J.; KELLER, T. E.; YI, S. V. Body-hypomethylated human genes harbor extensive intragenic transcriptional activity and are prone to cancer-associated dysregulation. **Nucleic acids research**, 45, n. 8, p. 4390-4400, 2017.

MICHAUD, D. S.; LANGEVIN, S. M.; ELIOT, M.; NELSON, H. H. *et al.* High-risk HPV types and head and neck cancer. **Int J Cancer**, 135, n. 7, p. 1653-1661, Oct 2014.

MIRGHANI, H.; BLANCHARD, P. Treatment de-escalation for HPV-driven oropharyngeal cancer: Where do we stand? **Clin Transl Radiat Oncol**, 8, p. 4-11, Jan 2018.

MOREIRA, J.; TOBIAS, A.; O'BRIEN, M. P.; AGULNIK, M. Targeted Therapy in Head and Neck Cancer: An Update on Current Clinical Developments in Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy and Immunotherapies. **Drugs**, 77, n. 8, p. 843-857, May 2017.

MORITA, M.; KUMASHIRO, R.; KUBO, N.; NAKASHIMA, Y. *et al.* Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: epidemiology, clinical findings, and prevention. **International journal of clinical oncology**, 15, n. 2, p. 126-134, 2010.

MORRIS, L. G.; SIKORA, A. G.; PATEL, S. G.; HAYES, R. B. *et al.* Second primary cancers after an index head and neck cancer: subsite-specific trends in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. **Journal of clinical oncology**, 29, n. 6, p. 739, 2011.

MUNOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, 24, p. S1-S10, 2006.

MWACHIRO, M. M.; BURGERT, S. L.; LANDO, J.; CHEPKWONY, R. *et al.* Esophageal squamous dysplasia is common in asymptomatic Kenyans: a prospective, community based, cross-sectional study. **The American journal of gastroenterology**, 111, n. 4, p. 500, 2016.

NAGASE, T.; ISHIKAWA, K.-I.; SUYAMA, M.; KIKUNO, R. *et al.* Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. **DNA Research**, 5, n. 6, p. 355-364, 1998.

NARISAWA-SAITO, M.; KIYONO, T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. **Cancer science**, 98, n. 10, p. 1505-1511, 2007.

NDIAYE, C.; MENA, M.; ALEMANY, L.; ARBYN, M. *et al.* HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Oncol**, 15, n. 12, p. 1319-1331, Nov 2014.

NETWORK, C. G. A. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, 517, n. 7536, p. 576-582, Jan 2015.

NETWORK, C. G. A. R. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. **Nature**, 541, n. 7636, p. 169-175, 2017.

NGUYEN, K. M.; BUSINO, L. The Biology of F-box Proteins: The SCF Family of E3 Ubiquitin Ligases. *In: Cullin-RING Ligases and Protein Neddylation*: Springer, 2020. p. 111-122.

NICIURA, S. C. M.; SARAIVA, N. Z. **Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicacoes para a producao animal ea vegetal**. Embrapa, 2014. 857035357X.

NICOLAU-NETO, P.; DA COSTA, N. M.; DE SOUZA SANTOS, P. T.; GONZAGA, I. M. *et al.* Esophageal Squamous Cell Carcinoma Transcriptome Reveals the Effect of *FOXM1* on Patient Outcome Through Novel PIK3R3 Mediated Activation of PI3K Signaling Pathway. **Oncotarget**, 9, n. 24, p. 16634-16647, Mar 2018.

NIKONOVA, A. S.; ASTSATUROV, I.; SEREBRIISKII, I. G.; DUNBRACK, R. L. *et al.* Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 70, n. 4, p. 661-687, 2013.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 2, n. 1, p. a001008, Jan 2010.

PARK, H.-W.; DAHLIN, A.; TSE, S.; DUAN, Q. L. *et al.* Genetic predictors associated with improvement of asthma symptoms in response to inhaled corticosteroids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 133, n. 3, p. 664-669. e665, 2014.

PATEL, K.; WEN, J.; MAGLIOCCA, K.; MULLER, S. *et al.* Heat shock protein 90 (HSP90) is overexpressed in p16-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma, and its inhibition in vitro potentiates the effects of chemoradiation. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, 74, n. 5, p. 1015-1022, 2014.

PATNAIK, S.; MALLICK, R.; YENDAMURI, S. Detection of microRNAs in dried serum blots. **Nature Precedings**, p. 1-1, 2010.

PEIRÓ-CHOVA, L.; PEÑA-CHILET, M.; LÓPEZ-GUERRERO, J. A.; GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. *et al.* High stability of microRNAs in tissue samples of compromised quality. **Virchows archiv**, 463, n. 6, p. 765-774, 2013.

PENNINGTON, E. J.; ORTEGA, V. E.; AMPLEFORD, E. J.; MOORE, W. C. *et al.* Glucocorticoid pharmacogenetic loci are associated with healthcare utilization in inhaled corticosteroid treated asthma subjects from different ethnic groups. *In: C21. OMICS IN LUNG DISEASE*: American Thoracic Society, 2017. p. A4972-A4972.

PEZZUTO, F.; BUONAGURO, L.; CAPONIGRO, F.; IONNA, F. *et al.* Update on head and neck cancer: current knowledge on epidemiology, risk factors, molecular features and novel therapies. **Oncology**, 89, n. 3, p. 125-136, 2015.

PRCHAL-MURPHY, M.; SEMPER, C.; LASSNIG, C.; WALLNER, B. *et al.* TYK2 kinase activity is required for functional type I interferon responses in vivo. **PLoS One**, 7, n. 6, 2012.

PRIANTE, A. V. M.; CARVALHO, A. L.; KOWALSKI, L. P. Second primary tumor in patients with upper aerodigestive tract cancer. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, 76, n. 2, p. 251-256, 2010.

PRUEGSANUSAK, K.; PEERAVUT, S.; LEELAMANIT, V.; SINKIJCHAROENCHAI, W. *et al.* Survival and prognostic factors of different sites of head and neck cancer: an analysis from Thailand. **Asian Pac J Cancer Prev**, 13, n. 3, p. 885-890, 2012.

PYTYNIA, K. B.; DAHLSTROM, K. R.; STURGIS, E. M. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oral oncology**, 50, n. 5, p. 380-386, 2014.

RAFTERY, N.; STEVENSON, N. J. Advances in anti-viral immune defence: revealing the importance of the IFN JAK/STAT pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 74, n. 14, p. 2525-2535, 2017.

RAPOZO, D. C.; BLANCO, T. C.; REIS, B. B.; GONZAGA, I. M. *et al.* Recurrent acute thermal lesion induces esophageal hyperproliferative premalignant lesions in mice esophagus. **Exp Mol Pathol**, 100, n. 2, p. 325-331, Apr 2016.

REITER, R.; GAIS, P.; JÜTTING, U.; STEUER-VOGT, M. K. *et al.* Aurora kinase A messenger RNA overexpression is correlated with tumor progression and shortened survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Clinical cancer research**, 12, n. 17, p. 5136-5141, 2006.

RELTON, C. L.; HARTWIG, F. P.; DAVEY SMITH, G. From stem cells to the law courts: DNA methylation, the forensic epigenome and the possibility of a biosocial archive. Oxford University Press 2015.

RENNEMO, E.; ZÄTTERSTRÖM, U.; BOYSEN, M. Impact of second primary tumors on survival in head and neck cancer: an analysis of 2,063 cases. **Laryngoscope**, 118, n. 8, p. 1350-1356, Aug 2008.

RICHARDS, K. L.; ZHANG, B.; BAGGERLY, K. A.; COLELLA, S. *et al.* Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. **PLoS One**, 4, n. 3, 2009.

RIEDER, F.; BIANCANI, P.; HARNETT, K.; YERIAN, L. *et al.* Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 298, n. 5, p. G571-G581, 2010.

RODRIGUES-CAMPOS, M.; THOMPSON, B. J. The ubiquitin ligase FbxL7 regulates the Dachous-Fat-Dachs system in Drosophila. **Development**, 141, n. 21, p. 4098-4103, 2014.

RODRIGUEZ, J. M.; MAIETTA, P.; EZKURDIA, I.; PIETRELLI, A. *et al.* APPRIS: annotation of principal and alternative splice isoforms. **Nucleic acids research**, 41, n. D1, p. D110-D117, 2013.

ROOS-MATTJUS, P.; SISTONEN, L. The ubiquitin-proteasome pathway. **Annals of medicine**, 36, n. 4, p. 285-295, 2004.

ROSATO, A.; PIVETTA, M.; PARENTI, A.; IADEROSA, G. A. *et al.* Survivin in esophageal cancer: An accurate prognostic marker for squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma. **International journal of cancer**, 119, n. 7, p. 1717-1722, 2006.

RUDA, V.; AKOPOV, S.; TRUBETSKOY, D.; MANUYLOV, N. *et al.* Tissue specificity of enhancer and promoter activities of a HERV-K (HML-2) LTR. **Virus research**, 104, n. 1, p. 11-16, 2004.

SANAVIO, M.; CARNEVALI, E.; SEVERINI, S.; TOMMOLINI, F. *et al.* Genetic identification of endoscopic biopsies after unnecessary gastrectomy: Case report and medico-legal evaluation. **International journal of surgery case reports**, 59, p. 4-6, 2019.

SARTOR, M. A.; DOLINOY, D. C.; JONES, T. R.; COLACINO, J. A. *et al.* Genome-wide methylation and expression differences in HPV (+) and HPV (-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. **Epigenetics**, 6, n. 6, p. 777-787, 2011.

SERRANO, M.; HANNON, G. J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, 366, n. 6456, p. 704-707, Dec 1993.

SHENKER, N. S.; POLIDORO, S.; VAN VELDHOVEN, K.; SACERDOTE, C. *et al.* Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. **Human molecular genetics**, 22, n. 5, p. 843-851, 2013.

SHOJAEI, F.; YAZDANI-NAFCHI, F.; BANITALEBI-DEHKORDI, M.; CHEHELGERDI, M. *et al.* Trace of survivin in cancer. **European Journal of Cancer Prevention**, 28, n. 4, p. 365-372, 2019.

SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Mol Oncol**, 12, n. 1, p. 3-20, 01 2018.

SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, 6, n. 5, p. 963-968, 1953.

SPECTOR, M. E.; FARLOW, J. L.; HARING, C. T.; BRENNER, J. C. *et al.* The potential for liquid biopsies in head and neck cancer. **Discovery medicine**, 25, n. 139, p. 251, 2018.

STEINAU, M.; SARAIYA, M.; GOODMAN, M. T.; PETERS, E. S. *et al.* Human papillomavirus prevalence in oropharyngeal cancer before vaccine introduction, United States. **Emerg Infect Dis**, 20, n. 5, p. 822-828, May 2014.

STONE, M. L.; CHIAPPINELLI, K. B.; LI, H.; MURPHY, L. M. *et al.* Epigenetic therapy activates type I interferon signaling in murine ovarian cancer to reduce immunosuppression and tumor burden. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114, n. 51, p. E10981-E10990, 2017.

STOYANOV, G. S.; KITANOVA, M.; DZHENKOV, D. L.; GHENEV, P. *et al.* Demographics of Head and Neck Cancer Patients: A Single Institution Experience. **Cureus**, 9, n. 7, p. e1418, Jul 2017.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, 5, n. 6, p. 463, 2010.

SU, Z.; YANG, Z.; XU, Y.; CHEN, Y. *et al.* Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. **Mol Cancer**, 14, p. 48, Feb 2015.

SZYMAŃSKA, K.; HUNG, R. J.; WÜNSCH-FILHO, V.; ELUF-NETO, J. *et al.* Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. **Cancer Causes Control**, 22, n. 7, p. 1037-1046, Jul 2011.

TALUKDAR, F. R.; DI PIETRO, M.; SECRIER, M.; MOEHLER, M. *et al.* Molecular landscape of esophageal cancer: implications for early detection and personalized therapy. **Ann N Y Acad Sci**, 1434, n. 1, p. 342-359, 12 2018.

TANG, L.; LIOU, Y.-L.; WAN, Z.-R.; TANG, J. *et al.* Aberrant DNA methylation of PAX1, SOX1 and ZNF582 genes as potential biomarkers for esophageal squamous cell carcinoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 120, p. 109488, 2019.

TAYLOR, P. R.; ABNET, C. C.; DAWSEY, S. M. Squamous dysplasia—the precursor lesion for esophageal squamous cell carcinoma. AACR 2013.

TESCHENDORFF, A. E.; YANG, Z.; WONG, A.; PIPINIKAS, C. P. *et al.* Correlation of smoking-associated DNA methylation changes in buccal cells with DNA methylation changes in epithelial cancer. **JAMA oncology**, 1, n. 4, p. 476-485, 2015.

TONG, T.; ZHONG, Y.; KONG, J.; DONG, L. *et al.* Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 10, n. 21, p. 7304-7310, 2004.

TOSTO, G.; FU, H.; VARDARAJAN, B. N.; LEE, J. H. *et al.* F-box/LRR-repeat protein 7 is genetically associated with Alzheimer's disease. **Annals of clinical and translational neurology**, 2, n. 8, p. 810-820, 2015.

TUSTUMI, F.; TAKEDA, F. R.; KIMURA, C. M. S.; SALLUM, R. A. A. *et al.* Esophageal carcinoma: Is Squamous Cell Carcinoma different disease compared to adenocarcinoma? A transversal Study in a Quaternary High volume Hospital in Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, 53, n. 1, p. 44-48, 2016.

VAN IMHOFF, L. C.; KRANENBURG, G. G.; MACCO, S.; NIJMAN, N. L. *et al.* Prognostic value of continued smoking on survival and recurrence rates in patients with head and neck cancer: A systematic review. **Head Neck**, 38 Suppl 1, p. E2214-2220, 04 2016.

VAN KEMPEN, P. M.; NOORLAG, R.; BRAUNIUS, W. W.; STEGEMAN, I. *et al.* Differences in methylation profiles between HPV-positive and HPV-negative oropharynx squamous cell carcinoma: a systematic review. **Epigenetics**, 9, n. 2, p. 194-203, 2014.

VERLAAT, W.; SNOEK, B. C.; HEIDEMAN, D. A.; WILTING, S. M. *et al.* Identification and validation of a 3-gene methylation classifier for HPV-based cervical screening on self-samples. **Clinical Cancer Research**, 24, n. 14, p. 3456-3464, 2018.

VERMORKEN, J. B.; MESIA, R.; RIVERA, F.; REMENAR, E. *et al.* Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. **N Engl J Med**, 359, n. 11, p. 1116-1127, Sep 2008.

VIENS, L. J.; HENLEY, S. J.; WATSON, M.; MARKOWITZ, L. E. *et al.* Human Papillomavirus-Associated Cancers - United States, 2008-2012. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 65, n. 26, p. 661-666, Jul 2016.

WANG, L.-H.; WU, C.-F.; RAJASEKARAN, N.; SHIN, Y. K. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 51, n. 6, p. 2647-2693, 2018.

WANG, X.; PANKRATZ, V. S.; FREDERICKSEN, Z.; TARRELL, R. *et al.* Common variants associated with breast cancer in genome-wide association studies are modifiers of breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **Human molecular genetics**, 19, n. 14, p. 2886-2897, 2010.

WEI, Q.; LI, X.; ZHU, Z.; YU, W. *et al.* Expression and prognostic value of FOXP1 in esophageal squamous cell carcinoma. **Pathology-Research and Practice**, 215, n. 12, p. 152645, 2019.

WIENCH, M.; JOHN, S.; BAEK, S.; JOHNSON, T. A. *et al.* DNA methylation status predicts cell type-specific enhancer activity. **The EMBO journal**, 30, n. 15, p. 3028-3039, 2011.

WOJNO, L.; MINUTELLA, C.; MOYLAN, D.; BUSH, A. *et al.* Specimen Provenance Testing Identifies Contamination That Affects Molecular Prognostic Assay Results in Prostate Cancer Biopsy Specimens. **Urology**, 115, p. 87-91, 2018.

WU, I.-C.; WU, C.-C.; LU, C.-Y.; HSU, W.-H. *et al.* Substance use (alcohol, areca nut and cigarette) is associated with poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. **PloS one**, 8, n. 2, 2013.

WYSS, A.; HASHIBE, M.; CHUANG, S. C.; LEE, Y. C. *et al.* Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Am J Epidemiol**, 178, n. 5, p. 679-690, Sep 2013.

WÖSS, K.; SIMONOVIĆ, N.; STROBL, B.; MACHO-MASCHLER, S. *et al.* TYK2: An Upstream Kinase of STATs in Cancer. **Cancers**, 11, n. 11, p. 1728, 2019.

YU, X.; LI, Z. The role of TARBP2 in the development and progression of cancers. **Tumor Biology**, 37, n. 1, p. 57-60, 2016.

ZACK, T. I.; SCHUMACHER, S. E.; CARTER, S. L.; CHERNIACK, A. D. *et al.* Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. **Nature genetics**, 45, n. 10, p. 1134-1140, 2013.

ZEILINGER, S.; KÜHNEL, B.; KLOPP, N.; BAURECHT, H. *et al.* Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. **PloS one**, 8, n. 5, 2013.

ZENG, H.; ZHENG, R.; GUO, Y.; ZHANG, S. *et al.* Cancer survival in China, 2003–2005: A population-based study. **International journal of cancer**, 136, n. 8, p. 1921-1930, 2015.

ZHANG, Y.; YANG, R.; BURWINKEL, B.; BREITLING, L. P. *et al.* F2RL3 methylation in blood DNA is a strong predictor of mortality. **Int J Epidemiol**, 43, n. 4, p. 1215-1225, Aug 2014.

ZHONG, J.; PETERS, A. H.; LEE, K.; BRAUN, R. E. A double-stranded RNA binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. **Nature genetics**, 22, n. 2, p. 171-174, 1999.

ZHOU, G.; LIU, Z.; MYERS, J. N. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. **J Cell Biochem**, 117, n. 12, p. 2682-2692, 12 2016.

ZUBAKOV, D.; BOERSMA, A. W.; CHOI, Y.; VAN KUIJK, P. F. *et al.* MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. **International journal of legal medicine**, 124, n. 3, p. 217-226, 2010.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO I – ARTIGO PUBLICADO PELO AUTOR DURANTE O PERÍODO DE MESTRADO



Review

Regulation Is in the Air: The Relationship between Hypoxia and Epigenetics in Cancer

Diego Camuzi ¹, Ísis Salviano Soares de Amorim ², Luis Felipe Ribeiro Pinto ¹,
Leonardo Oliveira Trivilin ³, André Luiz Mencialha ² and Sheila Coelho Soares Lima ^{1,*}

¹ Programa de Carcinogênese Molecular, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro CEP 20231-050, Brazil; drdcamuzi@gmail.com (D.C.); lfrpinto@inca.gov.br (L.F.R.P.)

² Laboratório de Biologia do Câncer (LABICAN), Departamento de Biofísica e Biometria (DBB), Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro CEP 20511-010, Brazil; isissoares@yahoo.com (Í.S.S.d.A.); almencialha@yahoo.com.br (A.L.M.)

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Espírito Santo CEP 29500-000, Brazil; leotrivilin@gmail.com

* Correspondence: sheilacoelho@gmail.com; Tel.: +55-21-32076520

Received: 23 February 2019; Accepted: 26 March 2019; Published: 1 April 2019



Abstract: Hypoxia is an inherent condition of tumors and contributes to cancer development and progression. Hypoxia-inducible factors (HIFs) are the major transcription factors involved in response to low O₂ levels, orchestrating the expression of hundreds of genes involved in cancer hallmarks' acquisition and modulation of epigenetic mechanisms. Epigenetics refers to inheritable mechanisms responsible for regulating gene expression, including genes involved in the hypoxia response, without altering the sequence of DNA bases. The main epigenetic mechanisms are DNA methylation, non-coding RNAs, and histone modifications. These mechanisms are highly influenced by cell microenvironment, such as O₂ levels. The balance and interaction between these pathways is essential for homeostasis and is directly linked to cellular metabolism. Some of the major players in the regulation of HIFs, such as prolyl hydroxylases, DNA methylation regulators, and histone modifiers require oxygen as a substrate, or have metabolic intermediates as cofactors, whose levels are altered during hypoxia. Furthermore, during pathological hypoxia, HIFs' targets as well as alterations in epigenetic patterns impact several pathways linked to tumorigenesis, such as proliferation and apoptosis, among other hallmarks. Therefore, this review aims to elucidate the intricate relationship between hypoxia and epigenetic mechanisms, and its crucial impact on the acquisition of cancer hallmarks.

Keywords: hypoxia; hypoxia-inducible factors; epigenetics; DNA methylation; histones modifications; cancer hallmarks

1. Microenvironment in Solid Tumors: Hypoxia

Hypoxia is a common feature of solid tumors, associated with tumor progression, resistance to treatment, and poor prognosis. The microenvironment of low oxygen levels arises as a consequence of the tumor cells high proliferation rate, which is often not accompanied by an efficient angiogenesis [1–4].

Cell response to hypoxia is mainly regulated by hypoxia-inducible factors (HIFs), a family of transcription factors involved in coordinating the expression of many genes that allow adaptation of the tumor cell to this hostile environment [2,5,6]. Hypoxia-inducible factors are heterodimeric transcription factors, which can be constituted by one of the three α -subunits that are regulated by oxygen (HIF-1 α , HIF-2 α and HIF-3 α), and a constitutive subunit HIF-1 β (also known as aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) [7–9].

The two types of HIF subunits are classified as basic helix-loop-helix (HLH)-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS) proteins [10]. Alpha subunits are constituted by a DNA-binding domain, which is the basic HLH domain; and two PAS domains (PAS-A and PAS-B), which mediate the interaction with the subunit HIF-1 β . In addition, the N-terminal transactivation domain (N-TAD), found in the oxygen-dependent degradation domain (ODD), where hydroxylation occurs, together with the c-terminal transactivation domain (C-TAD), regulate hypoxia-inducible factors transcriptional activity [11–13]. HIF-1 α and HIF-2 α have both N-terminal and C-terminal TADs, while HIF-3 α has only the N-terminal TAD [14].

HIF-1 α and HIF-2 α are the most commonly studied subunits, whereas the HIF-1 α is the first subunit to respond to hypoxia, and HIF-2 α is stabilized after longer hypoxia periods [15]. Although these two subunits share redundant functions, they also exhibit unique and even opposing activities [6]. For example, by altering the activity of transcription factors such as p53 and MYC, HIF-1 α and HIF-2 α exert different effects on cell proliferation and apoptosis, with HIF-1 α being known to inhibit proliferation and induce apoptosis, whereas HIF-2 α has the opposite effect [6].

On the other hand, HIF-3 α has been described with distinct roles in hypoxia, generally thought to impact negatively by inhibiting HIF-1 α and HIF-2 α . However, it has been suggested that HIF-3 α variants play different roles in regulating gene expression, with stimulating or inhibiting effects depending on stimulus, organism and cellular source [16].

Under normoxic conditions, the hypoxia pathway is inactivated by post-translational modifications. So, in the presence of normal oxygen levels, α subunits proline residues 402 and 564 (HIF-1 α), 405 and 531 (HIF-2 α), and 490 (HIF-3 α) are hydroxylated by the prolyl hydroxylase enzymes (PHDs). Proline modifications are then recognized by Von Hippel–Lindau (VHL) proteins that are substrates for the E3 ubiquitination complex. Thus, α subunits are rapidly degraded by the proteolytic pathway [17,18].

In hypoxia, hydroxylation rates are reduced, and α subunits are stabilized. They translocate to the nucleus, dimerize with HIF-1 β /ARNT, recruit co-activators such as P300/CBP, and bind to hypoxia response elements (HRE) in the DNA consensus sequence [A/G]CGTG localized in the promoter region of target genes [19,20].

Hypoxia-inducible factors' target genes allow tumor cell survival in the hypoxic microenvironment and are involved in regulating pH, angiogenesis, metabolic reprogramming, proliferation, autophagy, apoptosis, redox homeostasis, inflammation, tumor stem cell maintenance, invasion, metastasis and treatment resistance [6,21–23]. For instance, HIF-1 α and/or HIF-2 α induce the expression of genes such as *TGFA* and *CCND1* to stimulate cell cycle progression and proliferation; *BNIP3* to induce apoptosis and autophagy [24]; *GLUT1*, *HK1*, *HK2*, *PFK*, *ALDA*, *PGK1*, and *LDHA* to depict glycolysis; *ADM1* and *VEGF* to promote angiogenesis [25]; *MDR1* [26] and *ABCG2* [27] to confer treatment resistance; and *TWIST* [28] and *MMP2* [29] to stimulate invasion and metastasis.

Apart from their direct effect on gene expression, hypoxia inducible factors and hypoxia microenvironment are also capable of regulating epigenetic mediators. The term “Epigenetics” states for inheritable molecular alterations that affect gene expression without changing the bases in the DNA sequence. However, a broader definition, proposed in the 1940s by Conrad Waddington, emphasizes the importance of the interaction between environment and genes through epigenetic mechanisms to define phenotype [30]. This concept is of major importance in the interplay between hypoxia and epigenetic alterations. In fact, epigenetic mechanisms could be considered as sensors of cell exposure and as effectors of cell fate. Therefore, hypoxia consequences could be sensed by epigenetic mediators and, depending on how these responses are orchestrated, could push cells towards a transformed state. So, cancer hallmarks may be acquired by hypoxia-associated epigenetic alterations, and this association will be the focus of this review, particularly DNA methylation and histone modifications (Table 1).

Table 1. Summary of epigenetics and hypoxia interplay.

| Hypoxia and DNA Methylation | | | | | |
|--|---|-----------------------------------|--|---|-----------|
| Hypoxic or Hypoxic-Like Condition | Epigenetic Modifier/Modification Involved | HIF Involved | Cancer/Cell Type | Functional Impact | Reference |
| 0.5% O ₂ for 24 h | 5hmC | ND | Eleven human and murine cell lines from different normal tissues and tumor types (HepG2, HT-1080, MCF10A, H358, MCF7, Hep3B, LLC, mESC WT, N2a, mES <i>Tet1</i> ^{-/-} and A549) | Decreased 5hmC levels following hypoxia. In MCF7, 5hmC was decreased near transcription start sites of <i>NSD1</i> , <i>FOXA1</i> and <i>CDKN2A</i> | [31] |
| 1% O ₂ for 24 h | DNA methylation | HIF-1 α | Human hepatoma cells (Hep3B) | <i>MAT2A</i> induction; decreased SAM levels; genomic DNA hypomethylation | [32] |
| | | ND | Human hepatoblastoma cells (HepG2) | Increased SAM levels | [33] |
| | | ND | Human cervix adenocarcinoma cells (HeLa) | Decreased SAM levels | [34] |
| In vivo (rats) cerebral hypoperfusion (ischemia) for 90 days | DNMT3A | ND | Brain | Decreased SAM production; higher global methylation levels; higher DNMT3A expression levels | [35] |
| In vitro ischemia for 24 h | DNMTs | ND | Human colorectal carcinoma cells (HCT116) | Decreased DNMTs expression, which may contribute to the low DNA methylation observed in colorectal tumors | [36] |
| 1% O ₂ for 24 h | DNMT1 and DNMT3A | ND | Human hepatoma cells (Hep3B) | Increased DNMTs expression | [32] |
| 2% O ₂ for up to 96 h | DNMT1 | HIF-2 α | Healthy human fetal lung fibroblasts (HFL1) and lung cancer | Increased <i>DNMT1</i> expression; <i>HIF-2α</i> hypermethylation and decreased expression | [37] |
| 3% O ₂ for 24 h | | HIF-1 α and HIF-2 α | Human hepatoma cells (HuH7 and Hep3B) | DNMT1 recruitment to <i>SPRY2</i> promoter and its consequent decreased expression | [38] |
| 1% O ₂ for up to 8 days | DNMT1 and DNMT3B | ND | Human primary cardiac fibroblasts (HCF) | Increased <i>DNMTs</i> expression | [39] |
| 1% O ₂ for 48 h | TET1 | ND | Human neuroblastoma cells (SK-N-BE) | Increased TET1 expression; accumulation of 5-hydroxymethylcytosine in hypoxia-responsive genes | [40] |
| 1% O ₂ for 24 h | TETs | HIF-1 α | Human hepatoma cells (HepG2) | Induced expression of TET enzymes | [41] |
| 1% O ₂ for 24 h | TET1 and TET3 | | Human breast cancer cell lines (MCF7 and MDA-MB-231) and primary breast cancer cells | Global hydroxymethylation; TNF α overexpression and activation of the TNF α -p38-MAPk signaling axis | [42] |
| Normoxia | TET2 | | Human metastatic melanoma cells (WM9) and human glioblastoma cells (T98G) | Reduced TET2 expression | [43] |
| 1% O ₂ for 18 h | TET1 | HIF-1 α and HIF-2 α | Human hypopharynx carcinoma cells (FaDu) and human non-small cell lung cancer cells (derived from lymph node metastasis, H1299) | Increased TET1 expression; regulation of gene expression in response to hypoxia; <i>INSIG1</i> induced expression; promotion of epithelial-mesenchymal transition | [44] |
| <i>VHL</i> deficiency + <i>c-MYC</i> amplification | DNA methylation | HIF-2 α | Human kidney cancer cells (ACHN, RCC10 and 786-O) | HIF-2 α stabilization and <i>PLA2R1</i> repression by promoter hypermethylation | [45] |

Table 1. Cont.

| Hypoxia and Histone Modifications | | | | | |
|--|---|--------------|---|--|-----------|
| Hypoxic or Hypoxic-Like Condition | Epigenetic Modifier/Modification Involved | HIF Involved | Cancer/Cell Type | Functional Impact | Reference |
| In vitro 1% O ₂ for up to 24 h; in vivo (mice) 8% O ₂ | SIRT1 | HIF-1α | Human fibrosarcoma cells (HT1080), human colon cancer cells (HCT116), human embryonic kidney cells (HEK293 and HEK293T) and mice | In normoxia, SIRT1 deacetylates HIF-1α, blocking p300 recruitment, and represses HIF-1α targets. This is reversed in hypoxia, when SIRT1 levels decrease | [46] |
| In vitro 1% O ₂ ; in vivo (Sirt1+/- mice) 6% O ₂ | | HIF-2α | Human hepatoma cells (Hep3B) and mice | Stimulation of HIF-2α activity | [47] |
| 1% O ₂ for 16 h | SIRT2 | | Human cervix adenocarcinoma cells (HeLa) | Increased affinity of HIF-1α by PHD2, after deacetylation by SIRT2; HIF-1α degradation by proteasome | [48] |
| In vitro 1% O ₂ for up to 30 h; in vivo (mice) 10% O ₂ for up to 14 days | SET7/9 and LSD1 | | Human cervix adenocarcinoma cells (HeLa) and mice | Regulation of HIF-1α stability | [49] |
| 1% O ₂ for up to 8 h | LSD1 | | Human embryonic kidney cells (HEK293T), human lung adenosquamous carcinoma cells (NCL-H596), human colon adenocarcinoma cells (Colo-205) and human clear cell renal cell carcinoma cells (RCC4) | Increased HIF-1α stability; glycolysis upregulation | [50] |
| 1% O ₂ for up to 24 h | | | Human lung adenosquamous carcinoma cells (NCL-H596) | Decreased RFK expression, reduced FAD+ levels; HIF-1α degradation. | [50] |
| 1% O ₂ for 24 h | JMJD2B | | Human colorectal cancer cells (SW480 and HCT116) | Increased JMJD expression and proliferation induction; reduced H3K9me3 levels in ELF3 and IP16 | [51] |
| 0.5% O ₂ for 16 h | JMJD1A | HIF-1α | Human clear cell renal cell carcinoma cells (RCC4) and human colon cancer cells (HCT116) | Increased JMJD expression and regulation of hypoxia-inducible genes | [52] |
| In vitro 0.5% O ₂ or chemical hypoxia for up to 18 h; in vivo (rats) 8% O ₂ for up to 12 h | | | Human embryonic kidney cells (HEK293); brain, heart, kidney and liver | Increased JMJD1A expression | [53] |
| 0.5% O ₂ for 16 h | JMJD1A and JMJD2B | | Human prostate cancer cells (LNCaP), human cervix adenocarcinoma cells (HeLa) and human renal adenocarcinoma cells (786-0 RCC) | Increased JMJD expression | [54] |
| | | | Human osteosarcoma cells (U2OS), human breast cancer cells (MCF-7), human cervix adenocarcinoma cells (HeLa), human neuroblastoma cells (IMR32) and human promyelocytic leukaemia cells (HL60) | | [55] |
| 0.1–0.5% O ₂ for up to 72 h; 0.2% O ₂ for 48 h | HATs? TETs? | | Human Burkitt's lymphoma cells (P493-6), mouse embryonic fibroblasts (MEF) and mouse hepatoma cells (Hepa 1–6) | PDK1 activation; blockage of PDH activity; reduced acetyl-CoA synthesis; widespread repression of RNA and mRNA synthesis | [56,57] |

Table 1. Cont.

| Hypoxia and Histone Modifications | | | | | |
|---|---|-----------------------------|---|---|-----------|
| Hypoxic or Hypoxic-Like Condition | Epigenetic Modifier/Modification Involved | HIF Involved | Cancer/Cell Type | Functional Impact | Reference |
| 0.5% O ₂ for up to 48 h | KDM4C | ND | Human glioblastoma cells (SF188), human embryonic kidney cells (HEK293T), mouse embryonic fibroblasts (MEF), human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), mouse bone marrow cells (32D) and mice fetal liver cells (FL5.12) | Increased 2-hydroxyglutarate (2HG) production; KDM4C inhibition, increased H3K9me3 levels | [58] |
| <0.5% O ₂ for up to 4 days | JMJD3, JARID1A and JARID1B | ND | Human lung fibroblasts (IMR-90) | JMJD3 activity is reduced, resulting in increased H3K27me3 levels in p16 promoter; JARID1A and JARID1B activity is also reduced, leading to increased H3K4me3 | [59] |
| 0.5% O ₂ for 16 h | H3ac | HIF-2 α | Primary mice undifferentiated pleomorphic sarcoma cells | Reduced H3ac levels in <i>Hif-2α</i> promoter leads to decreased expression | [60] |
| 0.01% O ₂ for 48 h | H3K4me and H3K9ac | ND | Breast carcinoma cells (MCF-7) | Increased H3K4me1,2,3 and H4K9ac in <i>VEGF</i> promoter leads to transcriptional activation | [61] |
| | H3K4me2,3, H3K9me3 and H3K9ac, LSD1 | HIF-independent | | Reduced H3K4me2,3, increased H3K9me3 and decreased H3K9ac levels in <i>BRCA1</i> and <i>RAD51</i> promoters with a consequent decreased expression | |
| 1% O ₂ for up to 72 h | JMJD1A | ND | Hepatocellular carcinoma cells (PLC, HuH7, and HepC2) | <i>JMJD1A</i> silencing during hypoxia leads to reduced <i>N-cadherin</i> and <i>Twist</i> levels and increased <i>E-cadherin</i> levels | [62] |
| 0.5% O ₂ for up to 24 h | G9a | HIF-1 α -independent | Human lung carcinoma cells (A549), HEK293 and mouse embryonic stem cells (MES) | Higher H3K9me2 levels mediated in part by G9a in <i>MLH1</i> promoter region, decreasing its expression | [63] |
| <10 ppm O ₂ or desferrioxamine mesylate treatment for up to 48 h | Histone acetylation | ND | Mouse fibroblasts (3340) and human cervix adenocarcinoma cells (HeLa) | Decreased MLH1 and PMS2 levels; increased mutation frequency | [64] |
| 1% O ₂ for 24 h | JMJD1A, JMJD2B and JMJD2D | ND | Murine macrophages (RAW264.7) | Increased H3K9me in <i>MCP-1</i> , <i>CCR1</i> and <i>CCR5</i> , reducing their expression | [65] |
| 0.5% O ₂ for 24 h | HDAC2 | ND | Human cervix adenocarcinoma cells (HeLa) | HDAC2 recruitment by NF- κ B leads to <i>MCP-1</i> downregulation | [66] |

Legend: ND, not determined.

2. Hypoxia and DNA Methylation

Cytosine DNA methylation is probably the most commonly studied epigenetic mechanism, usually associated with gene silencing. It consists of the addition of a methyl group to the carbon five of cytosines followed by guanines (CpG sites), reaction catalyzed by DNA methyl-transferases (DNMTs), which depend on the universal methyl donor S-adenosylmethionine (SAM) (Figure 1) [67]. CpG sites are spread along the whole genome, but in some specific regions, such as gene promoters and repetitive elements, a high frequency of these dinucleotides is found, characterizing the CpG islands. In general, DNA methylation in these regions is associated with transcription silencing, either by the recruitment of other proteins, as methyl-binding domain proteins (MBDs) and histone modifiers, or by the inhibition of transcription factors binding to DNA [68,69].

However, DNA methylation is a dynamic process and methyl marks can be removed by both passive and active demethylation pathways. In the first case, DNA methylation is lost during replication because of an ineffective copy of methyl marks into the newly synthesized strand. The active pathway (Figure 1), by comparison, is dependent on an orchestrated sequence of oxidation or deamination enzymatic reactions. Ten-Eleven Translocation (TETs) enzymes, dependent on alpha-ketoglutarate and oxygen, are the major players in the oxidative pathway and catalyze the conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine, which can be further oxidized, forming 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. The last two bases are not recognized as normal by the base excision repair (BER) machinery, are removed from the DNA strand, and finally replaced by a non-methylated cytosine [67,70].

The deamination pathway is controlled by the AID/APOBEC (Activity Induced Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like) family of enzymes that can deaminate 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine to form thymine and 5-hydroxymethyluracil, respectively, generating a mispairing between these bases and guanine. This is recognized by the BER machinery, which removes the mispaired base to bring back a non-methylated cytosine [67,70].

Whereas in normal cells promoter-associated CpG islands are usually demethylated and repetitive regions are hypermethylated (and consequently silenced), the inverse profile is observed in tumor cells, with global genomic hypomethylation and hypermethylation of tumor suppressors, which contributes to both carcinogenesis and tumor progression. In solid tumors, hypoxia may be able to promote this aberrant DNA methylation profile [31,71]. Thienpont et al. [31] showed that oxygen shortage leads to a reduced TET activity (without decrease in *TET* expression), resulting in tumor suppressor gene promoter hypermethylation. Furthermore, the hypermethylated genes were functionally grouped into cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis, as well as suppressor genes of glycolysis, angiogenesis and metastasis.

Hypoxia-inducible factors can also act directly on the regulation of DNA methylation mechanism. Liu and colleagues [32] showed that hypoxia reduces the level of the universal methyl donor, S-adenosylmethionine (SAM), causing hypomethylation of genomic DNA in hepatoma cells. Although the mechanisms are not clear, the authors observed that hypoxia induces *MAT2A* (methionine adenosyltransferase) expression through HIF-1 α , which results in the increase of the enzyme activity and a decrease in SAM production, thus inducing genomic DNA demethylation. This is intriguing since *MAT2A* is one of the enzymes responsible for SAM synthesis and, therefore, the induction of its expression was expected to result in higher SAM levels. Based on this, the authors hypothesize that SAM could be consumed for polyamine biosynthesis or the different kinetic of *MAT* isoforms could play a role. Furthermore, SAM inhibits *MAT2A* activity [72]. Lower SAM levels have also been observed in the brain of rats after chronic cerebral hypoperfusion, although higher global methylation levels were detected [35]. In contrast, Hermes et al. [33] observed the opposite—increased SAM levels following hypoxia in HepG2 hepatoma lineage. In 2005, the same group showed that hypoxic HeLa cells present decreased SAM levels [34]. Taking these data into consideration, new studies should be performed to elucidate the effects of hypoxia on SAM levels in hepatic and other tumor cell types, since it might be cell-dependent. Notwithstanding, if it is proved that the hypoxic microenvironment can affect the levels of the methyl donor, its effects on the transcriptome will gain another layer of complexity, not only based on HIFs activity, but also on global DNA and histone methylation.

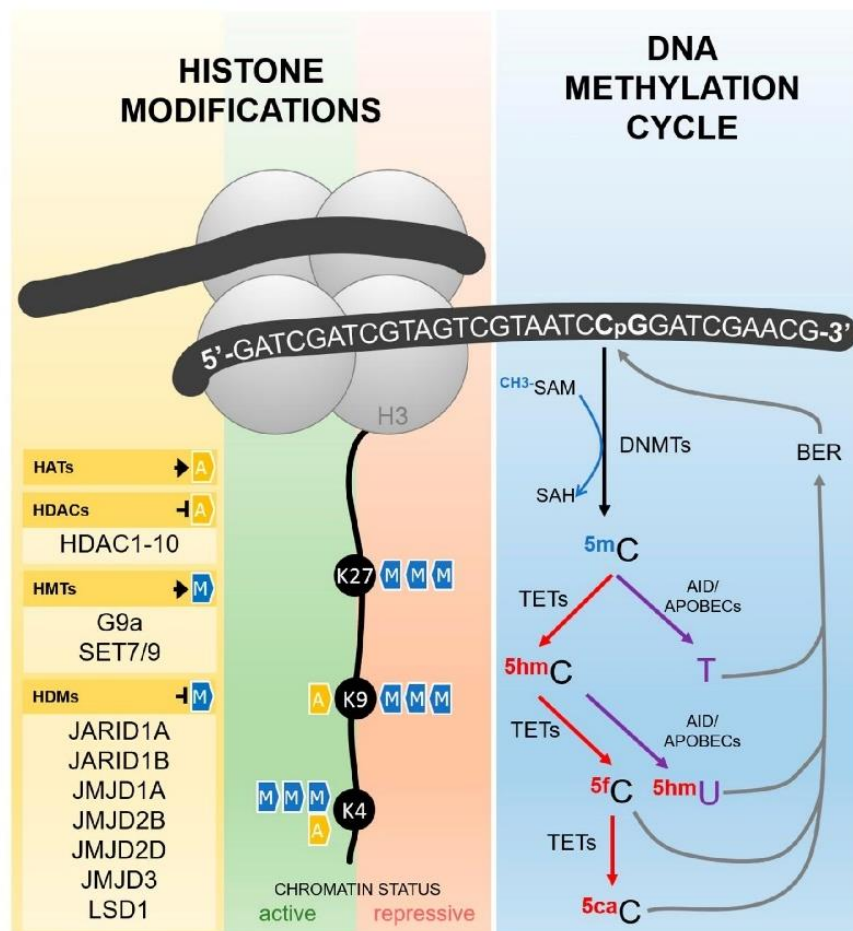


Figure 1. Epigenetic mediators involved in the establishment and erasure of histone post-translational modifications and DNA methylation, as described in the text. Histone acetyltransferases (HATs) are responsible for the transfer of an acetyl group to different histone amino acid residues, including lysines 4 and 9 (K4 and K9). Histone deacetylases (HDACs) catalyze the removal of this group. Methyl groups can also be added to different amino acids in the tails of the histones by histone methyltransferases (HMTs) and removed by histone demethylases (HDMs). Histone acetylation always results in an active chromatin status, while the effects of histone methylation depends on the number of groups added and the amino acid residue involved. As exemplified in the figure, H3K27me3 and H3K9me3 are repressive marks, while H3K4me3 is an active mark. DNA methylation takes place more frequently in cytosines followed by guanines in the so-called CpG sites, reaction catalyzed by DNA-methyltransferases (DNMTs) using S-adenosylmethionine (SAM) as methyl donor. The erasure of DNA methylation can be driven by an active pathway, either by sequential oxidations or deamination. In the oxidation pathway (depicted in red), Ten-eleven translocation enzymes (TETs) catalyze the conversion of 5-methylcytosine (5mC) in 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), which is further oxidized to form 5-formylcytosine (5fC) and 5-carboxylcytosine (5caC). Both 5fC and 5caC are recognized by the base excision repair (BER) machinery and removed from the DNA strand, resulting in the reincorporation of a non-methylated cytosine. In the deamination pathway (depicted in purple), 5mC and 5hmC can be deaminated by AID/APOBEC (Activity Induced Deaminase/Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Polypeptide-like) family of enzymes, generating thymine and 5-hydroxymethyluracil (5hmU), respectively. The mispairing of these bases with guanine in the opposite strand activates the BER machinery and results in the reincorporation of a non-methylated cytosine. G9a: histone methyltransferase G9a; SET7/9: histone-lysine N-methyltransferase SETD7; JARID: Jumonji/ARID Domain-Containing Protein; JMJD: Jumonji Domain-Containing Protein; LSD1: Lysine-specific demethylase 1; SAH: S-adenosylhomocysteine.

In addition, Skowronski et al. [36] observed that hypoxia and hypoglycemia cause DNMTs downregulation in human colorectal carcinoma cells, which may contribute to the pattern of low DNA methylation observed in colorectal tumors. However, Liu et al. [32] observed that hypoxia induced the expression of DNMT1 and DNMT3A in Hep3B hepatoma cells.

In human primary cardiac fibroblasts, Watson et al. [39] showed that the increased activity of *DNMT1* and *DNMT3B* promoters in hypoxia is regulated by HIF-1 α . Likewise, hypoxia-induced HIF-2 α induced DNMT1 expression, which promoted HIF-2 α promoter hypermethylation and decreased its mRNA expression, functioning as a negative feedback mechanism for HIF-2 α regulation in healthy human fetal lung fibroblasts [37].

Apart from HIFs' effects on DNMTs expression, HIFs can also recruit these enzymes to specific gene regions and affect the transcription of important genes for tumorigenesis. The protein Sprouty 2 (SPRY2) is known to attenuate tyrosine kinase receptor signaling, and acts as a tumor suppressor. In addition, SPRY2 protein levels are often reduced in several cancers, such as liver, lung, prostate and breast, which is associated with poor prognosis and shorter survival [73–76]. To elucidate the mechanisms involved in SPRY2 downregulation, Gao et al. [38] employed the Hep3B hepatoma cells. This study showed that HIF-1 α and HIF-2 α facilitate DNA methylation mediated by DNMT1 in the regulatory region of *SPRY2*, leading to its decreased expression [38].

Mariani et al. [40] showed an increase in TET1 expression, mediated by HIF-1 α , resulting mainly in the accumulation of 5-hydroxymethylcytosine in hypoxia-responsive genes, and the induction of the hypoxia response transcriptional program in neuroblastoma. These data indicated an interaction between epigenetic mechanisms and hypoxia-inducible factors in the regulation of gene expression related to hypoxia. Similarly, Lin et al. [41] indicated that hypoxia regulates DNA methylation by increasing HIF-1 α -mediated *TET* expression in hepatocellular carcinoma cell, HepG2.

In addition, Wu et al. [42] indicated that hypoxia, through HIF-1 α , enhanced the expression of TET1 and TET3 enzymes, leading to increased global hydroxymethylation. In this context, the authors also observed TNF α overexpression and activation of the TNF α -p38-MAPk signaling axis, which contributed to the acquisition of breast tumor-initiating cell characteristics.

However, Fischer and Miles, [43] have observed that TET2 expression was reduced by the action of HIF-1 α on WM9 human metastatic melanoma cells and T98G glioblastoma cells. The same study showed that HIF-1 α silencing reverted *TET2* downregulation and increased ascorbic acid-induced TET2-dependent 5-hydroxymethylation. They further suggested that the combined use of HIF-1 inhibitor and ascorbic acid may promote the re-expression of methylated tumor suppressors and may be useful in antitumor therapy.

Finally, Tsai et al. [44] suggested that hypoxia, through HIF-2 α , upregulates *TET1* expression, which acts as a co-activator of HIF-1 α and HIF-2 α , contributing to the regulation of gene expression in response to hypoxia, including the promotion of epithelial-mesenchymal transition. Furthermore, they demonstrated that TET1, acting as a coactivator, increased the expression of the main regulator of cholesterol biosynthesis, *INSIG1* (insulin induced gene 1), mediated by HIF-2 α . Knockdown of *TET1* and *INSIG1* reduced hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT). These data showed a new role of TET1 enzyme as a cofactor of HIF-1 α and HIF-2 α and an association between HIF-2 α , TET1, *INSIG1* and hypoxia induced-EMT.

Based on these data, we may conclude that the hypoxic phenotype is at least partially mediated by DNA methylation alterations, depending on both the modulation of SAM's availability and the regulation of enzymes involved in DNA methylation and demethylation by HIFs. In the context of cancer, this link contributes to the establishment of a recurrent tumor epigenotype, involving both global DNA hypomethylation and tumor suppressor hypermethylation. Therefore, DNA methylation alterations induced by hypoxia may play a pivotal role in tumorigenesis.

3. Hypoxia and Histone Modifications

Histones are conserved proteins involved in DNA packing and play a central role in regulating accessibility to genomic information through chromatin remodeling. This process is coordinated by

a long list of post-translational alterations, which includes acetylation, methylation, sumoylation, phosphorylation, among others, and it is crucial for the regulation of gene expression and DNA repair [77]. Different enzymes are responsible for writing and erasing these post-translational marks (Figure 1), but they can also modify non-histone proteins, such as HIFs, altering their stability. In addition, hypoxia regulates both the activity and expression of these enzymes, which could have a global impact on gene expression profiles.

Sirtuins (SIRT) are a family of NAD⁺-dependent deacetylases that regulate transcription by inducing heterochromatin formation following the deacetylation of histone tails, but have also been shown to play a central role in the regulation of key transcription factors, functioning both as oncogenes and tumor suppressor genes [78]. For instance, the deacetylation of p53 at lysine residue 382 by SIRT1 leads to a reduction of its transcriptional activity [79]. Complementary, SIRT1 may also act as a tumor suppressor by deacetylating HIF-1 α lysine 674, blocking p300 recruitment and repressing HIF-1 α targets [46]. The same deacetylase has been shown to stimulate HIF-2 α activity [47]. Other SIRTs have been shown to regulate HIF-1 α stability. SIRT2-mediated deacetylation of HIF-1 α increases its affinity for prolyl hydroxylase 2, which hydroxylates HIF, inducing its degradation by the proteasome [48]. However, the association between SIRTs and hypoxia is not a one-way street.

SIRT activity is directly dependent on NAD⁺ levels; therefore, these enzymes are considered sensors of the cellular redox state. Severe hypoxia increases NADH/NAD⁺ ratios [80], possibly as a consequence of oxidative phosphorylation (OXPHOS) inhibition. In this context, hypoxia would reduce SIRTs activity, leading to a positive feedback by increasing HIF-1 α stability and activity. Thus, these deacetylases could represent one of the links between hypoxia and cancer. In agreement with this hypothesis, decreased SIRT1 levels have been observed in *BRCA1*-mutated breast cancers [81]. In addition, *SIRT2* downregulation was reported in glioma, hepatocarcinoma, esophageal and gastric adenocarcinomas [82,83], while small cell lung carcinoma [84], breast cancer and leukemia [85] present lower levels of *SIRT4*. Other SIRTs are also dysregulated in cancer (for a review, access [86]), but it is not clear what comes first during the carcinogenesis process, the inhibition of these enzymes by the hypoxia-associated reduction of NAD⁺ levels, the increased HIF-1 α stability and activity resulting from SIRT downregulation, or even if other mechanisms are involved. For example, a hypoxic-like phenotype is induced during ageing, one of the strongest risk factors associated with cancer development, with a reduction of NAD⁺ levels. This leads to a reduction of SIRT1 activity, with a consequent HIF-1 α stabilization [87]. Either way, evidence points to a strong association between sirtuins and metabolism, consequently hypoxia, and such association should be further explored in cancer, including their potential as new tumor therapy targets.

Other histone-modifying enzymes are also directly linked to HIF-1 α protein stability and involved in the promotion of tumor growth. Kim et al. [49] have shown in an in vivo model that non-canonical post-translational modifications in HIF-1 α determine the protein's fate. Methylation of HIF-1 α by SET7/9 (Histone-lysine N-methyltransferase SETD7) marks the protein for degradation, even in the nucleus. The demethylation process was catalyzed by lysine-specific demethylase 1 (LSD1). Mice carrying *HIF-1A* S28Y and R30Q mutations were shown to be resistant to HIF-1 α methylation, resulting in protein stabilization. In these mice, the implantation of Lewis lung carcinoma cells showed higher tumor growth [49].

LSD1, a FAD-dependent demethylase, removes mono- and dimethyl marks from histone 3, inducing transcriptional disturbances dependent on the affected amino acid residue (lysine 4 or 9) [88]. While H3K4me and H3K4me2 are associated with active transcription, H3K9me2 is a repressive mark [89]. Apart from its role in chromatin regulation and HIF-1 α demethylation, LSD1 is capable of augmenting HIF-1 α stability, both in normoxia and hypoxia, via an oxygen-independent pathway, but dependent on its demethylase activity. LSD1 demethylates RACK1K271me2, which then fails to bring the Elongin C-containing E3 ubiquitin ligase complex to HIF-1 α , avoiding its proteasomal degradation [50]. Therefore, in the early stages of normoxia and hypoxia, LSD1 plays a role in upregulating glycolysis via HIF-1 α stabilization. Consistent with this, LSD1 upregulation is observed

in hematological and solid tumors [90]. However, during prolonged hypoxia, FAD^+ levels decrease as a consequence of the diminished expression of riboflavin kinase (RFK) and flavin adenine dinucleotide synthetase 1 (FLAD1), leading to impaired LSD1 activity and consequent HIF-1 α degradation [50]. This strong correlation between LSD1-promoted demethylation and HIF-1 α levels is further reinforced by observations in human samples. In triple-negative breast cancer, both hypoxia pathway signature and the average expression of LSD1 target genes are associated with a poor prognosis [50,91]. Therefore, LSD1 inhibitors are currently in clinical trials involving different tumor types, such as acute myeloid leukemia, small cell lung carcinoma, prostate cancer, among others [90].

Histone demethylases from the Jumonji Domain-Containing (JMJD) family of proteins have also been suggested to play a role in the interplay between hypoxia and epigenetics. Wellmann et al. [53] showed in human embryonic kidney cells (HEK-293) and human microvascular endothelial cells (HMEC-1) that hypoxia and hypoxia mimetic agents induce *JMJD1A* expression, which is abrogated after *HIF-1A* silencing [53]. The authors further showed that *JMJD1A* promoter harbors a hypoxia responsive element, enabling its induction by HIF-1 α both in vitro and in vivo. HIF-1 α is also able to bind to *JMJD2B* promoter, inducing its expression [54]. The regulation of JMJD proteins by hypoxia was also evaluated in other human cancer cell lines (U2OS, MCF7, HeLa, IMR32 and HL60), confirming the induction of *JMJD1A* and *JMJD2B* [55]. *JMJD2B* upregulation by HIF-1 α during hypoxia has been linked to the modulation of hypoxic gene expression, and to increased cell proliferation [51]. Furthermore, the regulation of a subset of hypoxia-inducible genes, including *ADM* and *GDF15*, has been shown to be dependent on *JMJD1A* in renal cell and colon carcinoma cell lines, reinforcing the connection between hypoxia, HIF-1 α and JMJD-mediated chromatin remodeling [52].

Acetyl-CoA, the fuel of tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle, is the universal donor for acetylation reactions in a cell. Therefore, the activity of histone acetyl-transferases (HATs) is highly dependent on the concentrations of this intermediate. HATs transfer an acetyl group to histone tails, especially to lysine residues, annulling their positive charge and causing a weaker interaction with the DNA molecule, with a consequent euchromatin formation [92]. In hypoxic conditions, the stabilization of HIF-1 complex leads to activation of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), blocking pyruvate dehydrogenase (PDH) activity. As a consequence, acetyl-CoA synthesis from pyruvate is impaired [56]. In this context, it is reasonable to hypothesize that a global reduction of histone acetylation would take place in hypoxic microenvironments, inducing a heterochromatin state. In fact, a widespread repression of RNA and mRNA synthesis is induced by hypoxia [57], although the reduction of HAT activity cannot be pointed at as the sole cause. As previously mentioned, the activity of other histone modifiers is modulated during O_2 deprivation by NAD^+ and FAD^+ altered levels and, to add more complexity to this scenery, the activity of some histone demethylases can be limited by α -ketoglutarate availability.

Alpha-ketoglutarate (or 2-oxoglutarate) is a rate-limiting intermediate of the TCA cycle, which plays an important role in cellular energy metabolism, protein synthesis modulation, immune system homeostasis, among others [93]. As previously mentioned, it is a cofactor of TET enzymes, involved in the active demethylation process, but it is also a cofactor of JMJD. During hypoxia, α -ketoglutarate and the following citrate production through oxidative metabolism of glucose is reduced, but α -ketoglutarate levels are actually increased. In these conditions, α -ketoglutarate is produced from glutamine metabolism, and it goes through reductive carboxylation to form citrate, which supports cytosolic macromolecular synthesis, enabling cell proliferation even in a hypoxic microenvironment [94]. Therefore, TETs and JMJDs could have enough α -ketoglutarate available to catalyze their reactions. However, the increase in α -ketoglutarate levels during hypoxia is followed by an increase of 2-hydroxyglutarate (2HG) production by lactate dehydrogenase A in cells with wild-type *IDH1* and *IDH2*. 2-hydroxyglutarate has been considered an oncometabolite, since it can block tumor cell differentiation, maybe because of its potential inhibition of α -ketoglutarate-dependent enzymes such as TETs and JMJDs [58,94]. Indeed, 2HG produced during hypoxia is sufficient to induce the spreading of histone repressive marks, including H3K9me3 [58].

4.1. Unbalanced Proliferation

Cell cycle is controlled by cyclins and cyclin-dependent kinases (CDK), the latter being directly inhibited by specific inhibitors (cyclin-dependent kinase inhibitors, CDKI). The cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A (CDKN2A^{INK4A} or p16) is responsible for monitoring the cell during the progression of G1/S and through oncogenic stimuli leads to cell senescence [103]. Alterations of p16 are found in several tumors, both downregulation and upregulation [104], and p16 protein expression is also used as a biomarker of the oncogenic Human Papillomavirus 16 (HPV16) infection, particularly in oropharyngeal tumors [105].

In human lung fibroblasts, Raf reduces H3K27me3 repressive marks present in the *p16* gene by the activation of a *p16* locus-specific demethylase, JMJD3, causing its activation. However, even if recruited to the *p16* locus, during hypoxia, the activity of the enzyme JMJD3 is reduced by O₂ deprivation, its substrate, resulting in increased H3K27me3 levels [59]. However, despite the increase in the repressive mark, the expression of *p16* is not affected. Other analyses pointed to a bivalent chromatin state where, in addition to the increase of the repressive trimethylation in H3K27, there is also an increase in the activation trimethylation in H3K4 by the inhibition of the demethylases JARID1A and JARID1B, also caused by the reduced O₂ levels [59]. Thus, showing a role of bivalent chromatin in the regulation of cell cycle checkpoints during hypoxia. However, this phenotype is controversial, since *p16* can be downregulated during hypoxia in mesenchymal stem cells, pointing to a tissue-specific regulation [106]. In both cases, however, non-tumoral cell lineages were used as models, raising the question of how *p16* expression would be modulated in tumor cells in hypoxic conditions.

Proliferation pathways have been shown to be altered by DNA methylation mechanisms during hypoxia. The *c-MYC* proto-oncogene is dysregulated in a series of tumors and is linked to increased proliferation and apoptosis evasion, having hypoxia-inducible factors as partners or antagonists in several processes [107]. So, while HIF-1 α antagonizes *c-MYC*-induced proliferation, HIF-2 α increases it by potentiating the oncogenic effect of *c-MYC* in an in vitro model with *VHL*-deficient renal cell carcinoma [108]. One of the oncogenic mechanisms resulting from this HIF-2 α and *c-MYC* interaction may be epigenetic changes in target suppressor genes. *PLA2R1* (*Phospholipase A2 Receptor 1*) is a potential tumor suppressor gene with a few known functions, but its increased expression has been linked to cell cycle arrest and apoptosis induction [109]. Renal cell carcinomas with *VHL* deficiency and *c-MYC* amplification exhibit HIF-2 α stabilization and *PLA2R1* repression by promoter hypermethylation. In vitro treatment with the DNMT inhibitor and DNA demethylating agent 5-azadeoxycytidine restored *PLA2R1* expression [45].

In contrast, in an in vivo model of sarcoma, HIF-1 α is active, whereas HIF-2 α has its expression inhibited. When cells are treated with Vorinostat, an inhibitor of histone deacetylases class I and II (HDAC1-10), HIF-2 α expression is restored, without changes in HIF-1 α levels. In these cells, the restoration of HIF-2 α plays a tumor suppressor role, inhibiting the mTORC1 pathway and promoting a decrease in cell proliferation and tumor growth [60]. These differences suggest that the role of hypoxia-inducible factors in the regulation of cell proliferation might be dependent on the tumor type.

4.2. Angiogenesis

The main player of angiogenesis is the vascular endothelial growth factor (VEGF), regulating the creation of new vessels and vascularization of new tissues, allowing nutrient and O₂ supply. In tumors, when cell growth overcomes that of healthy tissues, a hypoxia microenvironment is created, and VEGF can be stimulated independently or directly by hypoxia-inducible factors [110,111]. Breast carcinoma cells in hypoxia (0.01% O₂) exhibit increased methylation in H3K4 and acetylation in H3K9, both activation marks, in *VEGF* promoter region [61]. Furthermore, some studies with in vitro or in vivo models have shown that treatment with deacetylase inhibitors can inhibit *VEGF* expression and thus angiogenesis by restoring the expression of HIF-1 α suppressors such as *VHL* and *PHD* [112,113].

4.3. Metastasis and Invasion

Hypoxia is a double-edged sword, whereas low O₂ levels induce the death of several tumor cells, the hypoxia-resistant cells exhibit a more invasive and metastatic phenotype [97]. In melanomas, the loss of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), caused by decreased expression of TETs and of isocitrate dehydrogenases (*IDH1* and *IDH2*), the latter coding for the enzymes that produce α -ketoglutarate, is a hallmark of this tumor, particularly to differentiate between melanomas and benign melanocytic nevi [114,115].

HIF-1 α knockdown in a metastatic melanoma cell line, is followed by an increase in TET2 gene and protein levels. These cells, when supplemented with ascorbic acid (cofactor of TETs enzymes), show higher 5hmC levels, which are also observed in glioblastoma cell lines [43]. TET2 overexpression and the consequent increase in 5hmC levels decrease melanoma cell invasion in murine models [114]. Thus, targeting HIF-1 α along with ascorbic acid supplementation may be a therapeutic option.

As previously mentioned, HIF-1 α increases the transcription of *JMJD1A* and *JMJD2B* in malignant cell lines, such as prostate adenocarcinoma, cervical cancer [54], and clear cell renal carcinoma [52]. Increased expression of *JMJD1A* is related to the induction of the expression of several genes linked to invasion [52]. In addition, *JMJD1A* nuclear expression is associated with tumor stage and lymph node metastasis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma [116]. The regulation of *JMJD2B* in a HIF-1 α -dependent manner during hypoxia increases the invasiveness of colorectal cancer cells by reducing the levels of the repressive mark H3K9me3 in genes like *ELF3* (*E74-like ETS transcription factor 3*) and *IFI6* (*Interferon Alpha Inducible Protein 6*) [51]. *ELF3* overexpression is involved in the metastasis process in non-small cell lung cancer [117] and its expression can be a useful biomarker of lymph node metastasis in colorectal cancer [118], while *IFI6* promotes metastasis in breast cancer cells [119].

JMJD1A is found overexpressed in hepatocellular carcinomas and is related to higher recurrence rates [62]. During hypoxia in vitro, the expression of the epithelial marker *E-cadherin* is reduced, followed by increased levels of the mesenchymal markers *N-cadherin* and *Twist*. *JMJD1A* silencing during hypoxia leads to a reduction of *N-cadherin* and *Twist*, along with increased *E-cadherin* levels [62].

4.4. Genomic Instability

DNA damage is readily sensed and usually corrected by the DNA repair machinery in a normal cell in order to avoid the accumulation of mutations. Among the types of damage, double-strand breaks are a major source of stress and DNA repair system impairments can result in genomic instability, including changes in nucleic acid sequences, chromosomal rearrangements or aneuploidy. *BRCA1* and *RAD51* are classical proteins involved in double-strand break repair through homologous recombination [120] and both proteins have high clinical relevance for breast cancer [121,122].

Breast carcinoma cells submitted to hypoxia (0.01% O₂) showed a decrease in H3K4 methylation (H3K4me_{2,3}), associated with increased transcriptional activity in *BRCA1* and *RAD51* promoter regions, and, therefore, presented a decreased expression of these genes. In these cells, it was verified whether this demethylation could be performed by the demethylases *JARID1A*, *JARID1B* and *LSD1*; however, only *LSD1* was involved. Furthermore, the suppressor marker H3K9me₃ was increased in the promoter region of *BRCA1* and *RAD51*. There was also a decrease of H3K9 acetylation, a marker present in transcriptionally active regions. Interestingly, for both genes, the demethylation of H3K4 was performed independently of HIF-1 α expression [61].

MLH1 and *PMS2* are tumor suppressor proteins that form a heterodimer involved in DNA mismatch repair [123]. During hypoxia, an increased expression of the histone methyltransferase G9a (G9a) is observed, which is related to global and localized increase of the suppressor mark H3K9me₂. Under these conditions, higher H3K9me₂ levels are detected in the promoter region of *MLH1*, decreasing its expression [63]. Interestingly, cells treated with histone deacetylase inhibitors during hypoxia have restored *MLH1* levels. Although *PMS2* mRNA expression is not altered during hypoxia,

there is a drop in its protein levels. These cells with MLH1 and PMS2 impairment during hypoxia have their repair system affected, resulting in increased mutagenesis and genomic instability [64].

4.5. Immune Modulation

Cells from the immune system act as guardians actively looking for invaders and altered cells causing the elimination of these in order to maintain body homeostasis. On the other hand, after immune escape and tumor establishment, a subversion of the immune system occurs, altering the expression of cytokines that will work in support of the tumor [124]. During this review, we observed how hypoxia influences the epigenome of malignant cells and vice versa, now we will discuss how the same phenomenon can be observed in immune cells.

During hypoxia, the expression of the demethylases *JMJD1A*, *JMJD2B* and *JMJD2D* tends to increase in macrophages possibly as a mechanism to compensate for the low activity of these enzymes due to O₂ deprivation. Despite their increased gene expression, an overall increase in H3K9 and H3K36 methylation is observed [65], with phenotypes similar to those observed in tumors [52]. Increased H3K9 methylation affects target cytokine genes, as *monocyte chemoattractant protein-1* (*MCP-1*, also known as *CCL2*), *CC Motif Chemokine Receptor 1* (*CCR1*) and *CC Motif Chemokine Receptor 5* (*CCR5*), reducing their gene expression [65]. Similarly, in HeLa cells, *MCP-1* gene expression is also reduced during hypoxia [66].

MCP-1 and *IL-8* possess NF-kappaB (NF-κB) responsive elements in their promoters. However, during hypoxia, *MCP-1* expression is suppressed, while *IL-8* expression is induced. Interestingly, NF-κB interacts with both genes, but, at low O₂ levels, NF-κB promotes *IL-8* transcription, and in *MCP-1* it acts as a repressive factor, recruiting HDAC2 to its promoter region [66]. The increase in NF-κB expression is common in several tumors and is related to increased malignancy [125], the same applies to its transcriptional target *IL-8* [126]. NF-κB also directly regulates HIF-1α and HIF-1β gene expression, resulting in upregulation of several hypoxia-like genes [127–129].

4.6. Resistance to Cell Death

In healthy tissues, the balance between proliferation, differentiation and cell death is critical to maintaining the individual's homeostasis. Evading apoptosis is a key step during carcinogenesis and progression. The ability to bypass the mechanisms of cell death is directly related to resistance to treatment and malignancy [130–132].

Euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 2 (EHMT2/G9a) regulates H3K9me2 and is found overexpressed in several tumor cell lines during hypoxia [63]. The expression of G9a confers resistance to chemotherapy [133] and the pharmacological inhibition of G9a induces apoptosis in tumor cells [134,135]. Nonetheless, the connection between G9a and hypoxia on tumor progression is poorly understood.

BCL-2 interacting protein 3 (BNIP3) is an HIF target gene, involved in apoptosis and autophagy pathways [136], and its expression is increased during hypoxia in several cell lines by direct HIF-1α activation [137]. On the contrary, in hypoxic tumor cells, the *BNIP3* promoter can be hypermethylated, resulting in its silencing regardless of HIF-1α expression. Treatment with DNA demethylating agents and, interestingly not with HDAC inhibitors, restores its expression [138]. The regulation of *BNIP3* during tumor hypoxia is poorly understood and further studies are needed to understand its causal effect.

5. Final Considerations

Although different studies have tried to elucidate the impact of hypoxia on epigenetic programming, much is left to be learned. Nevertheless, the epigenetic machinery is an important hypoxia sensor, and copes with hypoxia-inducible factors to depict the hypoxic phenotype. However, modulation of epigenetic mediators' expression by these transcription factors makes evident a highly complex regulation mechanism. Indeed, the levels of many cofactors and radical donors for reactions catalyzed

by epigenetic regulators are affected during hypoxia and have shown to exert a global effect on gene expression.

One of the clearest consequences of the exposure to a hypoxic environment is the metabolic switch from oxidative phosphorylation (OXPHOS) to glycolysis, and not surprisingly, one of the proposed cancer hallmarks is exactly this switch. In this context, epigenetic alterations can both play a role in the establishment of this phenotype, and be affected by it, indicating a central role of epigenetics in the acquisition of this cancer hallmark associated with hypoxia. Although epigenetic alterations have also been associated with the acquisition of other cancer hallmarks, only more recently an association with hypoxia has been proposed, as made evident by the information gathered here.

Furthermore, data presented in this review suggest hypoxia-epigenetics interaction might be tissue-specific and dependent on other factors, such as oxygen deprivation duration. Although such a highly complex interaction is observed during carcinogenesis and tumor progression, modulation of specific players such as histone modifiers presents promising results in cancer cell control in vitro. This highlights the potential of alterations of this regulatory axis to be used as biomarkers of tumor aggressiveness as well as therapeutic targets.

Acknowledgments: We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Bridge from the Swiss Private Banking Community to International Cancer Research (Swiss Bridge) for the financial support of our research and for covering the costs of open access publishing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Evans, S.M.; Koch, C.J. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans. *Cancer Lett.* **2003**, *195*, 1–16. [[CrossRef](#)]
2. Vaupel, P.; Harrison, L. Tumor hypoxia: Causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* **2004**, *9* (Suppl. 5), 4–9. [[CrossRef](#)]
3. Bertout, J.A.; Patel, S.A.; Simon, M.C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 967–975. [[CrossRef](#)]
4. Petrova, V.; Annicchiarico-Petruzzelli, M.; Melino, G.; Amelio, I. The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis* **2018**, *7*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1998**, *8*, 588–594. [[CrossRef](#)]
6. Keith, B.; Johnson, R.S.; Simon, M.C. HIF1 α and HIF2 α : Sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *12*, 9–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Wang, G.L.; Jiang, B.H.; Rue, E.A.; Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 5510–5514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Tian, H.; McKnight, S.L.; Russell, D.W. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 72–82. [[CrossRef](#)]
9. Gu, Y.Z.; Moran, S.M.; Hogenesch, J.B.; Wartman, L.; Bradfield, C.A. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expr.* **1998**, *7*, 205–213. [[PubMed](#)]
10. Bersten, D.C.; Sullivan, A.E.; Peet, D.J.; Whitelaw, M.L. bHLH-PAS proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 827–841. [[CrossRef](#)]
11. Jiang, B.H.; Rue, E.; Wang, G.L.; Roe, R.; Semenza, G.L. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 17771–17778. [[CrossRef](#)]
12. Jiang, B.H.; Zheng, J.Z.; Leung, S.W.; Roe, R.; Semenza, G.L. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19253–19260. [[CrossRef](#)]
13. O'Rourke, J.F.; Tian, Y.M.; Ratcliffe, P.J.; Pugh, C.W. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein 1: Comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2060–2071. [[CrossRef](#)]

14. Hara, S.; Hamada, J.; Kobayashi, C.; Kondo, Y.; Imura, N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: Suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **2001**, *287*, 808–813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Koh, M.Y.; Lemos, R.; Liu, X.; Powis, G. The hypoxia-associated factor switches cells from HIF-1 α - to HIF-2 α -dependent signaling promoting stem cell characteristics, aggressive tumor growth and invasion. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 4015–4027. [[CrossRef](#)]
16. Yang, S.L.; Wu, C.; Xiong, Z.F.; Fang, X. Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 2411–2416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J.M.; Lane, W.S.; Kaelin, W.G. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science* **2001**, *292*, 464–468. [[CrossRef](#)]
18. Jaakkola, P.; Mole, D.R.; Tian, Y.M.; Wilson, M.I.; Gielbert, J.; Gaskell, S.J.; von Kriegsheim, A.; Hebestreit, H.F.; Mukherji, M.; Schofield, C.J.; et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* **2001**, *292*, 468–472. [[CrossRef](#)]
19. Mole, D.R.; Blancher, C.; Copley, R.R.; Pollard, P.J.; Gleadle, J.M.; Ragoussis, J.; Ratcliffe, P.J. Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16767–16775. [[CrossRef](#)]
20. Schödel, J.; Oikonomopoulos, S.; Ragoussis, J.; Pugh, C.W.; Ratcliffe, P.J.; Mole, D.R. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood* **2011**, *117*, e207–e217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Chi, J.T.; Wang, Z.; Nuyten, D.S.; Rodriguez, E.H.; Schaner, M.E.; Salim, A.; Wang, Y.; Kristensen, G.B.; Helland, A.; Børresen-Dale, A.L.; et al. Gene expression programs in response to hypoxia: Cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e47. [[CrossRef](#)]
22. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharm. Sci.* **2012**, *33*, 207–214. [[CrossRef](#)]
23. Dengler, V.L.; Galbraith, M.; Espinosa, J.M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2014**, *49*, 1–15. [[CrossRef](#)]
24. Raval, R.R.; Lau, K.W.; Tran, M.G.; Sowter, H.M.; Mandriota, S.J.; Li, J.L.; Pugh, C.W.; Maxwell, P.H.; Harris, A.L.; Ratcliffe, P.J. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 5675–5686. [[CrossRef](#)]
25. Hu, C.J.; Wang, L.Y.; Chodosh, L.A.; Keith, B.; Simon, M.C. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 9361–9374. [[CrossRef](#)]
26. Comerford, K.M.; Wallace, T.J.; Karhausen, J.; Louis, N.A.; Montalto, M.C.; Colgan, S.P. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3387–3394.
27. Martin, C.M.; Ferdous, A.; Gallardo, T.; Humphries, C.; Sadek, H.; Caprioli, A.; Garcia, J.A.; Szwedda, L.I.; Garry, M.G.; Garry, D.J. Hypoxia-inducible factor-2alpha transactivates Abcg2 and promotes cytoprotection in cardiac side population cells. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 1075–1081. [[CrossRef](#)]
28. Yang, M.H.; Wu, M.Z.; Chiou, S.H.; Chen, P.M.; Chang, S.Y.; Liu, C.J.; Teng, S.C.; Wu, K.J. Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 295–305. [[CrossRef](#)]
29. Krishnamachary, B.; Berg-Dixon, S.; Kelly, B.; Agani, F.; Feldser, D.; Ferreira, G.; Iyer, N.; LaRusch, J.; Pak, B.; Taghavi, P.; et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 1138–1143.
30. Slack, J.M. Conrad Hal Waddington: The last Renaissance biologist? *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 889–895. [[CrossRef](#)]
31. Thienpont, B.; Steinbacher, J.; Zhao, H.; D’Anna, F.; Kuchnio, A.; Ploumakis, A.; Ghesquière, B.; Van Dyck, L.; Boeckx, B.; Schoonjans, L.; et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. *Nature* **2016**, *537*, 63–68. [[CrossRef](#)]
32. Liu, Q.; Liu, L.; Zhao, Y.; Zhang, J.; Wang, D.; Chen, J.; He, Y.; Wu, J.; Zhang, Z.; Liu, Z. Hypoxia induces genomic DNA demethylation through the activation of HIF-1 α and transcriptional upregulation of MAT2A in hepatoma cells. *Mol. Cancer Ther* **2011**, *10*, 1113–1123. [[CrossRef](#)]
33. Hermes, M.; Osswald, H.; Mattar, J.; Kloor, D. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp. Cell Res.* **2004**, *294*, 325–334. [[CrossRef](#)]

34. Hermes, M.; von Hippel, S.; Osswald, H.; Kloor, D. S-adenosylhomocysteine metabolism in different cell lines: Effect of hypoxia and cell density. *Cell Physiol Biochem.* **2005**, *15*, 233–244. [[CrossRef](#)]
35. Wu, X.; Sun, J.; Zhang, X.; Li, X.; Liu, Z.; Yang, Q.; Li, L. Epigenetic signature of chronic cerebral hypoperfusion and beneficial effects of S-adenosylmethionine in rats. *Mol. Neurobiol.* **2014**, *50*, 839–851. [[CrossRef](#)]
36. Skowronski, K.; Dubey, S.; Rodenhiser, D.; Coomber, B. Ischemia dysregulates DNA methyltransferases and p16INK4a methylation in human colorectal cancer cells. *Epigenetics* **2010**, *5*, 547–556. [[CrossRef](#)]
37. Xu, X.H.; Bao, Y.; Wang, X.; Yan, F.; Guo, S.; Ma, Y.; Xu, D.; Jin, L.; Xu, J.; Wang, J. Hypoxic-stabilized EPAS1 proteins transactivate DNMT1 and cause promoter hypermethylation and transcription inhibition of EPAS1 in non-small cell lung cancer. *FASEB J.* **2018**, *32*. [[CrossRef](#)]
38. Gao, X.; Hicks, K.C.; Neumann, P.; Patel, T.B. Hypoxia inducible factors regulate the transcription of the sprout2 gene and expression of the sprout2 protein. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171616. [[CrossRef](#)]
39. Watson, C.J.; Collier, P.; Tea, I.; Neary, R.; Watson, J.A.; Robinson, C.; Phelan, D.; Ledwidge, M.T.; McDonald, K.M.; McCann, A.; et al. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23*, 2176–2188. [[CrossRef](#)]
40. Mariani, C.J.; Vasanthakumar, A.; Madzo, J.; Yesilkanal, A.; Bhagat, T.; Yu, Y.; Bhattacharyya, S.; Wenger, R.H.; Cohn, S.L.; Nanduri, J.; et al. TET1-mediated hydroxymethylation facilitates hypoxic gene induction in neuroblastoma. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1343–1352. [[CrossRef](#)]
41. Lin, G.; Sun, W.; Yang, Z.; Guo, J.; Liu, H.; Liang, J. Hypoxia induces the expression of TET enzymes in HepG2 cells. *Oncol Lett* **2017**, *14*, 6457–6462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Wu, M.-Z.; Chen, S.-F.; Nieh, S.; Benner, C.; Ger, L.-P.; Jan, C.-I.; Ma, L.; Chien, C.-H.; Hishida, T.; Chang, H.-T. Hypoxia drives breast malignancy through a TET-TNF α -p38-MAPK signaling axis. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3912–3924. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Fischer, A.P.; Miles, S.L. Silencing HIF-1 α induces TET2 expression and augments ascorbic acid induced 5-hydroxymethylation of DNA in human metastatic melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *490*, 176–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Tsai, Y.P.; Chen, H.F.; Chen, S.Y.; Cheng, W.C.; Wang, H.W.; Shen, Z.J.; Song, C.; Teng, S.C.; He, C.; Wu, K.J. TET1 regulates hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition by acting as a co-activator. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Vindrieux, D.; Devailly, G.; Augert, A.; Le Calvé, B.; Ferrand, M.; Pigny, P.; Payen, L.; Lambeau, G.; Perrais, M.; Aubert, S.; et al. Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2 α promotes cancer growth. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1004–1013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lim, J.H.; Lee, Y.M.; Chun, Y.S.; Chen, J.; Kim, J.E.; Park, J.W. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol. Cell* **2010**, *38*, 864–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Dioum, E.M.; Chen, R.; Alexander, M.S.; Zhang, Q.; Hogg, R.T.; Gerard, R.D.; Garcia, J.A. Regulation of hypoxia-inducible factor 2 α signaling by the stress-responsive deacetylase sirtuin 1. *Science* **2009**, *324*, 1289–1293. [[CrossRef](#)]
48. Seo, K.S.; Park, J.H.; Heo, J.Y.; Jing, K.; Han, J.; Min, K.N.; Kim, C.; Koh, G.Y.; Lim, K.; Kang, G.Y.; et al. SIRT2 regulates tumour hypoxia response by promoting HIF-1 α hydroxylation. *Oncogene* **2015**, *34*, 1354–1362. [[CrossRef](#)]
49. Kim, Y.; Nam, H.J.; Lee, J.; Park, D.Y.; Kim, C.; Yu, Y.S.; Kim, D.; Park, S.W.; Bhin, J.; Hwang, D.; et al. Methylation-dependent regulation of HIF-1 α stability restricts retinal and tumour angiogenesis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10347. [[CrossRef](#)]
50. Yang, S.J.; Park, Y.S.; Cho, J.H.; Moon, B.; An, H.J.; Lee, J.Y.; Xie, Z.; Wang, Y.; Pocalyko, D.; Lee, D.C.; et al. Regulation of hypoxia responses by flavin adenine dinucleotide-dependent modulation of HIF-1 α protein stability. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1011–1028. [[CrossRef](#)]
51. Fu, L.; Chen, L.; Yang, J.; Ye, T.; Chen, Y.; Fang, J. HIF-1 α -induced histone demethylase JMJD2B contributes to the malignant phenotype of colorectal cancer cells via an epigenetic mechanism. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 1664–1673. [[CrossRef](#)]
52. Krieg, A.J.; Rankin, E.B.; Chan, D.; Razorenova, O.; Fernandez, S.; Giaccia, A.J. Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 α enhances hypoxic gene expression and tumor growth. *Mol. Cell Biol.* **2010**, *30*, 344–353. [[CrossRef](#)]

53. Wellmann, S.; Bettkober, M.; Zelmer, A.; Seeger, K.; Faigle, M.; Eltzhig, H.K.; Bühner, C. Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 892–897. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Beyer, S.; Kristensen, M.M.; Jensen, K.S.; Johansen, J.V.; Staller, P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 36542–36552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pollard, P.J.; Loenarz, C.; Mole, D.R.; McDonough, M.A.; Gleadle, J.M.; Schofield, C.J.; Ratcliffe, P.J. Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Biochem. J.* **2008**, *416*, 387–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **2006**, *3*, 177–185. [[CrossRef](#)]
57. Johnson, A.B.; Denko, N.; Barton, M.C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. *Mutat. Res.* **2008**, *640*, 174–179. [[CrossRef](#)]
58. Intlekofer, A.M.; Dematteo, R.G.; Venneti, S.; Finley, L.W.; Lu, C.; Judkins, A.R.; Rustenburg, A.S.; Grinaway, P.B.; Chodera, J.D.; Cross, J.R.; et al. Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 304–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Chang, S.; Park, B.; Choi, K.; Moon, Y.; Lee, H.Y.; Park, H. Hypoxic reprogramming of H3K27me3 and H3K4me3 at the INK4A locus. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 3407–3415. [[CrossRef](#)]
60. Nakazawa, M.S.; Eisinger-Mathason, T.S.; Sadri, N.; Ochocki, J.D.; Gade, T.P.; Amin, R.K.; Simon, M.C. Epigenetic re-expression of HIF-2 α suppresses soft tissue sarcoma growth. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10539. [[CrossRef](#)]
61. Lu, Y.; Chu, A.; Turker, M.S.; Glazer, P.M. Hypoxia-induced epigenetic regulation and silencing of the BRCA1 promoter. *Mol. Cell Biol.* **2011**, *31*, 3339–3350. [[CrossRef](#)]
62. Yamada, D.; Kobayashi, S.; Yamamoto, H.; Tomimaru, Y.; Noda, T.; Uemura, M.; Wada, H.; Marubashi, S.; Eguchi, H.; Tanemura, M.; et al. Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: Clinical impact on recurrence after hepatic resection. *Ann. Surg. Oncol.* **2012**, *19* (Suppl. 3), 355–364. [[CrossRef](#)]
63. Chen, H.; Yan, Y.; Davidson, T.L.; Shinkai, Y.; Costa, M. Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9009–9016. [[CrossRef](#)]
64. Mihaylova, V.T.; Bindra, R.S.; Yuan, J.; Campisi, D.; Narayanan, L.; Jensen, R.; Giordano, F.; Johnson, R.S.; Rockwell, S.; Glazer, P.M. Decreased expression of the DNA mismatch repair gene Mlh1 under hypoxic stress in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 3265–3273. [[CrossRef](#)]
65. Tausendschön, M.; Dehne, N.; Brüne, B. Hypoxia causes epigenetic gene regulation in macrophages by attenuating Jumonji histone demethylase activity. *Cytokine* **2011**, *53*, 256–262. [[CrossRef](#)]
66. Safronova, O.; Pluemsampant, S.; Nakahama, K.; Morita, I. Regulation of chemokine gene expression by hypoxia via cooperative activation of NF- κ B and histone deacetylase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 2270–2280. [[CrossRef](#)]
67. Nabel, C.S.; Manning, S.A.; Kohli, R.M. The curious chemical biology of cytosine: Deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 20–30. [[CrossRef](#)]
68. Baylin, S.B.; Jones, P.A. A decade of exploring the cancer epigenome—Biological and translational implications. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 726–734. [[CrossRef](#)]
69. Santini, V.; Melnick, A.; Maciejewski, J.P.; Duprez, E.; Nervi, C.; Cocco, L.; Ford, K.G.; Mufti, G. Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2013**, *88*, 231–245. [[CrossRef](#)]
70. He, Y.F.; Li, B.Z.; Li, Z.; Liu, P.; Wang, Y.; Tang, Q.; Ding, J.; Jia, Y.; Chen, Z.; Li, L.; et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* **2011**, *333*, 1303–1307. [[CrossRef](#)]
71. Shahrzad, S.; Bertrand, K.; Minhas, K.; Coomber, B.L. Induction of DNA hypomethylation by tumor hypoxia. *Epigenetics* **2007**, *2*, 119–125. [[CrossRef](#)]
72. Finkelstein, J.D. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* **1990**, *1*, 228–237. [[CrossRef](#)]

73. Fritzsche, S.; Kenzelmann, M.; Hoffmann, M.J.; Müller, M.; Engers, R.; Gröne, H.J.; Schulz, W.A. Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **2006**, *13*, 839–849. [[CrossRef](#)]
74. Sutterlüty, H.; Mayer, C.E.; Setinek, U.; Attems, J.; Ovtcharov, S.; Mikula, M.; Mikulits, W.; Micksche, M.; Berger, W. Down-regulation of Sprouty2 in non-small cell lung cancer contributes to tumor malignancy via extracellular signal-regulated kinase pathway-dependent and -independent mechanisms. *Mol. Cancer Res.* **2007**, *5*, 509–520. [[CrossRef](#)]
75. Faratian, D.; Sims, A.H.; Mullen, P.; Kay, C.; Um, I.; Langdon, S.P.; Harrison, D.J. Sprouty 2 is an independent prognostic factor in breast cancer and may be useful in stratifying patients for trastuzumab therapy. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e23772. [[CrossRef](#)]
76. Song, K.; Gao, Q.; Zhou, J.; Qiu, S.J.; Huang, X.W.; Wang, X.Y.; Fan, J. Prognostic significance and clinical relevance of Sprouty 2 protein expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* **2012**, *11*, 177–184. [[CrossRef](#)]
77. Chen, T.; Dent, S.Y. Chromatin modifiers and remodellers: Regulators of cellular differentiation. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 93–106. [[CrossRef](#)]
78. Nakagawa, T.; Guarente, L. Sirtuins at a glance. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 833–838. [[CrossRef](#)]
79. Vaziri, H.; Dessain, S.K.; Ng Eaton, E.; Imai, S.I.; Frye, R.A.; Pandita, T.K.; Guarente, L.; Weinberg, R.A. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* **2001**, *107*, 149–159. [[CrossRef](#)]
80. Garofalo, O.; Cox, D.W.; Bachelard, H.S. Brain levels of NADH and NAD⁺ under hypoxic and hypoglycaemic conditions in vitro. *J. Neurochem* **1988**, *51*, 172–176. [[CrossRef](#)]
81. Wang, R.H.; Zheng, Y.; Kim, H.S.; Xu, X.; Cao, L.; Luhasen, T.; Lee, M.H.; Xiao, C.; Vassilopoulos, A.; Chen, W.; et al. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 11–20. [[CrossRef](#)]
82. Hiratsuka, M.; Inoue, T.; Toda, T.; Kimura, N.; Shirayoshi, Y.; Kamitani, H.; Watanabe, T.; Ohama, E.; Tahimic, C.G.; Kurimasa, A.; et al. Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: Down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *309*, 558–566. [[CrossRef](#)]
83. Peters, C.J.; Rees, J.R.; Hardwick, R.H.; Hardwick, J.S.; Vowler, S.L.; Ong, C.A.; Zhang, C.; Save, V.; O'Donovan, M.; Rassl, D.; et al. A 4-gene signature predicts survival of patients with resected adenocarcinoma of the esophagus, junction, and gastric cardia. *Gastroenterology* **2010**, *139*, 1995–2004. [[CrossRef](#)]
84. Garber, M.E.; Troyanskaya, O.G.; Schluens, K.; Petersen, S.; Thaessler, Z.; Pacyna-Gengelbach, M.; van de Rijn, M.; Rosen, G.D.; Perou, C.M.; Whyte, R.I.; et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13784–13789. [[CrossRef](#)]
85. Choi, Y.L.; Tsukasaki, K.; O'Neill, M.C.; Yamada, Y.; Onimaru, Y.; Matsumoto, K.; Ohashi, J.; Yamashita, Y.; Tsutsumi, S.; Kaneda, R.; et al. A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene* **2007**, *26*, 1245–1255. [[CrossRef](#)]
86. Mei, Z.; Zhang, X.; Yi, J.; Huang, J.; He, J.; Tao, Y. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2016**, *35*, 182. [[CrossRef](#)]
87. Gomes, A.P.; Price, N.L.; Ling, A.J.; Moslehi, J.J.; Montgomery, M.K.; Rajman, L.; White, J.P.; Teodoro, J.S.; Wrann, C.D.; Hubbard, B.P.; et al. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* **2013**, *155*, 1624–1638. [[CrossRef](#)]
88. Lan, F.; Nottke, A.C.; Shi, Y. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2008**, *20*, 316–325. [[CrossRef](#)]
89. Zhou, V.W.; Goren, A.; Bernstein, B.E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **2011**, *12*, 7–18. [[CrossRef](#)]
90. Hosseini, A.; Minucci, S. A comprehensive review of lysine-specific demethylase 1 and its roles in cancer. *Epigenomics* **2017**, *9*, 1123–1142. [[CrossRef](#)]
91. Chen, X.; Iliopoulos, D.; Zhang, Q.; Tang, Q.; Greenblatt, M.B.; Hatzia Apostolou, M.; Lim, E.; Tam, W.L.; Ni, M.; Chen, Y.; et al. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 α pathway. *Nature* **2014**, *508*, 103–107. [[CrossRef](#)]
92. Shahbazian, M.D.; Grunstein, M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu. Rev. Biochem.* **2007**, *76*, 75–100. [[CrossRef](#)]

93. Wu, N.; Yang, M.; Gaur, U.; Xu, H.; Yao, Y.; Li, D. Alpha-Ketoglutarate: Physiological Functions and Applications. *Biomol. Ther. (Seoul)* **2016**, *24*, 1–8. [[CrossRef](#)]
94. Wise, D.R.; Ward, P.S.; Shay, J.E.; Cross, J.R.; Gruber, J.J.; Sachdeva, U.M.; Platt, J.M.; DeMatteo, R.G.; Simon, M.C.; Thompson, C.B. Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19611–19616. [[CrossRef](#)]
95. De Miguel, M.P.; Alcaina, Y.; de la Maza, D.S.; Lopez-Iglesias, P. Cell metabolism under microenvironmental low oxygen tension levels in stemness, proliferation and pluripotency. *Curr. Mol. Med.* **2015**, *15*, 343–359. [[CrossRef](#)]
96. Zheng, L.; Kelly, C.J.; Colgan, S.P. Physiologic hypoxia and oxygen homeostasis in the healthy intestine. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2015**, *309*, C350–C360. [[CrossRef](#)]
97. Graeber, T.G.; Osmanian, C.; Jacks, T.; Housman, D.E.; Koch, C.J.; Lowe, S.W.; Giaccia, A.J. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* **1996**, *379*, 88–91. [[CrossRef](#)]
98. Eales, K.L.; Hollinshead, K.E.; Tennant, D.A. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e190. [[CrossRef](#)]
99. Ruan, K.; Song, G.; Ouyang, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *107*, 1053–1062. [[CrossRef](#)]
100. Eltzschig, H.K.; Carmeliet, P. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *364*, 656–665. [[CrossRef](#)]
101. Watson, J.A.; Watson, C.J.; McCann, A.; Baugh, J. Epigenetics, the epicenter of the hypoxic response. *Epigenetics* **2010**, *5*, 293–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Prabhakar, N.R. Sensing hypoxia: Physiology, genetics and epigenetics. *J. Physiol.* **2013**, *591*, 2245–2257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Kotake, Y.; Naemura, M.; Murasaki, C.; Inoue, Y.; Okamoto, H. Transcriptional Regulation of the p16 Tumor Suppressor Gene. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 4397–4401.
104. Romagosa, C.; Simonetti, S.; López-Vicente, L.; Mazo, A.; Lleó, M.E.; Castellvi, J.; Ramon y Cajal, S. p16(Ink4a) overexpression in cancer: A tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* **2011**, *30*, 2087–2097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Ndiaye, C.; Mena, M.; Alemany, L.; Arbyn, M.; Castellsagué, X.; Laporte, L.; Bosch, F.X.; de Sanjosé, S.; Trottier, H. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* **2014**, *15*, 1319–1331. [[CrossRef](#)]
106. Jin, Y.; Kato, T.; Furu, M.; Nasu, A.; Kajita, Y.; Mitsui, H.; Ueda, M.; Aoyama, T.; Nakayama, T.; Nakamura, T.; et al. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 1471–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Gordan, J.D.; Thompson, C.B.; Simon, M.C. HIF and c-Myc: Sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* **2007**, *12*, 108–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Gordan, J.D.; Bertout, J.A.; Hu, C.J.; Diehl, J.A.; Simon, M.C. HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 335–347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Bernard, D.; Vindrieux, D. PLA2R1: Expression and function in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1846*, 40–44. [[CrossRef](#)]
110. Choi, S.B.; Park, J.B.; Song, T.J.; Choi, S.Y. Molecular mechanism of HIF-1-independent VEGF expression in a hepatocellular carcinoma cell line. *Int. J. Mol. Med.* **2011**, *28*, 449–454. [[CrossRef](#)]
111. Zimna, A.; Kurpisz, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 549412. [[CrossRef](#)]
112. Qian, D.Z.; Wang, X.; Kachhap, S.K.; Kato, Y.; Wei, Y.; Zhang, L.; Atadja, P.; Pili, R. The histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 inhibits angiogenesis and has a greater antitumor effect in combination with the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6626–6634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Qian, D.Z.; Kato, Y.; Shabbeer, S.; Wei, Y.; Verheul, H.M.; Salumbides, B.; Sanni, T.; Atadja, P.; Pili, R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: The hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 634–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

114. Lian, C.G.; Xu, Y.; Ceol, C.; Wu, F.; Larson, A.; Dresser, K.; Xu, W.; Tan, L.; Hu, Y.; Zhan, Q.; et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell* **2012**, *150*, 1135–1146. [[CrossRef](#)]
115. Uchiyama, R.; Uhara, H.; Uchiyama, A.; Ogawa, E.; Takazawa, Y.; Ashida, A.; Koga, H.; Hayashi, K.; Kiniwa, Y.; Okuyama, R. 5-Hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. *J. Dermatol. Sci.* **2014**, *73*, 161–163. [[CrossRef](#)]
116. Maia, L.L.; Peterle, G.T.; Dos Santos, M.; Trivilin, L.O.; Mendes, S.O.; de Oliveira, M.M.; Dos Santos, J.G.; Stur, E.; Agostini, L.P.; Couto, C.V.M.D.; et al. JMJD1A, H3K9me1, H3K9me2 and ADM expression as prognostic markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0194884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Wang, H.; Yu, Z.; Huo, S.; Chen, Z.; Ou, Z.; Mai, J.; Ding, S.; Zhang, J. Overexpression of ELF3 facilitates cell growth and metastasis through PI3K/Akt and ERK signaling pathways in non-small cell lung cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *94*, 98–106. [[CrossRef](#)]
118. Nakarai, C.; Osawa, K.; Matsubara, N.; Ikeuchi, H.; Yamano, T.; Okamura, S.; Kamoshida, S.; Tsutou, A.; Takahashi, J.; Ejiri, K.; et al. Significance of ELF3 mRNA expression for detection of lymph node metastases of colorectal cancer. *Anticancer Res.* **2012**, *32*, 3753–3758.
119. Cheriyaath, V.; Kaur, J.; Davenport, A.; Khaleel, A.; Chowdhury, N.; Gaddipati, L. G1P3 (IF16), a mitochondrial localised antiapoptotic protein, promotes metastatic potential of breast cancer cells through mtROS. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 52–64. [[CrossRef](#)]
120. Sancar, A.; Lindsey-Boltz, L.A.; Unsal-Kaçmaz, K.; Linn, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 39–85. [[CrossRef](#)]
121. King, M.C.; Marks, J.H.; Mandell, J.B.; Group, N.Y.B.C.S. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* **2003**, *302*, 643–646. [[CrossRef](#)]
122. Alshareeda, A.T.; Negm, O.H.; Aleskandarany, M.A.; Green, A.R.; Nolan, C.; TigHhe, P.J.; Madhusudan, S.; Ellis, I.O.; Rakha, E.A. Clinical and biological significance of RAD51 expression in breast cancer: A key DNA damage response protein. *Breast Cancer Res. Treat.* **2016**, *159*, 41–53. [[CrossRef](#)]
123. Kolodner, R.D.; Marsischky, G.T. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, *9*, 89–96. [[CrossRef](#)]
124. Vinay, D.S.; Ryan, E.P.; Pawelec, G.; Talib, W.H.; Stagg, J.; Elkord, E.; Lichtor, T.; Decker, W.K.; Whelan, R.L.; Kumara, H.M.C.S.; et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, S185–S198. [[CrossRef](#)]
125. Ben-Neriah, Y.; Karin, M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 715–723. [[CrossRef](#)]
126. Waugh, D.J.; Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735–6741. [[CrossRef](#)]
127. Rius, J.; Guma, M.; Schachtrup, C.; Akassoglou, K.; Zinkernagel, A.S.; Nizet, V.; Johnson, R.S.; Haddad, G.G.; Karin, M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* **2008**, *453*, 807–811. [[CrossRef](#)]
128. Van Uden, P.; Kenneth, N.S.; Rocha, S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by NF-kappaB. *Biochem. J.* **2008**, *412*, 477–484. [[CrossRef](#)]
129. Van Uden, P.; Kenneth, N.S.; Webster, R.; Müller, H.A.; Mudie, S.; Rocha, S. Evolutionary conserved regulation of HIF-1 β by NF- κ B. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001285. [[CrossRef](#)]
130. Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845. [[CrossRef](#)]
131. Su, Z.; Yang, Z.; Xu, Y.; Chen, Y.; Yu, Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Mol. Cancer* **2015**, *14*, 48. [[CrossRef](#)]
132. Mohammad, R.M.; Muqbil, I.; Lowe, L.; Yedjou, C.; Hsu, H.Y.; Lin, L.T.; Siegelin, M.D.; Fimognari, C.; Kumar, N.B.; Dou, Q.P.; et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2015**, *35*, S78–S103. [[CrossRef](#)]
133. Pan, M.R.; Hsu, M.C.; Luo, C.W.; Chen, L.T.; Shan, Y.S.; Hung, W.C. The histone methyltransferase G9a as a therapeutic target to override gemcitabine resistance in pancreatic cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 61136–61151. [[CrossRef](#)]
134. Cui, J.; Sun, W.; Hao, X.; Wei, M.; Su, X.; Zhang, Y.; Su, L.; Liu, X. EHMT2 inhibitor BIX-01294 induces apoptosis through PMAIP1-USP9X-MCL1 axis in human bladder cancer cells. *Cancer Cell Int.* **2015**, *15*, 4. [[CrossRef](#)]

135. Ren, A.; Qiu, Y.; Cui, H.; Fu, G. Inhibition of H3K9 methyltransferase G9a induces autophagy and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *459*, 10–17. [[CrossRef](#)]
136. Mazure, N.M.; Pouyssegur, J. Hypoxia-induced autophagy: Cell death or cell survival? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 177–180. [[CrossRef](#)]
137. Bruick, R.K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9082–9087. [[CrossRef](#)]
138. Murai, M.; Toyota, M.; Suzuki, H.; Satoh, A.; Sasaki, Y.; Akino, K.; Ueno, M.; Takahashi, F.; Kusano, M.; Mita, H.; et al. Aberrant methylation and silencing of the BNIP3 gene in colorectal and gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 1021–1027.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).