



DANIELLE PORTINHO

**ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA DE SEQUÊNCIAS
LINE1 E DOS GENES *SFRP1*, *SFRP2* E *TP73* NA INFLAMAÇÃO
CRÔNICA PERIODONTAL E CÂNCER DE BOCA**

PIRACICABA

2015



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

DANIELLE PORTINHO

**ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA DE SEQUÊNCIAS *LINE1* E
DOS GENES *SFRP1*, *SFRP2* E *TP73* NA INFLAMAÇÃO CRÔNICA
PERIODONTAL E CÂNCER DE BOCA**

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biologia Bucodental na área de Histologia e Embriologia.

Orientador: Ana Paula de Souza Pardo

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Danielle Portinho e orientada pela Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo.

PIRACICABA

2015

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

P836a Portinho, Danielle, 1978-
Análise do padrão de metilação de DNA de sequências *LINE1* e dos genes *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73* na inflamação crônica periodontal e câncer de boca / Danielle Portinho. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Ana Paula de Souza Pardo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Epigenética. 2. Metilação. 3. Inflamação. 4. Carcinoma de células escamosas. I. Pardo, Ana Paula de Souza, 1975-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of DNA methylation status of *LINE1* sequences and *SFRP1*, *SFRP2* and *TP73* genes in chronic periodontitis and oral cancer

Palavras-chave em inglês:

Epigenetics

Methylation

Inflammation

Carcinoma, squamous cell

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutora em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Ana Paula de Souza Pardo [Orientador]

Rodrigo Augusto da Silva

Edilson Ervolino

Luciana Souto Mofatto

Aline Cristiane Planello

Data de defesa: 25-02-2015

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Fevereiro de 2015, considerou a candidata DANIELLE PORTINHO aprovada.

Prof. Dra. ANA PAULA DE SOUZA PARDO

Prof. Dr. RODRIGO AUGUSTO DA SILVA

Prof. Dr. EDILSON EVOLINO

Prof. Dra. LUCIANA SOUTO MOFATTO

Prof. Dra. ALINE CRISTIANE PLANELLO

RESUMO

A associação entre inflamação e câncer vem sendo há tempo estudada, havendo atualmente fortes evidências que mostram o microambiente inflamatório como fator de risco para tumorigênese. Dentre os tipos de câncer mais frequentes, o câncer de boca ocupa a sexta colocação como maior causa de óbitos em todo o mundo. Os fatores que levam ao aparecimento do câncer oral são variados, entretanto existe dependência de um acúmulo de mutações as quais levam a alterações genéticas e epigenéticas das células afetadas, sendo que estas alterações influenciam diretamente no prognóstico da doença. Nos últimos anos, o estudo das alterações epigenéticas relacionadas aos diversos tipos de câncers vem se destacando, havendo marcadores epigenéticos já descritos para diferentes tipos de tumores. Dentre as alterações epigenéticas mais estudadas está a metilação do DNA que acontecem normalmente em regiões com grandes concentrações de citosina que precedem guanina (CpG). Estas regiões ricas em dinucleotídeos CpGs são denominadas ilhas CG. Ilhas CG são frequentes em regiões promotoras dos genes, sendo a metilação um mecanismo de controle do nível transcricional. Ilhas CGs metiladas na região promotora são esperadas em genes pouco expressos, podendo haver até mesmo o completo silenciamento da expressão do gene. No caso de genes supressores de tumor, pode provocar o aparecimento e o descontrole no crescimento tumoral. Assim, o objetivo deste estudo foi analisar o padrão de metilação do DNA em sequências *LINE1* e nos genes supressores tumorais: *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73*, em amostras de gengiva coletadas de pacientes, pacientes com periodontite crônica e pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CEC). A metilação do DNA foi analisada utilizando-se a metodologia *COmbined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA) em tecidos homogeneizados e microdissecados. A análise de expressão gênica dos genes foi realizada pela técnica qPCR amostras de tecido gengival e CEC. Os resultados obtidos pelas análises COBRA evidenciaram um desequilíbrio no estado de metilação do DNA tanto nos tecidos inflamados quanto nos

tumorais. Entretanto, as regiões CpG analisadas não demonstraram estar diretamente relacionadas com o nível de expressão gênica. Adicionalmente, os resultados das análises da metilação global (*LINE1*) do tecido homogeneizado em comparação com as amostras microdissecadas indicam que os dados obtidos podem ser contraditórios aos reais podendo interferir no prognóstico do paciente. Esta contradição possivelmente se deve a contaminação do tecido tumoral por tecidos adjacentes a ele. As análises estatísticas dos resultados foram realizadas pelos testes Kruskal-Wallis e correlação de Pearson ao nível de significância de 5%. Alterações no padrão de metilação do DNA dos genes estudados são encontradas tanto em tecidos inflamados quanto em amostras de câncer bucal. A metodologia de escolha para análise destes tecidos pode influenciar nos resultados obtidos, gerando falsos negativos e consequentemente comprometendo o tratamento da doença.

Palavras-Chave: epigenética, metilação, inflamação, carcinoma espinocelular.

ABSTRACT

The association between inflammation and cancer has always been sought by researchers. Nowadays, there are evidences of the role of the inflammatory microenvironment in tumorigenesis. Among the most common types of cancer, oral cancer is the sixth type that causes more deaths worldwide. The factors that lead to the development of an oral cancer are varied, depending on an accumulation of mutations that lead to genetic and epigenetic alterations of the affected cells, and these changes directly influence the prognosis of the disease. In recent years epigenetic have been widely studied in this field of researchs, and several genes have been described as markers for different types of tumors. Among the most studied epigenetic changes there is the DNA methylation in areas with large concentrations of the cytokine that precedes guanine (CpG), these regions are called CpG islands. GpC islands are fairly common in the promoter regions of the genes, being the methylation a control mechanism of gene level transcripts and it can even silence the expression of a gene. In the case of tumor suppressor genes this silencing can lead to uncontrolled tumor growth. The aim of this study was to analyse the DNA methylation status of *LINE1* sequences and specific genes (*SFRP1*, *SFRP2* e *TP73*) from human tissue collected from gingival normal tissue from patients underwent aesthetic surgery, patients with cronic periodontitis and patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). The extracted DNA was analysed by Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) submitting the DNA to bisulfite conversion by *MethylSEQrBisulfiteConversion Kit* from homogenized and microdissected tissues. Through qPCR technique, samples from gingival tissue and OSCC were subjected to RNA expression analysis of candidate genes. The results of COBRA analysis of genes exhibited an imbalance in methylation state of inflamed and tumor tissues. However, the CpG regions analyzed have not shown to be directly related to the level of expression of these genes. The results of the analysis of the global methylation (*LINE1*) of the homogenized tissue compared with microdissected samples showed that the

obtained data may be contradictory to the real one and may interfere in the prognosis of the patient. This inconsistency is probably due to contamination of tumor tissue by adjacent tissues. Statistical analysis of results was performed by Kruskal-Wallis test and Pearson correlation at the 5% confidence level. Changes in DNA methylation pattern of the genes studied are found in both inflamed tissues as oral cancer samples. The choice of methodology for the analysis of these tissues can influence results, and consequently generating false negative results affecting the treatment of disease.

Keywords: epigenetic, methylation, inflammation, squamous cell carcinoma.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 – ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES <i>SFPR1</i> , <i>SFPR2</i> E <i>TP73</i> EM CÂNCER ORAL, PERIODONTITE CRÔNICA E TECIDO NORMAL.....	11
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE METILAÇÃO EM SEQUÊNCIAS <i>LINE1</i> EM TUMOR: IMPORTÂNCIA DA METODOLOGIA.....	43
CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICE I.....	77
APÊNDICE II.....	82
ANEXO I.....	85
ANEXO II.....	86
ANEXO III.....	87

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família por acreditarem no meu potencial e estarem sempre prontos a me incentivar. Aos meus pais – Paulo e Rosi, irmãos (Rafael e Ana Paula) e esposo (Fábio).

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pela luz e força que me capacita a continuar o meu caminho.

À Universidade Estadual de Campinas, **UNICAMP**, na pessoa do Magnífico Reitor, Prof. Dr. José Tadeu Jorge e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP, por meio do Diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques.

À Prof^a Dr^a Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, **coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP** e à Profa. Dra. Maria Beatriz Duarte Gavião, coordenadora do **Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP**.

À minha **orientadora**, Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, pela oportunidade desta pós-graduação me propiciando o ingresso no fascinante mundo da biologia molecular.

Aos docentes da **Área de Histologia e Embriologia**: Dr. Sérgio Roberto Peres Line, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes e Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques, por partilharem de seus conhecimentos.

Ao **CNPq**, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro através da bolsa de doutorado (140522/2011-5).

Aos **meus pais**: Paulo da Fontoura Portinho e Rosi Eleni Portinho por serem meus grandes exemplos de vida. Obrigada pelo incentivo, palavras de conforto, ombro amigo, pelas orações, pelo olhar de orgulho que sempre me incentivou a querer mais por todos nós. Amo vocês!

Aos **meus irmãos**: Rafael Portinho e Ana Paula Portinho, pelas palavras de apoio, amizade, mensagens engraçadas para momentos de descontração (e viva o whatsapp). Obrigada mano pelos sobrinhos lindos que me fazem esquecer os estresses com as gargalhadas gostosas do Guilherme e os gestos infinitamente carinhosos da minha linda afilhada – Gabriela. Amo vocês!

À minha **cunhada** Nicole de Souza pelo apoio e disponibilização de seu, tão corrido, tempo para realizar as correções dos artigos em Inglês.

À minha **prima** Renata Z. Rizental Delgado, pelo apoio, incentivo, gargalhadas, lágrimas, visitas providenciais e principalmente pelo melhor presente que poderia ter me dado... obrigada por ter colocado um príncipe em minha vida.

Ao meu **esposo**, Fábio Rizental Coutinho, pela infinita paciência, companheirismo, amizade, compreensão, pelos almoços e jantares via Skype (viva a tecnologia!), por seu carinho, amor e dedicação a nós! Obrigada, obrigada, obrigada! Eu amo você! :P

Aos meus **irmãos de coração**: Luciana S. Mofatto, Rodrigo Augusto da Silva e Denise C. Andia, pelas ricas discussões acadêmicas, pelos ensinamentos, momentos de descontração, companheirismo e amizade verdadeira.

Ao Prof Dr. Ricardo Della Coletta, do **Departamento de Diagnóstico Oral, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas**, pela doação das amostras de carcinoma espinocelular de boca e pronto atendimento e ajuda sempre que solicitado.

Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, do **Departamento de Prótese e Periodontia – Área de Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas**, pela doação das amostras de inflamação crônica e controle periodontal.

Ao Prof. Dr. Carlos Almicar Parada do **Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp**, pelo empréstimo do criostato, essencial para realização das microtomizações das amostras.

À **aluna de iniciação científica**, Louyse Vizotto Carvalho, pela importante colaboração no trabalho de cultura em meio condicionado, pelas conversas descontraídas e agradáveis.

Aos **colegas** do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental, Yamba Carla Lara Pereira, Mariana Martins Ribeiro, Aline Cristiane Planello, Eduardo Arcanjo Urioste, Roger Antoniaci Guedes, Natássia Cristina Martins Oliveira, Marta Delfina Bazzano Gonzáles, pelo convívio.

Aos ***funcionários*** da Área de Histologia do Departamento de Morfologia da FOP/UNICAMP: Adriano Luis Martins, Eliene Aparecida Orsini Narvaes, Maria Aparecida Santiago Varela (Cidinha) e Suzete Neder, por toda ajuda, pelos divertidos cafés e lanchinhos, pelas conversas descontraídas e pela amizade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da formação de uma 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNAmetiltransferase.	3
Figura 2 - Cascata metabólica da apoptose.	6
Figura 3 - Fluxograma metodológico - capítulo 1.	9
Figura 4 - Fluxograma metodológico - capítulo 2.	10
Figura 5 - Transformação por bissulfito de sódio.	18
Figura 6 - Padrões de metilação de <i>SFRP1</i> detectados por análise COBRA.	23
Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida de produtos COBRA- <i>SFRP1</i>	24
Figura 8 – Análise de expressão do gene <i>SFRP1</i>	25
Figura 9 - Padrões de metilação de <i>SFRP2</i> detectados por análise COBRA.	26
Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida de produtos COBRA- <i>SFRP2</i>	27
Figura 11 – Análise de expressão do gene <i>SFRP2</i>	28
Figura 12 - Padrões de metilação de <i>TP73</i> detectados por análise COBRA.	29
Figura 13 – Eletrofores em gel de poliacrilamida de produtos COBRA- <i>TP73</i>	30
Figura 14 – Análise de expressão do gene <i>TP73</i>	30
Figura 15 - Correlação entre os níveis de metilação e expressão gênica.	31
Figura 16 - Imagens histológicas de amostra de tecido controle corado pelo HE.	49
Figura 17 - Sequência <i>LINE1</i> estudada.	52
Figura 18 - Determinação do estado de metilação de sequências <i>LINE1</i> dos DNAs obtidos a partir de amostras homogeneizadas.	56
Figura 19 - Determinação do estado de metilação de sequências <i>LINE1</i> dos DNAs obtidos a partir de amostras submetidas à microdissecção a laser (CML).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> para análise de expressão, ciclagem e condições da PCR.....	17
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> para análise de metilação, ciclagem e condições da PCR.....	19
Tabela 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com os parâmetros epidemiológicos.....	54

INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa do organismo em resposta a um agente agressor na tentativa de eliminar, neutralizar ou destruir a causa da agressão. Quando o agente agressor se perpetua, a inflamação passa a ser crônica. Nesta situação de continuidade do estímulo, seja por fatores biológicos, químicos ou físicos, parece estar associada em humanos ao aumento do risco de desenvolvimento de vários tipos de câncer (Rutter *et al.*, 2004, Moss e Blaser, 2005; Aggarwal *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006; Bartsch e Nair 2006, Sawa e Ohshima 2006, Halliwell 2007, Colotta *et al.*, 2009, Hahn *et al.*, 2008).

O câncer é uma condição caracterizada pelo crescimento descontrolado de células neoplásicas que matam pela invasão destrutiva dos tecidos, seja por expansão direta ou por disseminação para locais distantes (metástases) pelo sangue, linfa ou superfícies serosas. A metástase está relacionada a fatores produzidos pelo próprio tumor, que permite que a célula individualmente invada os tecidos e o endotélio (Bordini *et al.*, 2007; Little *et al.*, 2008).

Diferente de certas neoplasias malignas que só se tornam perceptíveis ao atingirem grandes extensões, o câncer bucal, por ocorrer de forma localizada no epitélio que reveste a mucosa oral, é passível de ser detectado tanto pelo paciente, através do autoexame, como pelo cirurgião dentista durante o exame clínico de rotina (Bordini *et al.*, 2007). Entretanto, a demora no diagnóstico pode levar a descoberta de tumores em estágio avançado, o que explicaria sua alta taxa de mortalidade (Silverman *et al.*, 2004). Na cavidade oral o carcinoma espinocelular (CEC), também denominado carcinoma epidermóide ou de células escamosas, é a neoplasia maligna mais frequente, tendo uma participação em mais de 90% dos cânceres bucais (Spara *et al.*, 2005; Silveira *et al.*, 2005; Bordini *et al.*, 2007). A localização intraoral mais comum é a língua, seguida dos lábios e do assoalho de boca (Spara *et al.*, 2005). Apresenta maior incidência em homens com idade superior a 40 anos, principalmente a partir dos 65 anos (Luiz *et al.*, 2008; Mosele *et al.*, 2009). A recorrência está relacionada a alguns fatores, tais como: a localização, o uso de tabaco, a presença de infiltrado linfocitário e a

classificação de estadiamento do tumor também devem ser levadas em conta para a tomada de decisão do tratamento e acompanhamento do CEC bucal (Camisasca *et al.*, 2011).

Apesar de conhecida a influência de carcinógenos, a carcinogênese depende de variações individuais em resposta a um potencial conhecido ou desconhecido (Gigliotti *et al.*, 2008). Envolve não somente alterações em proto-oncogenes e oncogenes, mas também, muitos outros fatores de regulação relacionados ao crescimento, migração e proliferação celular (Gao *et al.*, 2010). São alguns deles: fatores de crescimento e seus receptores, proteínas quinases citoplasmáticas e fatores de transcrição nuclear (Popovic *et al.*, 2010). Em nível molecular, a exposição crônica das células da mucosa a agente potencialmente carcinogênicos resulta na ativação dos oncogenes e em mutações e deleções genéticas (Little *et al.*, 2008; Scully, 2009).

Frequentemente os pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço desenvolvem lesões múltiplas em diferentes sítios anatômicos, estando esse padrão multifocal de acordo com o modelo denominado de "*campo de cancerização*" (Slaughter *et al.*, 1953). O conceito de campo de cancerização foi estabelecido em 1953 por Slaughter e colaboradores e é baseado no fato de que a superfície epitelial do trato aerodigestivo é comumente exposta a muitas substâncias carcinogênicas e, portanto, possui um maior risco de desenvolvimento de carcinomas. No entanto, estudos moleculares demonstraram que o campo de cancerização é expansível para qualquer tecido epitelial. Isso explica o porquê de um controle local para neoplasia diagnosticada não ser uma terapia totalmente eficiente (Raimondi *et al.*, 2005; Rubin, 2011). Além disso, há evidências da existência precoce de alterações genômicas em epitélios histologicamente normais adjacentes aos carcinomas orais, em áreas de tecido com alterações de microsatélites ou instabilidade cromossômica. Estas células representam populações clonais com vantagem de crescimento e uma elevada taxa proliferativa (Raimondi *et al.*, 2005).

A carcinogênese de cabeça e pescoço é um processo multifatorial, caracterizada por alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas (Esteller, 2006a; 2006b; Mehrotra e Yadav, 2006). Muitas dessas alterações envolvem a ativação de vias de sinalização ou via metabólica que favorecem o crescimento celular e as características de sobrevivência da célula (Akrish *et al.*, 2004). Desse modo, vem se investigando, principalmente a natureza molecular da doença, onde os estudos evidenciam cada vez mais a participação da epigenética regulando o fenômeno da carcinogênese e o desenvolvimento deste tipo de tumor (Venturi *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008, Worsham, 2011).

Diferente da genética, na epigenética ocorre mudanças bioquímicas na molécula do DNA que não alteram a sua sequência, mas que são herdáveis pela mitose e ao longo de gerações (Tang e Ho, 2007). A principal forma de alteração epigenética nas células dos mamíferos é a metilação do DNA, ou a adição covalente de um grupo metil na posição 5' da citosina predominantemente dentro do dinucleotídeo CpG. A metilação do DNA tem efeitos profundos sobre o genoma dos mamíferos (Robertson, 2001). Afeta 3% das citosinas e 70% de todas as citosinas CpG. Citosinas metiladas são chamadas de a “quinta” base do genoma humano (Bird, 1996). As DNAmetiltransferases (DNMT) são as enzimas envolvidas na metilação, tendo o papel de catalisar a reação de ligação do radical metil no dinucleotídeo (Casati *et al.*, 2010) (Figura 1).

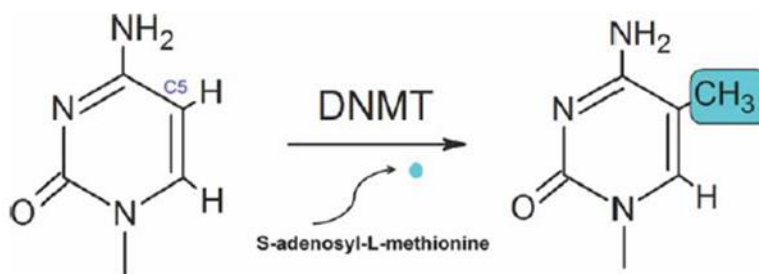


Figura 1 - Esquema da formação de uma 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNAmetiltransferase. Fonte: Daniel *et al.*, 2011.

Os dinucleotídeos CpG podem aparecer em pontos esparsos ou concentrados em regiões conhecidas como ilhas CpG. Estas ilhas são definidas como regiões do DNA maiores que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG (Li e Dahiya, 2002). Frequentemente estas ilhas são encontradas na região promotora dos genes, responsáveis pela regulação da expressão gênica.

A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a estas regiões, resultando na ausência de transcrição gênica (Fukushige *et al.*, 2009). Assim, a metilação do DNA é importante no controle de várias funções do genoma. Entre essas funções, podemos citar: recombinação durante a meiose; o controle da replicação; a estabilização e manutenção da expressão gênica; e a regulação da diferenciação celular (Oliveira *et al.*, 2010). Além disso, a metilação do DNA também controla uma série de fatores relacionados ao crescimento celular. Isto inclui genes supressores de tumor que são ativados em células normais, porém, muitas vezes, silenciados no câncer (Shaw, 2006). A perda dos mecanismos de controle por eventos epigenéticos pode resultar em instabilidade genômica, acúmulo de danos no DNA, proliferação celular descontrolada e eventualmente o desenvolvimento de tumor (Macaluso *et al.*, 2003).

Em tumores, podemos observar principalmente dois tipos de alterações: 1) silenciamento transcricional de genes supressores de tumor por hipermetilação das ilhas CpG dos promotores e 2) hipometilação genômica global (Esteller, 2006; Kulis e Esteller, 2010). Acredita-se que a hipometilação é responsável pela iniciação e propagação da carcinogênese por meio de indução de instabilidade cromossômica e ativação transcricional de oncogenes (Tost, 2009). O estado de metilação de ilhas CpG pode ser utilizado para caracterizar e classificar os diferentes tipos tumores, servindo também como um ponto de partida para o desenvolvimento de novas terapias e tratamentos antineoplásicos, uma vez que

as metilações do DNA são potencialmente reversíveis, ao contrário das mutações genéticas (Tost, 2009; Oliveira *et al.*, 2010).

Em células tumorais, regiões promotoras de genes supressores de tumor tornam-se hipermetiladas, resultando em seu parcial ou total silenciamento e perda de metilação do genoma (hipometilação). Os onco-supressores representam importantes fatores de risco para o desenvolvimento do câncer, possibilitando às células transformadas evitarem a apoptose, tornarem-se insensíveis aos sinais de parada do ciclo celular e aumentar o seu potencial de proliferação, além de produzir sinais de crescimento que possibilitam a angiogênese em estágios avançados do câncer, a invasão tecidual (metástase) (Scarano *et al.*, 2005).

Em situações normais, os genes supressores de tumor podem induzir células mutadas a apoptose. Um exemplo é a p53, uma proteína supressora de tumor que, em resposta a detecção de um dano no DNA, pode provocar apoptose pela superregulação da expressão de genes pró-apoptóticos, como o *BAX*, que por sua vez estimula as mitocôndrias a liberar o citocromo-c (Hanahan e Weinberg, 2000). O citocromo-c é uma proteína presente no espaço existente entre as membranas mitocondriais interna e externa e, quando liberado para o citosol forma um complexo com a apaf-1 (complexo ativador da apoptose - apoptossomo), levando à ativação da caspase-9, que por sua vez ativa caspases efetoras como a caspase 3 (Parolin e Reason, 2001) (Figura 2). Diferentes níveis de caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10 são expressos em CEC primário de boca, estando praticamente ausentes na mucosa oral normal. A diminuição de caspase 3 neste tipo de tumor está associada à invasão vascular, metástases linfonodais e avanços na classificação de estadiamento clínico (T do tumor) (Coutinho-Camillo *et al.*, 2011).

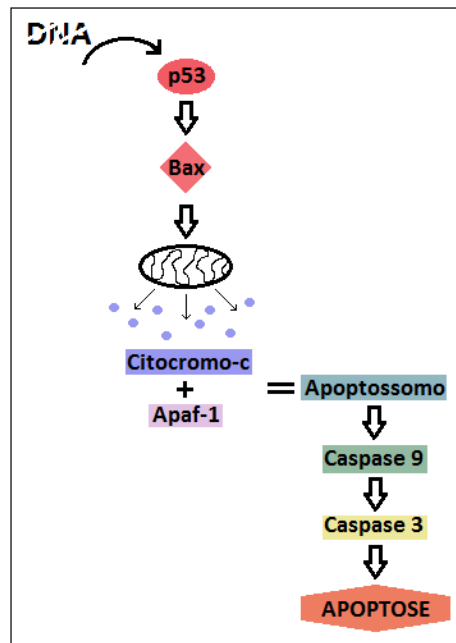


Figura 2 - Cascata metabólica da apoptose. A proteína p53 detecta o dano no DNA e inicia a cascata de apoptose.

A cascata de reações, que leva à morte celular, promove a clivagem de reguladores de apoptose e de proteínas, além da fragmentação do DNA (Nuñez *et al.*, 1998) (Figura 2). Isso impede a formação e proliferação de tumores, porém, a metilação destes genes supressores de tumor tem se mostrado uma alteração frequente. Além disso, o número de genes relacionados a câncer que apresentam hipermetilação em regiões normalmente não metiladas, tem crescido. A metilação pode ocorrer em genes implicados em diferentes funções durante o desenvolvimento do câncer, não só em genes supressores de tumor (*TP14*, *TP15*, *TP16*, *TP73* e *BRCA1*), bem como em genes envolvidos com o reparo do DNA (*hMLH1* e *MGMT*) e invasão e metástase (*CDH1*, *ECAD*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *DAPK*) (Russo *et al.*, 2005).

Grande parte dos genes desempenham múltiplas funções durante o ciclo de vida do indivíduo e da célula. Os genes *SFRP1* e *SFRP2* (*secreted frizzled-related protein*) pertencem a uma família de cinco glicoproteínas segregadas identificadas como moduladores negativos da via de transdução de

sinal Wnt (Heller *et al.*, 2002). Esta via, evolutivamente conservada, tem importante papel durante o desenvolvimento embrionário, proliferação celular, ciclo celular, diferenciação, apoptose e homeostase (Teo e Kahn, 2010). Devido ao envolvimento desta via em grande parte das ações metabólicas da célula, genes relacionados a ela vêm sendo estudados para diferentes tipos de câncer. O gene *SFRP1* tem sido descrito como um marcador tumoral associado ao prognóstico desfavorável em câncer de mama (Veeck *et al.*, 2006) e pacientes com carcinoma renal de células claras (Ricketts *et al.*, 2014). Da mesma forma, a hipermetilação aberrante do gene *SFRP2* mostra-se um importante biomarcador em câncer de próstata (Perry *et al.*, 2013), de mama (Veeck *et al.*, 2008) e colorretal (Wang e Tang, 2008). Ambos os genes foram identificados como supressores de tumor com baixa expressão em diversos tipos de câncer (Dahl *et al.*, 2007). Da mesma forma, o gene *TP73* é um gene supressor de tumor. *TP73* é homólogo ao gene *TP53* tanto na sequência de DNA como na estrutura da proteína (Liu *et al.*, 2013). O gene *TP53* pertence a uma pequena família que inclui, em mamíferos, dois ortólogos adicionais, o gene *TP63* e *TP73* (Costanzo *et al.*, 2014). As inúmeras reações bioquímicas cruzadas entre os membros desta família sugerem uma rede funcional que pode influenciar diferentes aspectos da ação individual de cada gene (Moll *et al.*, 2003). Como por exemplo, quando ocorre a interação entre o *TP53* mutado e o *TP73*. Neste caso este último é inativado, podendo colaborar com a tumorigênese (Gaiddon *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

A correlação entre as alterações moleculares promovidas pela inflamação e o câncer vêm sendo demonstrada por diferentes estudos. A compreensão de como ocorrem e quais são estas alterações pode auxiliar no prognóstico e em futuras terapias para estas doenças. Para isso, são necessários estudos correlacionando estas alterações com o estado de normalidade bem como entender de que forma essas modificações podem influenciar na

tumorigênese. Com base nisso dividimos o trabalho em dois estudos com objetivos específicos para cada um.

- 1- Investigar a correlação entre alterações epigenéticas e expressão gênica de genes supressores tumorais - *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73* - em tecidos bucais humanos provenientes de indivíduos afetados pela inflamação periodontal crônica ou CEC em relação ao tecido normal;
- 2- Analisar o padrão epigenético em tecidos periféricos ao tumor por meio da técnica *COBRA-LINE1*, comparando tecidos homogeneizados e microdissecados provenientes de: biopsias de CEC bucal, margem tumoral e tecidos bucais saudáveis.

FLUXOGRAMA

As Figura 3 e Figura 4 mostram os fluxogramas dos principais procedimentos metodológicos utilizados para a realização deste trabalho. Nota-se que a pesquisa foi desenvolvida em duas etapas: (1) estudo com tecidos humanos provenientes de gengiva saudável, inflamação crônica e tumor; (2) estudo com tecidos humanos provenientes de gengiva saudável, margem tumoral e tumor.

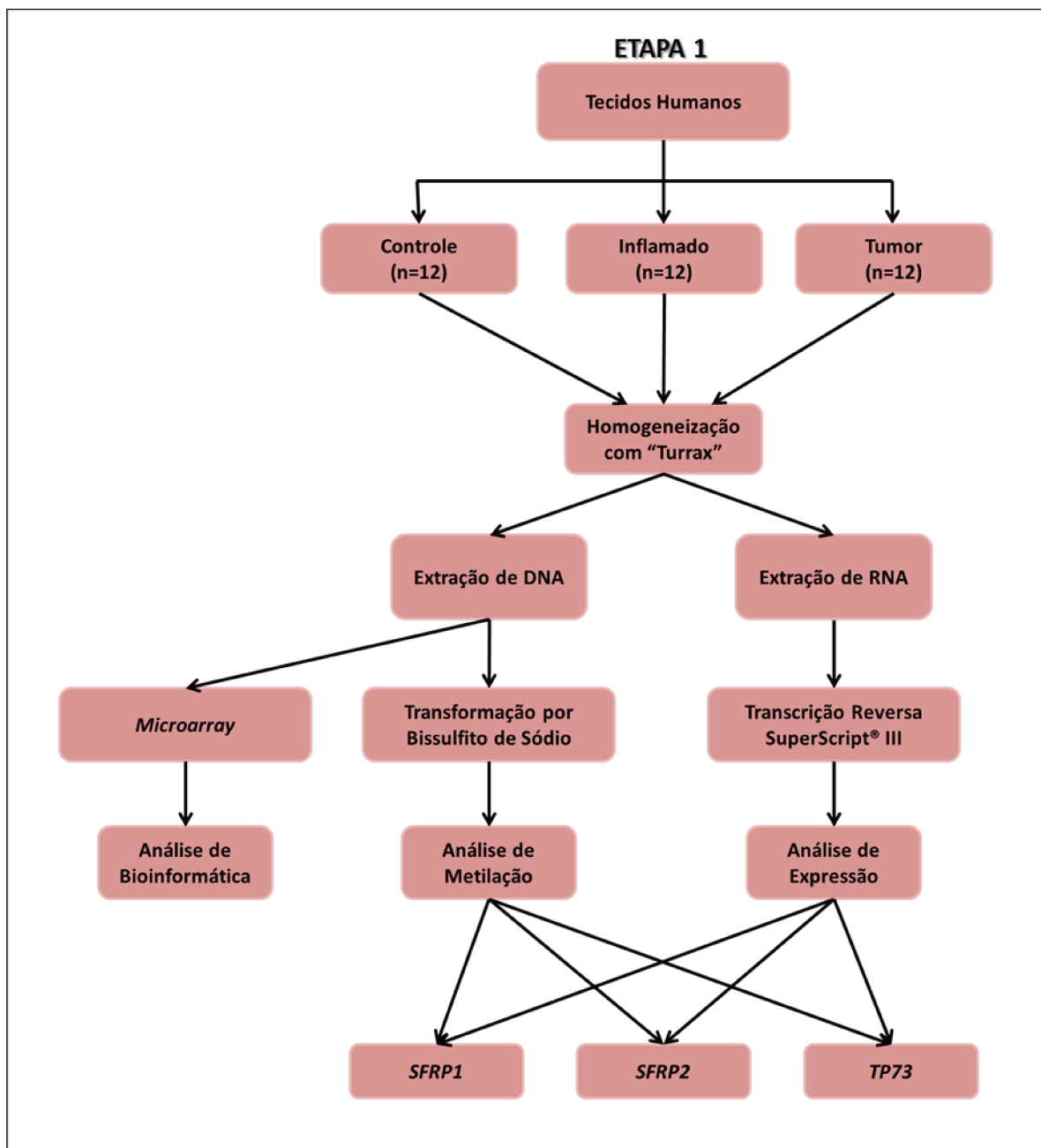


Figura 3 - Fluxograma metodológico - capítulo 1.

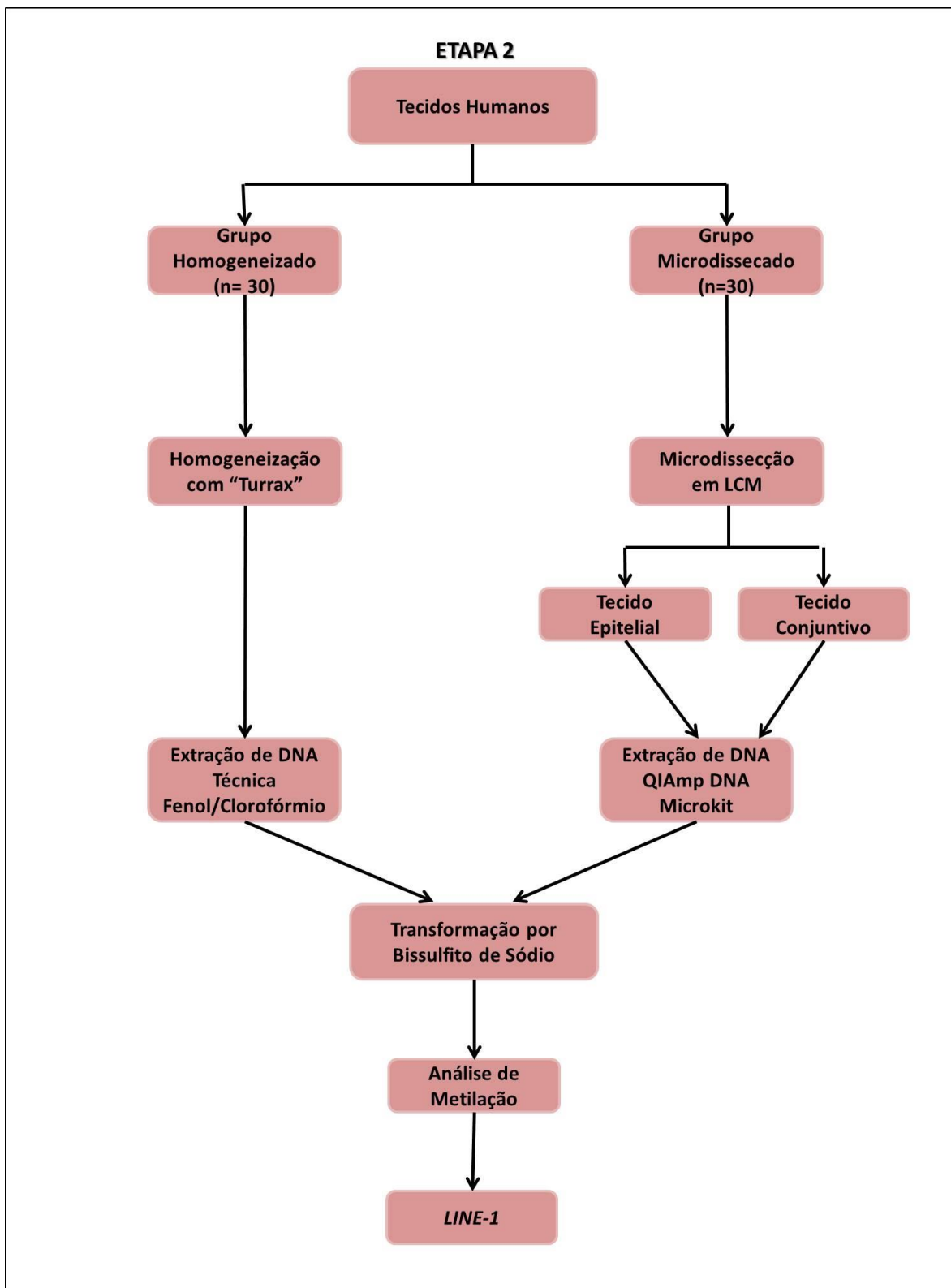


Figura 4 - Fluxograma metodológico - capítulo 2.

CAPÍTULO 1 – ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES *SFPR1*, *SFPR2* E *TP73* EM CÂNCER ORAL, PERIODONTITE CRÔNICA E TECIDO NORMAL.

1.1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um microambiente que cria condições para o desenvolvimento de diferentes doenças como ulcerações, gengivite e periodontite. Evidências clínicas e epidemiológicas sugerem que o risco de câncer aumenta quando associado a agentes infecciosos e inflamação (Rajesh *et al.*, 2013). As duas doenças bucais de origem microbiana mais prevalentes são a gengivite e a periodontite crônica (Seymour *et al.*, 2007), sendo última a infecção crônica mais comum em adultos (Loesche e Grossman, 2001). A periodontite é causada por microrganismos capazes de levar à formação de bolsa periodontal e recessão do tecido gengival em resposta ao acúmulo de bactérias. A consequência mais grave da periodontite é a destruição do tecido ósseo. A progressão da periodontite é multifatorial, pois depende da natureza e da virulência do patógeno e da intensidade da resposta do hospedeiro a esta agressão, resultando na liberação de citocinas inflamatórias, prostaglandinas, fatores de crescimento e enzimas, as quais estão muitas vezes intimamente relacionadas ao desenvolvimento de câncer (Tezal *et al.*, 2007; Detert *et al.*, 2010).

A presença de leucócitos nas áreas tumorais observada no século XIX por Rudolf Virchow forneceu a primeira indicação de uma possível ligação entre a resposta inflamatória e o câncer. Contudo, foi somente durante a última década que surgiram evidências claras de que a inflamação desempenha um papel fundamental na tumorigênese (Karin, 2008). Hoje em dia já se aceita que a inflamação tenha um papel importante no processo de desenvolvimento de tumores, sendo o microambiente inflamatório considerado um componente favorável a todos os tipos de tumores, incluindo aqueles cuja relação direta ainda não foi confirmada (Mantovani *et al.*, 2008). Apenas uma minoria dos cânceres é causada por mutações germinativas. A grande maioria, cerca de 90%, está

associada a mutações somáticas e fatores ambientais, sendo que 20% dos tumores estão ligados a infecções crônicas, 30% podem ser atribuídos ao fumo e poluentes inalados (tais como a sílica e amianto) e 35% a fatores nutricionais, destes, 20% estão ligados à obesidade (Aggarwal *et al.*, 2009).

Na tentativa de explicar as relações entre inflamação crônica e câncer, diferentes teorias têm sido sugeridas, uma delas se refere às alterações epigenéticas. Metilação do DNA, modificação de histonas, posicionamento de nucleossomos ao longo do DNA, RNAs não codificantes e micro-RNAs formam o conjunto que hoje denominamos epigenoma. O termo "epigenética" é definido como quaisquer alterações meiótica e mitoticamente hereditárias que promovam alterações transitórias na expressão de genes, porém sem alterar a sequência do DNA (Egger *et al.*, 2004; Hirst e Marra, 2009). A metilação do DNA é um mecanismo molecular que as células utilizam durante o seu ciclo de vida, sendo essencial para a morfogênese. Ratos depletados para as enzimas da família das DNA metiltransferases (DNMT) morrem no início do desenvolvimento, pois a ausência ou redução destas enzimas podem provocar a diminuição dos níveis de metilação e consequentemente a morte da célula (Suzuki e Bird, 2008). No entanto, numa outra situação, genes essenciais podem ser inativados por metilação aberrante, podendo ter sua expressão alterada ou até mesmo silenciada, comprometendo sua função (Ushijima e Asada, 2010). Recentemente, tornou-se claro que o silenciamento epigenético aberrante de genes supressores de tumores por hipermetilação da região promotora do DNA desempenha um papel importante na patogênese do câncer (Hellebrekers *et al.*, 2007). Durante a transformação maligna é relatado o silenciamento epigenético de importantes genes supressores tumorais (Reu *et al.*, 2006). Neste contexto, uma família de cinco glicoproteínas segregadas, as *secreted frizzled-related protein* (SFRPs), foram identificadas como possíveis moduladores negativos da via de transdução de sinal Wnt (Heller *et al.*, 2002). Estes genes foram identificados como genes supressores de tumor com baixa expressão em diversos tipos de câncer (Dahl *et al.*, 2007). A baixa regulação de membros da família SFRP por hipermetilação foi

relatada recentemente em várias neoplasias humanas, incluindo tumor gástrico, cervical, hepatocelular, de pâncreas, de células escamosas oral (CEC), mama, cólon e de bexiga (Urakami *et al.*, 2006; Veeck *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009) e a supressão ou a regulação negativa da expressão dos genes *SFRP1* (8p11.2) e *SFRP2* (4q31.3) parece ser um evento-chave no início da tumorigênese (Esteve e Bovolenta, 2010).

Tal como acontece com os genes *SFRPs*, *TP73* (1p36.3) é um gene supressor de tumor. *TP73* é homólogo ao gene *TP53* tanto na sequência de DNA como na estrutura da proteína (Liu *et al.*, 2013). *TP73* coopera com *TP53* na indução de apoptose. No entanto, quando ocorre a interação entre o *TP53* mutado e o *TP73*, este último é inativado, o que pode colaborar com a tumorigênese (Gaiddon *et al.*, 2001). Além disso, há outras formas de inativação do gene *TP73*, uma delas é a metilação da molécula de DNA (Kasamatsu *et al.*, 2011).

Desta forma e, baseado em estudos anteriores em tumores de intestino, hipotetizamos que os genes *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73* são epigeneticamente desregulados por metilação do DNA. Para responder ao nosso questionamento, examinamos o estado de metilação de alguns dinucleotídeos CpG destes genes através da técnica *COmbined Bisulfite Restriction Analysis* (COBRA). Também examinamos a expressão gênica para verificar a influência das doenças nas suas expressões. Para tanto utilizamos a PCR quantitativa (qPCR). Por fim, submetemos os resultados à análise de correlação entre o estado de metilação e expressão gênica. Para obter os resultados foram utilizadas amostras de tecido gengival de portadores de periodontite crônica e de carcinoma espinocelular de boca os quais foram comparados com tecidos orais normais em um total de 36 amostras, 12 de cada grupo.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Local da Pesquisa e Obtenção das Amostras

Trinta e seis pacientes participaram deste estudo: 12 pacientes saudáveis (grupo controle - C); 12 pacientes com periodontite crônica (grupo PCr)

e 12 pacientes com carcinoma espinocelular de boca (grupo CEC). Os indivíduos foram recrutados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, durante o período de agosto de 2012 a novembro de 2013. A Divisão de Periodontia foi responsável pela coleta das amostras dos grupos PCr e C e a Divisão de Patologia Bucal pelo grupo CEC. Este estudo foi aprovado institucionalmente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (protocolo número 087/2013 e 058/2012 – Anexos I e II) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por cada um dos voluntários da pesquisa após explicações e dúvidas sanadas (Apêndice I e II).

Os critérios de inclusão foram:

(A) Grupo controle (C): adultos (35 anos ou mais); não etilistas ou tabagistas, ausência de doenças dos tecidos bucais duros ou moles (exceto cárie), sem mobilidade dentária, profundidade de sondagem ≤ 3 mm, ausência de doenças sistêmicas ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, ausência de gravidez ou lactação atual;

(B) Grupo periodontite crônica (PCr): adultos (35 anos ou mais de idade); não etilistas ou tabagistas, ausência de doenças dos tecidos bucais duros ou moles (exceto cárie e periodontite), bom estado geral de saúde, ausência de uso crônico de drogas anti-inflamatórias, ausência de gravidez atual ou lactação e avaliação periodontal positiva para periodontite crônica com diagnóstico e classificação de periodontite crônica generalizada, de acordo com o Consenso de 1999 - Classificação de Doenças Periodontais (Armitage, 1999); periodontite crônica generalizada com presença de, pelo menos, oito dentes com uma bolsa periodontal mais profunda que 5 mm (dois dos oito com profundidade de sondagem ≥ 7 mm), sangramento positivo após sondagem, perda de massa óssea generalizada e que possuíam pelo menos 20 dentes em cada arcada dentária;

(C) Grupo carcinoma espinocelular de boca (CEC): adultos (18 anos ou mais); fumantes ou não, etilistas ou não, independente da condição sistêmica, desde que fosse possível realizar a cirurgia. Esses pacientes tinham suspeita de

CEC e, por este motivo, foram submetidos à biópsia. Somente após a confirmação do diagnóstico os voluntários foram convidados a participar da pesquisa.

Coleta e Processamento das Amostras

Grupo controle e grupo periodontite crônica: Todos os pacientes incluídos neste grupo foram submetidos à terapia periodontal básica. Biópsias cirúrgicas foram realizadas a partir de um colar gengival removido ao redor dos dentes. No grupo saudável este procedimento cirúrgico foi realizado por razões estéticas (p.ex. gengivoplastias). Na periodontite, a cirurgia foi realizada como parte do tratamento cirúrgico para controle da doença periodontal. Seja para a redução da bolsa, para aumentar o comprimento da coroa clínica - por diversas razões – ou para raspagem e alisamento em campo aberto.

Grupo carcinoma espinocelular: Todos os pacientes incluídos neste grupo foram submetidos a procedimentos de biópsia devido às suspeitas de CEC. Cerca de 2 - 5 mm de tecido foram removidos e encaminhados para análise histopatológica. Após confirmação, uma parte de cada amostra foi processada para a pesquisa.

Após os procedimentos de biossegurança e anestesia pela técnica de bloqueio nervoso o tecido de interesse foi removido. Para obter resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras foram rapidamente armazenadas em meio adequado (Tissue - Tek® composto OCT, Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, EUA) e imediatamente congeladas e mantidas em biofreezer a -80 °C, para manutenção da integridade da célula e preservação do ácido ribonucléico (RNA) e DNA genômico (gDNA).

Extração de RNA e gDNA

Os ácidos nucleicos totais foram extraídos a partir de cada amostra por homogeneização de tecidos. O procedimento foi feito com a ajuda de aparelho homogeneizador (Turrax MA102 / MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil) sob refrigeração. Os tubos de plástico contendo solução de extração (10 mM Tris-HCl

(pH 8,0), EDTA 5 mM e SDS a 0,5%) e os tecidos de interesse foram individualmente acondicionados em *racks* tipo biocooler. A extração de DNA foi realizada pela purificação pela sequência de extração de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, seguida de precipitação com citrato de sódio e etanol, como descrito por Trevilatto e Line (2000). Para isolar o RNA das amostras, o método que utiliza Trizol®/clorofórmio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguido de isopropanol foi aplicado de acordo com as especificações do fabricante. Imediatamente após a extração, os ácidos nucleicos presentes em cada eluição foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) para verificar a concentração e a pureza do RNA e do gDNA. Em seguida, o RNA extraído foi armazenado a -80 °C e gDNAs a -20 °C, para posterior utilização.

Transcrição Reversa (RT) e Análise de Expressão

Previamente ao processo de transcriptase-reversa, a qualidade do RNA foi testada em gel de eletroforese. Para isso, as amostras foram submetidas a um gel de agarose a 1% corado com *Gel Red* 0,2 µg/mL (Uniscience, São Paulo, SP, Brasil). O gel foi analisado em fotodocumentador para visualização das amostras sob luz UV (MultiDoc-It™ Imaging System, Benchtop transiluminador UV, Upland, CA, EUA). A qualidade do RNA foi avaliada pelo exame da intensidade relativa das bandas 28S e 18S sendo que a banda 28S deveria ser mais brilhante do que a banda 18S. Somente após a confirmação da qualidade dos RNAs é que as amostras foram transcritas em cDNAs (DNAs complementares). Para a transcrição reversa, 2000 ng de RNA total foram utilizadas para a reação de transcrição com o sistema *SuperScript* III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Para a análise de expressão utilizou-se qPCR. O gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle de normalização e as sequências dos *primers* utilizados foram: *foward* 5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3' e *reverse* 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'. A cada poço de uma placa de PCR de 96 poços foram adicionados 1 µl de cDNA,

5 µL de *SYBR Green I Master Mix* (LightCycler® 480, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA), 3,2 µl de água RNase *free* e 8 pmol de cada *primer*, para um volume final de 10 µl. As condições dos ciclos de qPCR incluíram uma desnaturação inicial de 95 °C por 10 min, seguida de 45 ciclos de: 95 °C por 15 s, 56 °C por 15 s e 72 °C por 15 s. Três genes específicos foram selecionados para análise de expressão: *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73*. As mesma quantidades de cDNA e reagentes, bem como as concentrações utilizadas na análise do *GAPDH*, foram utilizadas para os ensaios de cada um dos genes específicos. Apenas os *primers* diferiam na sua sequência, de acordo com o gene estudado. Os *primers* e as condições de PCR estão descritas na Tabela 1. Em todos os ensaios, foram incluídos um controle negativo contendo solução de água RNase *free* e *primers*, sem cDNA. Todas as reações foram feitas em duplicata para todos os genes de interesse - *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73* - como para o gene de normalização - *GAPDH*. A análise das curvas de *melting* foi realizada em rampas de aquecimento de 65 °C a 95 °C com 25 aquisições/°C.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* para análise de expressão, ciclagem e condições da PCR.

mRNA	Primer	Sequência	Autores	Ciclos	Condições
SFRP1	Forward	5'-CACAACGTGGGCTACAAGAA-3'	Veeck et al., 2006	45	95°C - 20 s
	Reverse	5'-GAAGTGGTGGCTGAGGTTGT-3'			60°C - 20 s 72°C - 30 s
SFRP2	Forward	5'-ATCGGTGCTGTGGCTCAA-3'	Zhao et al., 2009	45	94°C - 30 s
	Reverse	5'-CATCAGGATGCCGGGACT-3'			58°C - 30 s 72°C - 30 s
TP73	Forward	5'-CGGGACGGACGCCGATG-3'	Zaika et al., 1999	45	94°C - 30 s
	Reverse	5'-CTTGCGATCTGGCAGTAG-3'			58°C - 30 s 68°C - 45 s

Modificação por Bissulfito de Sódio

Depois de extraído, 300 ng de gDNA foram modificados por bissulfito de sódio, utilizando *Methyl SEQR™ Bisulfite Conversion Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Durante a

reação, o bissulfito de sódio altera seletivamente as citosinas não metiladas, convertendo-as em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem sem reagir (Figura 5). Os DNAs convertidos foram ressuspensos em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8 - 8,5, com EDTA 1 mM) em volume final de 40 µL e armazenados a 4 °C.

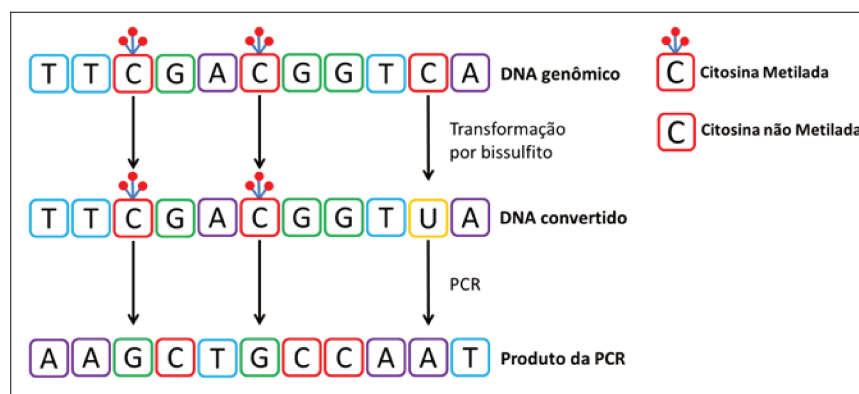


Figura 5 - Transformação por bissulfito de sódio. Na transformação apenas as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas e transcritas como adeninas durante a PCR. As citosinas metiladas permanecem inalteradas e durante a amplificação são transcritas como guaninas.

Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)

O padrão de metilação dos genes foi analisado pelo sistema COBRA que combina a modificação por bissulfito, a amplificação da região de interesse por PCR e digestão por enzimas de restrição específicas (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). As análises foram realizadas em duplicata em todas as amostras. Inicialmente, 6 ng de DNA modificados por bissulfito foram amplificados em reação contendo: *Go Taq Green Master Mix* (Promega Corporations, Madison, WI, EUA), 10 mM de cada conjunto de *primers* (Tabela 2) e água RNase free para completar o volume final. Os parâmetros das ciclagens estão listados na Tabela 2. Posteriormente, metade dos produtos de amplificação foram digeridos por enzimas de restrições. Estas enzimas reconhecem regiões específicas do DNA clivando-o. Quando as citosinas estão metiladas no DNA genômico não ocorre alteração destas durante o processo de modificação por bissulfito, com isso, após

a PCR, estas enzimas de restrição são capazes de identificar estas citosinas e, conforme a enzima pode ou não clivar estas regiões. A outra parte foi submetida às mesmas condições das soluções digeridas, porém sem enzima. Padrões comerciais (*EpiTect® - PCR control DNA set*, QIAGEN, Mississauga, ON, CA), com níveis de metilação de 0% e 100%, estiveram presentes em cada uma das reações sendo sujeitos às mesmas condições as quais as 36 amostras foram submetidas. Estes controles foram incluídos em duplicatas em cada experimento.

Tabela 2 - Sequências dos *primers* para análise de metilação, ciclagem e condições da PCR.

Gene	Primer	Sequência	Amplicon	Autores	Ciclos	Condições
SFRP1 (set1)	Forward	5'-GGTTAGTAGTTGGGTGTTTTGTTTA-3'	272 bp	Caldwell et al., 2004	30	94°C - 20 s
	Reverse	5'-CCTTACCTTAAACTTAAAACTTC-3'				54°C - 30 s
	Forward-nested	5'-TTGGGTGTTTTGTTTAATAAGAATT-3'	194 bp		20 ¹	72°C - 40 s
	Reverse-nested	5'-AAACTTATCACACTTAAACATCTC-3'				
SFRP1 (set2)	Forward	5'-AGAAAAAGAAGGGGAATGGATT-3'	157 bp	new	40	95°C - 1 min
	Reverse	5'-AACRAAACTATCTCAAAAAAATAAT-3'				54°C - 1 min
						72°C - 1 min
SFRP2 (set1)	Forward	5'-GTYGGAGTTTTTYGGAGTTG-3'	139 bp	Nagasaka et al., 2009	35 ²	94°C - 20 s
	Reverse	5'-AACCCRCTCTCTCRCTAAATAC-3'				58°C - 30 s
SFRP2 (set2)	Forward	5'-GGTTGTTAGTTTTTYGGGGTTT-3'	153 bp		20 ³	72°C - 40 s
	Reverse	5'-CAACIAACCAAAACCTACAACAT-3'				95°C - 20 s
						54°C - 30 s
						72°C - 40 s
SFRP2 (set3)	Forward	5'-AAGTTTGGTYGTTGTTTTATAGT-3'	198 bp	new	40	95°C - 1 min
	Reverse	5'-CCCTCTCCCACTACACCTAACAA-3'				60°C - 1 min
						72°C - 1 min
TP73	Forward	5'-GGTATYGTATTYGGGTTATGTTTGT-3'	110 bp	new	37	94°C - 30 s
	Reverse	5'-CCCTCACCTTCRTTAAATCCCTC-3'				58°C - 30 s
						68°C - 45 s

¹ Uma reação *nested* foi realizada a partir da PCR inicial a qual foi diluída em água RNase *free* em uma proporção de 1:75.

² Diferente dos autores, PCR inicial foi realizada com *forward-set1* e *reverse-set2*, para realização de *nested*.

³ Uma reação *nested* foi realizada a partir da PCR inicial a qual foi diluída em água RNase *free* em uma proporção de 1:75.

A análise de metilação do gene *SFRP1* (NCBI RefSeq: NC_000008.10) foi realizada em duas regiões distintas (Figura 6). A primeira foi realizada de acordo com Caldwell e colaboradores (2004) e a segunda região através de um novo desenho de *primers*. Para o *set1* realizou-se uma PCR inicial com volume final de 10 µL a qual gerou *amplicons* com 272 bp (Cr8: 41.166.070 - 41.166.341)

e algumas bandas não específicas. Para melhorar a qualidade do produto amplificado reduzindo a quantidade de bandas inespecíficas uma reação *nested* foi feita a partir da PCR inicial em um volume final de 25 µL. Após a PCR-*nested* os *amplicons* gerados foram de 194 bp (Cr8: 41.166.198 - 41.166.391). Subsequentemente, 10 µL dos produtos gerados foram digeridos com as enzimas de restrição *TaqI*. Estas enzimas reconhecem e clivam sequências TCGA, caso contrário a sequência se altera para TTGA durante a modificação por bissulfito, a enzima não faz o reconhecimento e o *amplicom* permanece intacto. Para a segunda região analisada, um novo conjunto de *primers* foi desenhado na região promotora que compreende a posição 41.167.211 a 41.167.367. Após a PCR, em um volume final de 25 µl, 10 µl de solução de PCR foi submetida à digestão com a enzima de restrição *HpyCH4IV* que reconhece e cliva sequências ACGT da região amplificada que não sofreram alteração pela modificação por bissulfito.

A análise de metilação do gene *SFRP2* (NCBI RefSeq: NC_000004.11) foi feita em três regiões distintas (Figura 9). Duas delas foram realizadas da região descrita anteriormente (Nagasaka *et al.*, 2009) e a terceira em um novo desenho de *primers*. Diferente dos autores e devido à sobreposição das duas regiões por eles analisadas, neste artigo uma PCR inicial foi realizada com os *primers forward-set1* e *reverse-set2*. Em um volume final de 10 µL, a PCR gerou *amplicons* de 241 pb (Cr4: 154.710.066 - 154.710.116) e algumas bandas inespecíficas. Em seguida, 1 µL da PCR inicial foi diluído em 74 µL de água RNase free. A partir disso uma nova reação de PCR – *nested* - foi realizada para cada região em um volume final de 35 µl. Após segunda amplificação, 10 µL dos produtos gerados foram submetidos à digestão com *TaqI* e outros 10 µl com *HhaI*. A reação promovida pela enzima *TaqI* foi descrito acima. A enzima *HhaI* reconhece e cliva sequência GCGC quando ambas as citosinas estavam metiladas. Para a terceira região, um novo conjunto de *primers* foi desenhado na região promotora na posição compreendida entre 154.710.461 e 154.710.658. Depois da PCR, em um volume final de 25 µl, 10 µl de solução de PCR foi digerido com a enzima de

restrição *Bst*UI que reconhece e cliva sequência GCCG quando ambas as citosinas estão metiladas nesta região.

Para a análise de metilação do gene *TP73* (NCBI RefSeq: NG_017035.2) um novo conjunto de *primers* foi desenhado na região do quinto exon entre as posições 3.638.669 e 3.638.778. Depois de amplificado por PCR, em um volume final de 25 µl, 10 µl da solução foi digerida com *HpyCH4V* – conforme descrito anteriormente.

Análise do Padrão de Metilação dos Genes *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73*

As porcentagens de metilação foram obtidas pela comparação das intensidades dos *amplicons* digeridos e não digeridos. As amostras resultantes da digestão foram coradas com corante de ácidos nucleicos (*Gel Red*TM, Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) e em seguida submetidas à eletroforese em gel vertical de poliacrilamida a 8% corridas a 20 mA. A intensidade dos fragmentos analisados no gel foi quantificada em triplicata utilizando um programa de imagem (Scion Image for Windows Scion Corporation, NIH, EUA). A classificação dos níveis de metilação dependeu do estado de metilação dos dinucleotídeos CG em 5' e 3' das sequências de cada gene analisado.

Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para analisar os resultados de expressão, bem como para comparar os níveis de metilação de sítios CpG entre os grupos controle, periodontite crônica e carcinoma espinocelular de boca. Para avaliar a associação entre a expressão do mRNA e o padrão de metilação de cada gene foi realizada a correlação de Pearson. Foram considerados somente os resultados com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software de programa de estatístico (Bioestat 5.0 (Ayres, 2007)). O software de

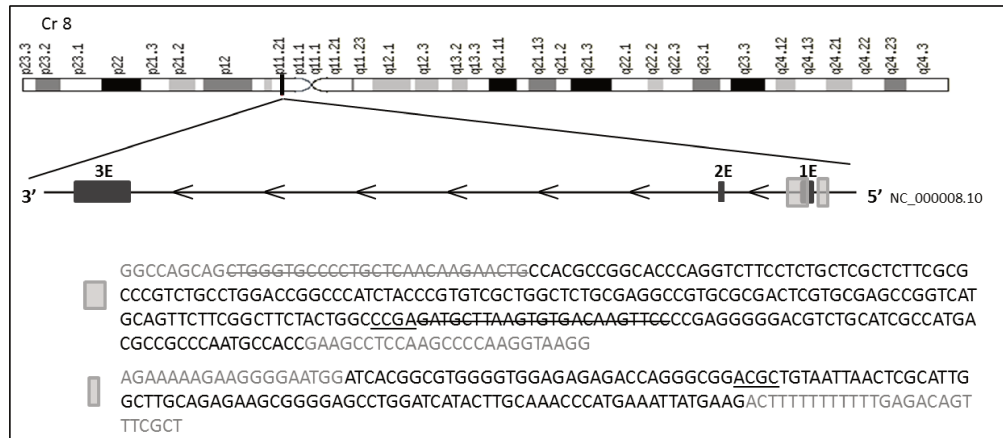
computação numérica Matlab 7.0 (Matrix Laboratory, no Novo México, EUA) foi utilizado para gerar os gráficos.

1.3 RESULTADOS

Níveis de metilação e variação de expressão entre os grupos controle, periodontite crônica e carcinoma espinocelular de boca.

As análises de metilação foram realizadas por ensaio COBRA em diferentes regiões dos genes *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73* no DNA proveniente de 36 amostras divididas em 3 grupos distintos: controle (C), periodontite crônica (PCr) e carcinoma espinocelular de boca (CEC). Os genes estudados estão envolvidos na regulação da proliferação celular (*SFRP1* - *SFRP2*) e apoptose (*TP73*). Os *primers* foram selecionados com base em estudos ou desenhados para esta pesquisa, ambos para análise COBRA (Tabela 2), para detecção de sequências metiladas. Os resultados foram obtidos a partir de amostras clivadas por enzimas de restrição para cada *amplicon* gerado e a porcentagem do estado de metilação (cortadas - C) foi calculada com base em amostras não digeridas (100% - não cortadas - NC). Os resultados foram apresentados como porcentagem média (\bar{x}) \pm desvio padrão do estado não metilado (NM). A análise do gene *SFRP1* foi realizada em dinucleotídeos CpG em duas regiões do gene (Figura 6A). Cada fragmento amplificado tinha apenas uma região a ser reconhecida pelas enzimas de restrição (Figura 6B).

A



B

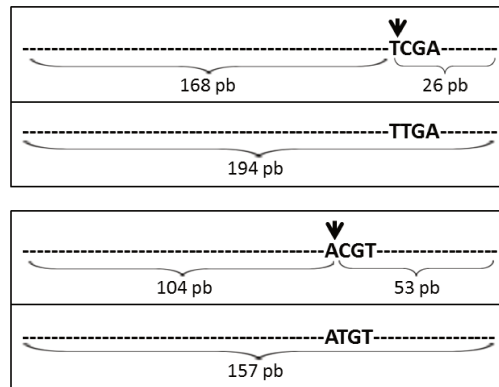


Figura 6 - Padrões de metilação de *SFRP1* detectados por análise COBRA. (A) representação esquemática do gene *SFRP1* no genoma. Os retângulos cinza escuros representam os três éxons (1E - 3E). A primeira região amplificada, representada na Figura como um quadrado cinza claro, está localizada na extremidade do primeiro éxon e se estende para o início do íntron. A segunda região situa-se no promotor do gene e está representada como um retângulo cinza claro. As sequências amplificadas mostram os *primers* em letras cinza. Para a primeira amplificação, o *primer nested* está marcado com ~~ta~~chado. As bases sublinhadas contendo dinucleotídeos CpG mostram as regiões passíveis de serem reconhecidas pelas enzimas de restrição *TaqI* (*set1*) e *HpyCH4IV* (*set2*). (B) mostra as duas possibilidades de sequências geradas após o tratamento com bissulfito para cada região amplificada. Notam-se os locais de atuação das enzimas de restrição e o tamanho dos fragmentos após o corte.

Ambos os grupos em ambas as regiões apresentaram-se mais hipometilados. O grupo CEC teve um percentual maior de hipometilação na primeira região (98,04%), onde diferenças nos níveis de metilação do DNA foram encontradas: CEC x C ($p = 0,0078$) e CEC x PCr ($p = 0,0025$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos C e PCr ($p = 0,4336$) (Figura 7).

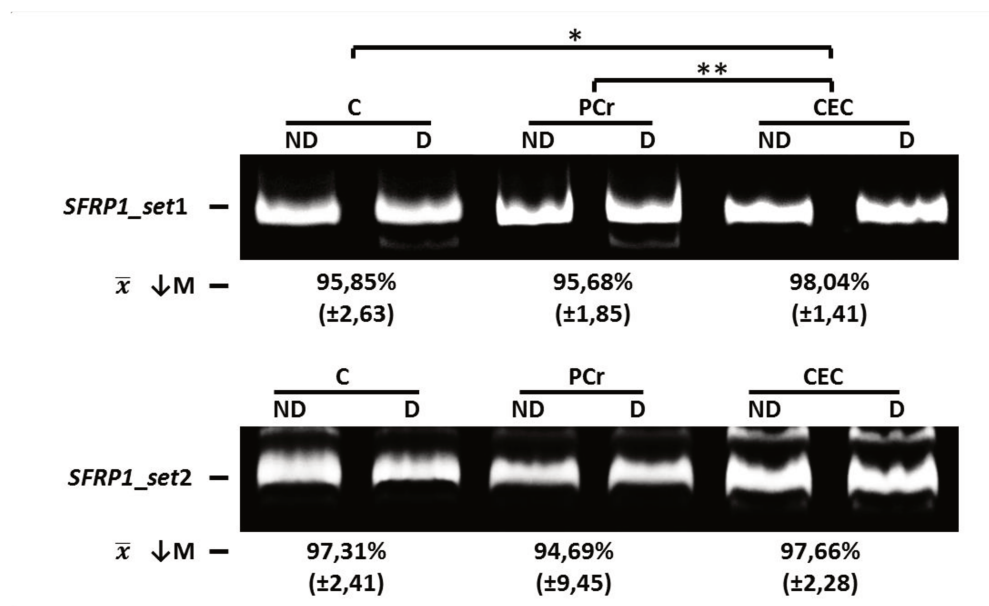


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida de produtos COBRA-*SFRP1*. A – representa os géis de poliacrilamida a 8%, após eletroforese para a análise COBRA-*SFRP1*. As amostras apresentam bandas de PCR não digeridas (ND) e digeridas (D). Abaixo do gel está indicada a média \pm desvio padrão das amostras hipometiladas ($\downarrow M$). Para o *set-1* houve diferenças estatísticas significativas entre CEC e C (*) e CEC em relação à PCr (**). Não houve diferenças estatísticas nas análises da segunda região estudada (teste de Kruskal-Wallis).

A expressão dos genes foi examinada nas mesmas 36 amostras pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (qPCR) e os resultados apresentados não mostraram diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 8).

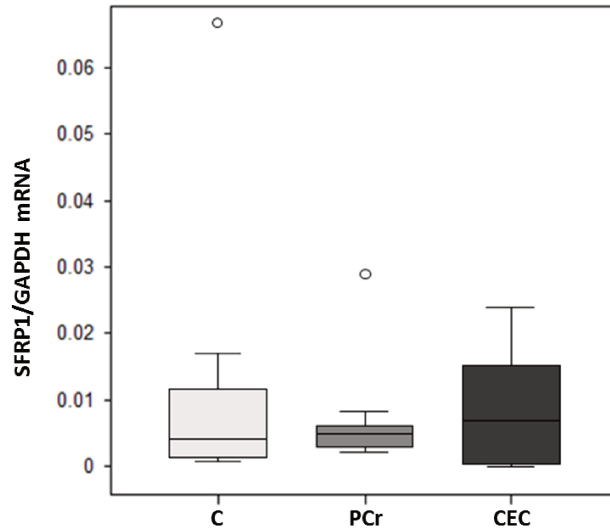


Figura 8 – Análise de expressão do gene *SFRP1*. Os gráficos *boxplot* mostram os níveis de *SFRP1* mRNA obtidos pela análise de qPCR. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$) (teste de Kruskal-Wallis).

As análises de metilação dos sítios CpG em genes *SFPR2* foi realizada em três regiões do gene (Figura 9A). Cada região amplificada tinha diferentes dinucleotídeos CpG para serem reconhecidas por enzimas de restrição específicas (Figura 9B-D). Para o *set3*, 5 regiões poderiam ser reconhecidas por endonucleases, resultando em 32 possíveis sequências¹ (Figura 9D).

¹ $\sum_{0 \leq k \leq n} \binom{n}{k} = 2^n$

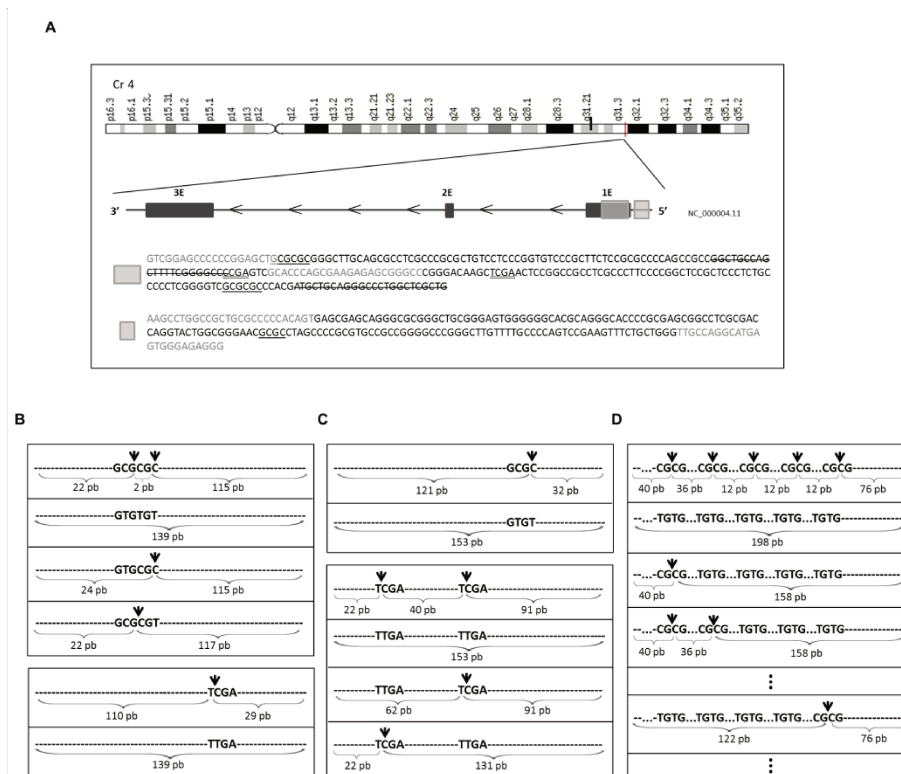


Figura 9 - Padrões de metilação de *SFRP2* detectados por análise COBRA. (A) representação esquemática do gene *SFRP2* no genoma. Os retângulos cinza escuros representam os três éxons (1E - 3E). A primeira e a segunda região amplificadas são complementares e estão localizados no primeiro éxon sendo representadas na figura como um retângulo cinza claro. A terceira região analisada situa-se no promotor do gene e está representada como um quadrado cinza claro. Para a primeira e a segunda região, uma amplificação inicial foi feita com os *primers*: *foward-set-1* e *reverse-set-2*. Subsequentemente *nested*s foram realizados. A primeira amplificação mostra a sequência dos *primers* em cinza, o segundo conjunto de *primers* está marcado com tachado. As bases sublinhadas contendo dinucleotídeos CpG mostram sequências passíveis de reconhecimento por enzimas de restrição *HhaI* (GCGC). As bases com sequências duplas sublinhada, são passíveis de reconhecimento pela *TaqI* (TCGA). Para a terceira região, as sequências amplificadas mostram *primers* em cinza com sequências passíveis de reconhecimento pela enzima *Bst*UI. (B-D) mostra as possibilidades de sequências geradas após o tratamento com bissulfito para cada região amplificada. Notam-se os locais de atuação das enzimas de restrição e o tamanho dos fragmentos após o corte (B – *set-1*; C - *set-2* e D - *set-3*).

Uma hipometilação global foi observada em todas as regiões analisadas. Embora apenas na terceira região a análise estatística mostra um resultado significativo com a hipometilação do grupo CEC menor quando comparado com o grupo de controle ($p = 3,41 \times 10^{-6}$), e com o grupo de PCr ($p = 6 \times 10^{-4}$). O grupo PCr também mostra diferença do grupo C ($p = 0,0057$). Na primeira e segunda região amplificada também ocorreu hipometilação, mas diferenças estatísticas não foram encontradas, mesmo quando as regiões cortadas por enzimas diferentes foram analisadas separadamente ($p > 0,05$) (Figura 10).

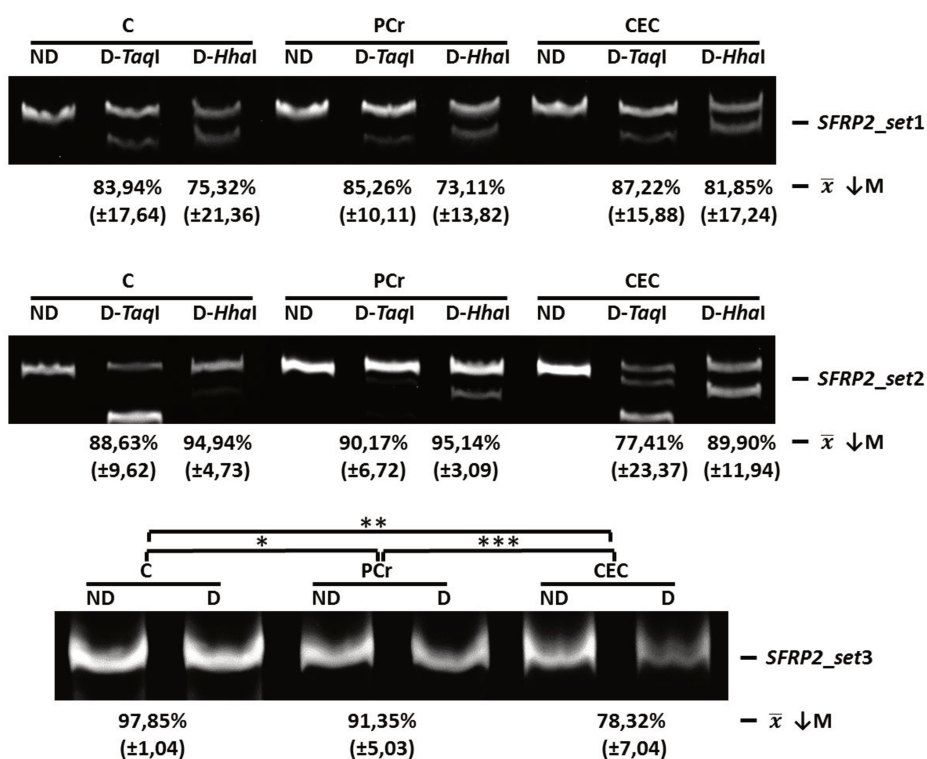


Figura 10 - Eletroforese em gel de poliácridamida de produtos COBRA-SFRP2. As amostras apresentam bandas de PCR não digeridas (ND) e digeridas (D). Abaixo do gel está indicada a média \pm desvio padrão das amostras hipometiladas ($\downarrow M$). Para o set-3 houve diferenças estatísticas significativas entre a PCr e C (*); CEC e C (**) e CEC em relação a PCr (***). Não houve diferenças estatísticas nas análises da primeira e da segunda região (teste de Kruskal-Wallis).

Os níveis de expressão de mRNA SFRP2 não mostraram diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 11).

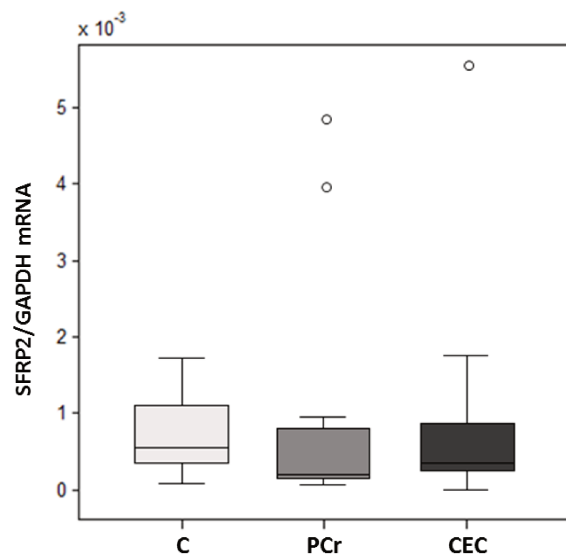


Figura 11 – Análise de expressão do gene *SFRP2*. Os gráficos *boxplot* mostram os níveis de SFRP2 mRNA. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$) (teste de Kruskal-Wallis).

Para o gene *TP73*, CpGs dentro do éxon 5 foram analisados (Figura 12A). Três regiões poderiam ser reconhecidas pelas endonucleases resultando em 8 sequências possíveis (Figura 12B).

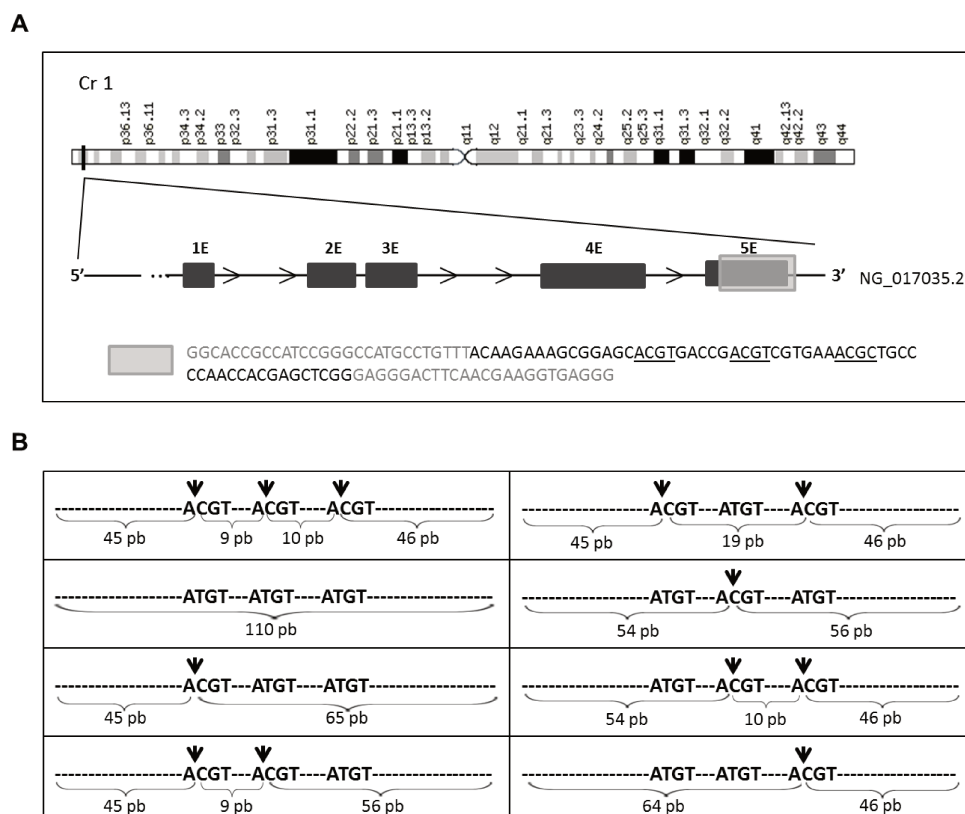


Figura 12 - Padrões de metilação de *TP73* detectados por análise COBRA. (A) representação esquemática do gene *TP73* no genoma. Os retângulos cinza escuros representam os cinco éxons (1E - 5E). O retângulo cinza claro representa a região de DNA estudada. A sequência amplificada mostra os *primers* em letras cinza. As bases sublinhadas contendo dinucleotídeos CpG mostram as regiões passíveis de serem reconhecidas pela enzima de restrição *HpyCH4IV*. (B) mostra as 8 possibilidades de sequências geradas após o tratamento com bissulfito, os respectivos locais de restrição e o tamanho dos fragmentos após o corte.

Diferenças nos níveis de metilação do DNA foram encontradas quando os resultados dos grupos foram comparados. Ambos os grupos mostraram hipermetilação. No entanto, o grupo CEC teve um percentual maior de metilação. Tanto quando comparado com o grupo de controle ($p = 0,0017$) quando comparado como o grupo de PCr ($p = 0,0079$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos C e PCr ($p = 0,3694$) (Figura 13).

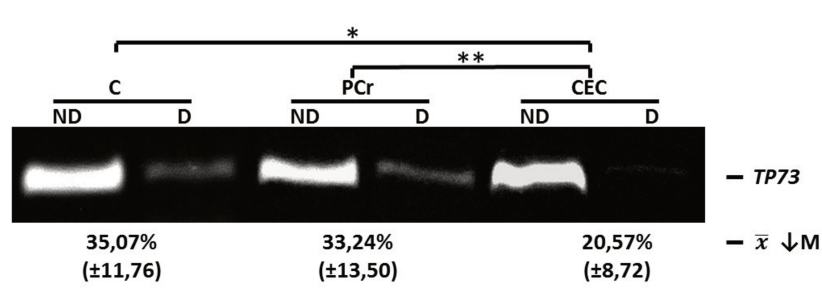


Figura 13 – Eletrofores em gel de poliacrilamida de produtos COBRA-*TP73*. As amostras apresentam bandas de PCR não digeridas (ND) e digeridas (D). Abaixo do gel está indicada a média \pm desvio padrão das amostras hipometiladas ($\downarrow M$). Houve diferenças estatísticas significativas entre CEC e C (*) e CEC em relação à PCr (**) (teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados obtidos para a expressão do gene *TP73* revelaram uma significativa redução em amostras de tumor quando comparadas com o controle ($p = 0,0483$). Não foram encontradas diferenças em relação às amostras inflamadas ($p > 0,05$) (Figura 14).

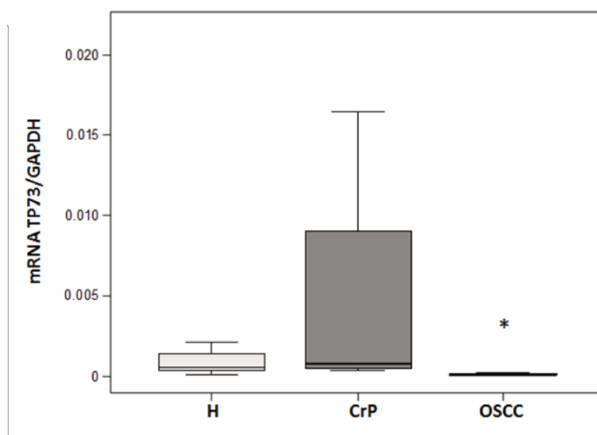


Figura 14 – Análise de expressão do gene *TP73*.s gráficos *boxplot* mostram os níveis de *TP73* mRNA. Houve diferença estatística significativa entre CEC e C (* $p < 0,05$). Não houve diferenças estatísticas entre PCr x C e PCr x CEC ($p > 0,05$) (teste de Kruskal-Wallis).

Correlação entre metilação e expressão dos genes

A associação entre a metilação do DNA e os níveis de mRNA de SFRP1, SFRP2 e TP73 nos grupos foi analisada pro correlação de Pearson. Para esta análise os resultados de correlação são apresentados em um gráfico de dispersão. Não foram observadas correlações positivas ou negativas estatisticamente significativas entre a metilação do DNA e expressão gênica em ambas as amostras ($p > 0,05$) (Figura 15).

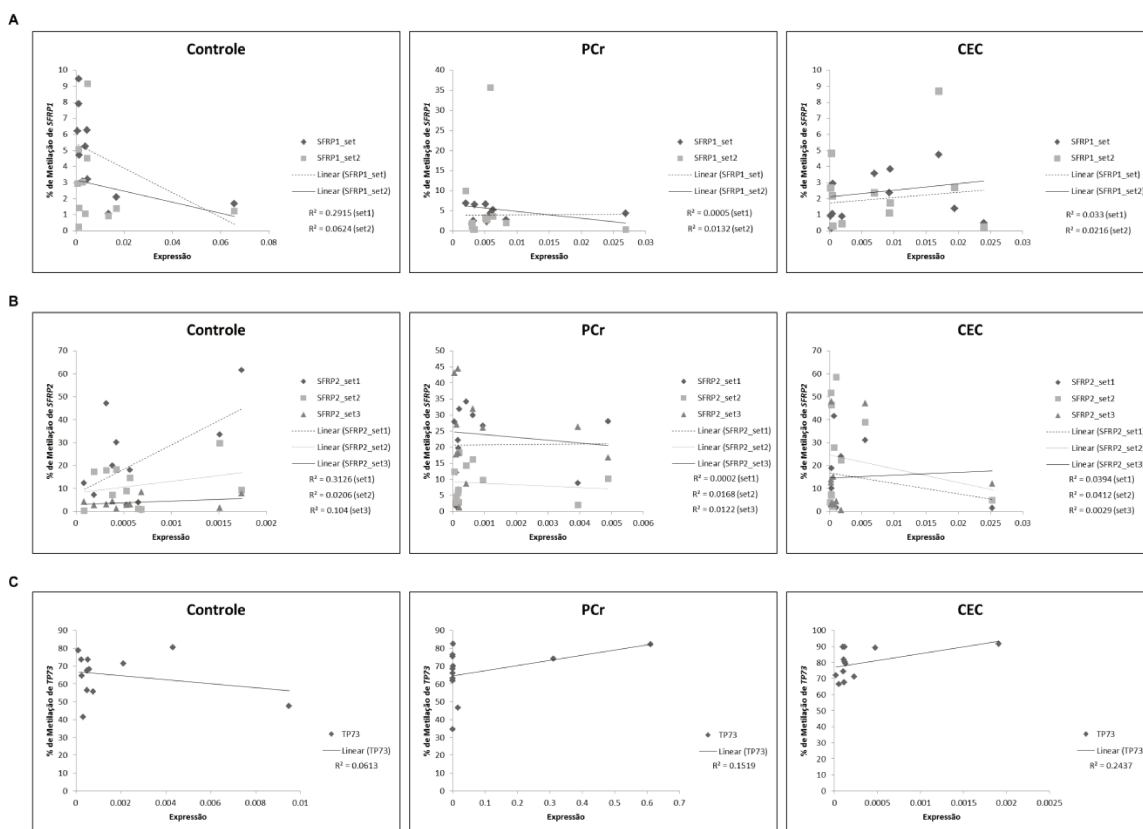


Figura 15 - Correlação entre os níveis de metilação e expressão gênica. (A) correlação entre o estado de metilação dos dois *sets* de *SFRP1* e a expressão de SFRP1 mRNA. (B) correlação entre o estado de metilação dos três *sets* de *SFRP2* e a expressão de SFRP2 mRNA. C - correlação entre o estado de metilação de *TP73* e a expressão de TP73 mRNA. Não houve diferenças estatísticas nas análises ($p > 0,05$) (coeficiente de correlação de Pearson).

1.4 DISCUSSÃO

Muitos estudos mostram que a susceptibilidade ao câncer aumenta quando os tecidos estão cronicamente inflamados, porém o caminho molecular permanece desconhecido (Balkwill e Mantovani, 2001; Meurman e Uittamo, 2008; Abdel-Latif, 2009). No entanto, há evidências de que os anticorpos podem conduzir a inflamação ao câncer (de Visser *et al.*, 2005). Além disso, a utilização de drogas anti-inflamatórias não esteróides por longo prazo reduzem o risco de muitos tipos de câncer (Gupta e Dubois, 2001), através da diminuição da hipermetilação do DNA de genes importantes para a carcinogênese (Pereira *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2010). A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que frequentemente ocorre em regiões ricas em CpG (ilha CpG) sendo capaz de regular a expressão gênica. Ilhas CpG normalmente não são metiladas em células normais, o que permite a transcrição do gene (Hartnett e Egan, 2012). Com base nisso, analisamos o estado de metilação de dinucleotídeos CpG suscetíveis à metilação e a expressão de mRNA em três genes supressores de tumor: *SFRP1*, *SFRP2* e *TP73*. Estas análises foram realizadas em amostras de tecido de periodontite crônica e de carcinoma espinocelular de boca em comparação com amostras saudáveis (controle).

Os genes *SFRP1* e *SFRP2* são dois dos cinco membros da família *SFRP*. Estes genes agem como antagonistas na via de sinalização Wnt (Jones e Jomary, 2002) e possivelmente combatem o estímulo persistente ou excessivo da Wnts (Caldwell *et al.*, 2004). *SFRPs* bloqueiam a sinalização de Wnt, quer através da interação com proteínas Wnt para impedi-las de se ligarem a Fz (*Frizzled*) ou pela formação de complexos não funcionais com as proteínas Fz. Estas proteínas são receptoras para Wnt e agem como mediadores positivos da via de sinalização Wnt (Huang *et al.*, 2004). Estudos mostram que o silenciamento epigenético de genes *SFRP* é uma das principais causas de ativação do sinal de Wnt no CEC (Sogabe *et al.*, 2008). *SFRP1* e *SFRP2* apresentam uma grande concentração de dinucleotídeos CpG em uma ilha e, uma elevada taxa de metilação na regiões 5' é observada. Esta metilação do DNA está envolvida, direta ou indiretamente na

regulação desses genes na leucemia linfóide crônica (LLC) na linhagem celular WaC3CD5 (Liu *et al.*, 2006).

Em nossas análises de *SFRP1*, duas regiões foram estudadas. A primeira região amplificada está localizada na extremidade do primeiro éxon que se estende para o íntron. Esta zona apresenta elevado conteúdo de dinucleotídeos CpG, formando uma ilha CpG que se estende a partir da região promotora até o início do primeiro íntron. Ilhas CpG normalmente não são metiladas em células normais, o que permite a transcrição do gene (Hartnett e Egan, 2012). Enquanto que em CD19 + provenientes de células B de indivíduos saudáveis não foi observada metilação, as amostras de CLL mostram metilação aberrante do promotor de *SFRP1* (Liu *et al.*, 2006). Em nosso estudo, a primeira região analisada demonstrou regiões hipometilada no grupo CEC (98,04%) em comparação com as amostras C (95,85%) e PCr (95,68%) ($p > 0,005$). O artigo de referência em que nos baseamos para a análise desta região apresentou hipermetilação nas amostras de câncer colorretal quando comparado com as amostras de mucosa normal do cólon (Caldwell *et al.*, 2004). Os autores também relatam não haver correlação entre o estado de metilação e a expressão gênica. A mesma região foi analisada por Caldwell e colaboradores (2006) em adenomas do intestino e a análise destas amostras mostraram níveis mais elevados de metilação em comparação com amostras normais. Em ensaios de qPCR, os autores encontraram uma regulação negativa na expressão de *SFRP1* mRNA em lesões pré-malignas em comparação com a mucosa normal. A segunda região por nós estudada (set2) está localizada na área promotora antes da ilha CpG e foi escolhida com base em resultados positivos provenientes de análises de *microarray* (dados ainda não publicados). No entanto, em nossa análise de metilação não foram encontradas diferenças entre os grupos e também não houve correlação com as expressões.

A análise de COBRA para o gene *SFRP2* foi realizada em três regiões distintas, ambas localizadas na ilha CpG do gene. O primeiro e o segundo fragmentos amplificados são complementares e permitiram a investigação da

metilação de cinco locais CpG. Nestes cinco dinucleotídeos, o percentual de hipometilação variou entre 73,11% a 95,14% entre os grupos. Além disso, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos nem quando a porcentagem individual dos *sets* foi comparada, nem quando analisamos a porcentagem obtida por cada enzima individualmente. Os nossos resultados foram diferentes dos resultados encontrados pelos autores do documento usado como referência para esta pesquisa, devido à alta metilação em amostras de adenomas colorretais e hipermetilação em amostras de câncer colorretal (Nagasaka *et al.*, 2009). Com base nos resultados obtidos na análise de microarray (dados ainda não publicados), a terceira região analisada foi desenhada no promotor do gene. Nossa análise mostrou um percentual de hipometilação maior nas amostras controle 97,85% quando comparadas com periodontite crônica 91,35% e CEC 78,32%, com diferenças estatísticas entre as amostras ($p > 0,05$). Tanto na análise de expressão como a correlação entre a metilação e expressão gênica, diferenças estatísticas não foram encontradas.

O gene *TP73* é um membro da família de supressores de tumores *TP53*, que induz apoptose em células com danos no DNA. Mutações no gene *TP53* inativam ou alteram suas funções sendo, portanto, o marcador genético mais comum de crescimento neoplásico humano (Weinstein *et al.*, 2002). Além disso, *TP73* raramente é mutado no câncer humano (Melino *et al.*, 2002; Stiewe *et al.*, 2002). Atividades de *TP73* demonstraram-se importantes no câncer, onde *TP53* provou ser inativo (Rödicker e Putzer, 2003; Vayssade *et al.*, 2005). A transcrição de p73 é regulada pelo promotor e éxon1 do gene *TP73*. A hipermetilação dos resíduos de citosina nos dinucleotídeos CpG dentro desta região desempenha um papel crítico na inativação da expressão gênica (Liu *et al.*, 2008). Porém, as análises de metilação na região do éxon5 mostraram, em nossos resultados, uma hipermetilação no grupo CEC (79,43%) quando comparado com as amostras dos grupos C (64,93%) e PCr (66,74%). Além disso, observou-se uma redução da expressão do gene em CEC em relação ao grupo saudável. No entanto, as correlações entre metilação e redução da expressão não

foram encontradas. Porém, a correlação entre hipermetilação e perda de expressão p73 foi demonstrada em experimentos em linhas celulares (Liu *et al.*, 2013).

As análises de metilação do DNA do gene *SFRP2* mostraram alterações estatisticamente significantes ($p < 0,05$) apenas em *SFRP2 – set-3*. Talvez, os estímulos contínuos da inflamação possam causar um desequilíbrio molecular e a organização normal das células pode sofrer instabilidade e esta pode alterar a expressão gênica conduzindo a célula à carcinogênese (Mbeunkui e Johann, 2009). No entanto, as respostas imunológicas do hospedeiro contra o agente patogênico e a relação com o ambiente em que vivem pode desencadear diferentes níveis de metilação e controle gênico, influenciando na evolução da doença.

Durante muitos anos acreditou-se que a metilação desempenhava um papel crucial na expressão do gene. No entanto, a metilação do DNA pode ser considerada um evento secundário no silenciamento transcricional. Atualmente, discute-se o verdadeiro papel da metilação na expressão gênica. Alguns estudos mostram que não há correlação entre a metilação e a expressão (Müller *et al.*, 2000). Por outro lado, metilações próximas às regiões promotoras dos genes mostraram correlação com redução ou completa ausência de transcrição (Suzuki e Bird, 2008). Algumas metilações em promotores não mostraram correlação com a expressão de seus genes, mas a variação da expressão foi explicada pela metilação em regiões reguladores *enhancer* (Aran e Hellman, 2013). O padrão de metilação de alguns *loci* estudados em nossa pesquisa mostrou diferenças estatísticas em amostras tumorais em relação ao controle e inflamação crônica, porém, não mostrou correlação com a expressão dos genes. Acredita-se que este silenciamento/modulação seja um mecanismo complexo e, portanto requerem estudos aprofundados para se atingir resultados mais conclusivos dessa relação.

1.5 REFERÊNCIAS

Abdel-Latif MMM, Duggan S, Reynolds JV, Kelleher D. Inflammation and esophageal carcinogenesis. *Current Opinion in Pharmacology* 2009; 9(4): 396-404.

Aggarwal BB, Vijayalekshmi RV, Sung B. Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, longterm foe. *Clinical Cancer Research* 2009; 15: 425–430.

Aran D, Hellman A. DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell* 2013; 154(1): 11-13.

Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* 1999; 4: 1-6.

Ayres M, Ayres-Júnior M, Ayres DL, Santos AA. BioEstat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/ MCT/ CNPq. 2007; 5: 324p.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539–45.

Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, Jan S, Hardy RG, Byrd P, *et al.* The Wnt Antagonist sFRP1 in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research* 2004; 64: 883-888.

Caldwell GM, Jones CE, Taniere P, Warrack R, Logo Y, Matthews GM, *et al.* O antagonista sFRP1 Wnt é downregulated em pré-malignas grandes adenomas intestinais. *British Journal of Cancer* 2006; 94: 922-927.

Dahl E, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoeck R, Wild PJ, Veeck J *et al.* Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 5680–5691.

Detert J, Pischon N, Burmester GR, Buttgereit F. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Research & Therapy* 2010; 12(5): 218.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457–463.

Esteve P, Bovolenta P. The advantages and disadvantages of Sfrp1 and Sfrp2 expression in pathological events. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2010; 221: 11-17.

Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21: 1874–1887.

Gupta RA, Dubois RN. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews Cancer* 2001; 1: 11-21.

Hartnett L, Egan LJ. Advance Access publication January 10, 2012. Inflammation, DNA methylation and colitis-associated cancer. *Carcinogenesis* 2012; 33: 723–731.

Hellebrekers DM, Griffioen AW, van Engeland M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1775: 76–91.

Heller RS, Dichmann DS, Jensen J, Miller C, Wong G, Madsen OD, *et al.* Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Developmental Dynamics* 2002; 225: 260–70.

Hirst M, Marra MA. Epigenetics and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2009; 41: 136–146.

Huang HC, Klein PS. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology* 2004; 5:234.

Jones SE, Jomary C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *BioEssays* 2002; 24: 811–820.

Karin, M. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediates carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; 14: 156–165.

Kasamatsu A, Uzawa K, Usukura K, Koikea K, Nakashima D, Ishigami T, Fushimi K, Ogawara K, Shiiba M, Tanzawa H. Loss of heterozygosity in oral cancer. *Oral Science International* 2011; 8: 37–43.

Liu K, Zhan M, Zheng P. Loss of p73 expression in six non-small cell lung cancer cell lines is associated with 5'CpG island methylation. *Experimental and Molecular Pathology* 2008; 84: 59-63.

Liu K, Zhuang X, Mai Z. p73 expression is associated with cellular chemosensitivity in human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Letters* 2013; 5: 583-587.

Liu TH, Raval A, Chen SS, Matkovic JJ, Byrd JC, Plass C. CpG Island Methylation and Expression of the Frizzled-Related Protein Gene Family in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Research* 2006; 66: 653-658.

Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal Disease as a Specific, albeit Chronic, Infection: Diagnosis and Treatment. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14(4): 727-752.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436–444.

Mbeunkui F, Johann DJ. Cancer and the tumor microenvironment: a review of an essential relationship. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2009; 63: 571-582.

Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 605–615.

Meurman JH, Uittamo J. Oral micro-organisms in the etiology of cancer. *Acta Odontologica Scandinavica* 2008; 66: 321–326.

Müller C, Readhead C, Diederichs S, Idos G, Yang R, Tidow N, *et al.* Methylation of the cyclin A1 promoter correlates with gene silencing in somatic cell lines, while tissue-specific expression of cyclin A1 is methylation independent. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20: 3316–3329.

Nagasaka T, Tanaka N, Cullings HM, Sun DS, Sasamoto H, Uchida T, *et al.* Analysis of Fecal DNA Methylation to Detect Gastrointestinal Neoplasia. *Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101: 1244–1258.

Pereira MA, Tao L, Wang W, Li Y, Umar A, Steele VE, *et al.* Modulation by celecoxib and difluoromethylornithine of the methylation of DNA and the estrogen receptor-alpha gene in rat colon tumors. *Carcinogenesis* 2004; 25(10): 1917-1923.

Rajesh KS, Thomas D, Hegde S, Kumar MS. Poor periodontal health: A cancer risk? *Journal of Indian Society of Periodontology* 2013; 17(6): 706-710.

Reu FJ, Leaman DW, Maitra RR, Bae SI, Cherkassky L, Fox MW, *et al.* Expression of RASSF1A, an epigenetically silenced tumor suppressor, overcomes resistance to apoptosis induction by interferons. *Cancer Research* 2006; 66: 2785–2793.

Rödicker F, Pützer BM. p73 Is Effective in p53-null Pancreatic Cancer Cells Resistant to Wild-type TP53 Gene Replacement. *Cancer Research* 2003; 63: 2737-2741.

Sogabe Y, Suzuki H, Toyota M, Ogi K, Imai T, Nojima M, *et al.* Epigenetic inactivation of SFRP genes in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Oncology* 2008; 32: 1253-1261.

Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clinical Microbiology and Infection* 2007; 13 (Suppl. 4): 3–10.

Stiewe T, Zimmermann S, Frilling A, Esche H, Pützer BM. Transactivation-deficient Δ TA-p73 Acts as an Oncogene. *Cancer Research* 2002; 62: 3598-3602.

Suzuki M, Bird, A. DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 465–476.

Tahara T, Shibata T, Nakamura M, Yamashita H, Yoshioka D, Okubo M, *et al.* Chronic aspirin use suppresses CDH1 methylation in human gastric mucosa. *Digestive Diseases and Sciences* 2010; 55(1): 54-59.

Tezal M, Sullivan MA, Reid ME, Marshall JR, Hyland A, Loree T, *et al.* Chronic periodontitis and the risk of tongue cancer. *Archives of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2007; 133: 450-454.

Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* 2000; 18: 6-9.

Urakami S, Shiina H, Enokida H, Kawakami T, Kawamoto K, Hirata H, *et al.* Combination analysis of hypermethylated Wnt-antagonist family genes as a novel epigenetic biomarker panel for bladder cancer detection. *Clinical Cancer Research* 2006; 12: 2109–2116.

Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Science* 2010; 101(2): 300-305.

Vayssade M, Haddada H, Faridoni-Laurens L, Tourpin S, Valent A, Bénard J, *et al.* p73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *International Journal of Cancer* 2005; 116: 860-869.

Veeck J, Geisler C, Noetzel E, Alkaya S, Hartmann A, Knüchel R, *et al.* Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* 2008; 29: 991–998.

de Visser K, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 2005; 7: 411–423.

Zhao C, Bu X, Zhang N, Zhang H. Methylation and aberrant expression of Wnt antagonist SFRP2 in gastric cancer. Chinese Journal of Pathophysiology 2009; 25(8): 1617-1620.

Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, Monos T, Lifshitz T, Argov S. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. Eye 2002; 16: 619-621.

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE METILAÇÃO EM SEQUÊNCIAS *LINE1* EM TUMOR: IMPORTÂNCIA DA METODOLOGIA

1.1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de boca é o tumor maligno mais comum da cavidade oral, tendo uma incidência de mais de 90% dentre os câncer orais (Spara *et al.*, 2005; Larsen *et al.*, 2009). Anualmente, ocorrem mais de 300.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço em todo o mundo (Parkin, 2001; Tribius *et al.*, 2011). A carcinogênese é um processo multifatorial caracterizado por alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas (Esteller, 2006a; 2006b; Mehrotra e Yadav, 2006). Estudos mostram que pacientes com câncer de cabeça e pescoço frequentemente desenvolvem múltiplas lesões em diferentes pontos anatômicos; esse padrão multifocal é chamado de "campo de cancerização" (Slaughter *et al.*, 1953). Há evidências da existência precoce de alterações genômicas no epitélio histologicamente normal adjacente ao tumor, podendo ocorrer nessas áreas, alterações em microssatélites e instabilidade cromossômica. Neste sentido, células com tais alterações representam populações clonais com crescimento vantajoso e elevada taxa de proliferação (Raimondi *et al.*, 2005).

Muitas vezes não se consegue prever a resposta ao tratamento do câncer bucal baseando-se apenas nos achados clínicos. Assim, vários estudos têm sido realizados com o objetivo de se obter um maior entendimento sobre a biologia e comportamento dessa doença, bem como para a descoberta de novos métodos de prognóstico que poderiam orientar as decisões de tratamento e predição de resposta a diferentes modalidades de terapia oncológica (Tan e Ogden, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2001; Grabenbauer *et al.*, 2003; Blomberg *et al.*, 2011). Desse modo, outros fatores têm sido investigados, especialmente a natureza molecular da doença, onde se tem observado o aumento da participação de regulação epigenética no fenômeno da carcinogênese e no desenvolvimento desse tipo de câncer (Venturi *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2008; Worsham *et al.*, 2011).

A metilação da molécula de DNA, uma modificação epigenética capaz de alterar a estrutura da cromatina e contribuir para a regulação de vários processos moleculares é caracterizada pela inserção de um grupo metil ao carbono 5 da citosina, formando a 5 metil citosina (5mC) (Moore *et al.*, 2013). O processo epigenético é essencial para o desenvolvimento normal das células. No entanto, em situações descontroladas, a metilação aberrante pode silenciar a expressão gênica de genes importantes. Uma grande variabilidade de genes supressores de tumor mostram-se silenciadas em câncer humanos (Jones e Baylin, 2002).

Para diagnosticar precocemente diferentes tipos de tumores, os pesquisadores têm se dedicado a encontrar marcadores moleculares específicos para detectar cada um deles. Diferentes técnicas são utilizadas para identificar esses marcadores, uma delas é a análise de marcas epigenéticas em genes específicos. No entanto, a contaminação por material adjacente aos tecidos tumorais pode levar a falsos resultados nestas análises, daí a importância de um estudo detalhado usando técnicas padrão ouro para evitar tais vieses.

Os tumores existem como consequências de populações de células malignas em tecidos normais resultando em células alteradas que muitas vezes são incorporadas e misturadas às células normais. Com a presença destas células, torna-se difícil selecionar amostras de células tumorais puras. Assim, a amostra de tecido tumoral é inevitavelmente contaminada com diferentes tipos de células conjuntivas não neoplásicas, células inflamatórias e outros componentes. A captura por microdissecção a laser (CML) minimiza essas contaminações e captura eficientemente e com precisão as populações de células tumorais a partir de espécimes clínicos (Murphy *et al.*, 2012).

Diferentes estudos mostram que alterações epigenéticas em sequências repetidas do DNA são eventos normalmente observados em estágios iniciais do processo carcinogênico. Neste contexto, o retrotransposon *LINE1* é um, entre os diferentes tipos, de sequência repetitiva que está disperso ao longo de aproximadamente 17% de todo o genoma, consequentemente, seu estudo é

amplamente considerado e utilizado para compor os estudos de metilação global do genoma (Kitkumthorn *et al.*, 2012; Roman-Gomez *et al.*, 2005; Mulero-Navarro e Esteller, 2008; Tost, 2010). Devido à necessidade de identificar o estado de metilação global por análise COBRA-*LINE1* em carcinoma espinocelular de boca, em células epiteliais e células estromais adjacentes, optou-se por isolar esses tipos de tecidos por meio de CML. O foco principal deste estudo foi analisar o estado de metilação de *long interspersed nuclear element-1* (*LINE1*) a partir de amostras de biópsia de carcinoma espinocelular de boca, margem tumoral e tecido saudável (controle). Por fim discutimos brevemente a importância de uma metodologia de estudo adequada para determinar com maior precisão as alterações moleculares em tecidos específicos.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

Local da pesquisa e obtenção das amostras

Vinte voluntários participaram deste estudo: 10 pacientes saudáveis como controle (grupo C) e 10 pacientes com carcinoma espinocelular de boca (grupos CEC e margem tumoral - MT). Os indivíduos foram recrutados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, durante o período de julho de 2011 a julho de 2013. A Divisão de Periodontia foi responsável pela coleta das amostras do grupo C e a Divisão de Patologia Bucal pelo grupo CEC e MT. Este estudo foi aprovado institucionalmente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (protocolo número 032/2010 e 058/2012) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por cada um dos voluntários da pesquisa após explicações e dúvidas sanadas.

Os critérios de inclusão foram:

(A) Grupo controle (C): adultos (idade 35 anos ou mais de idade); não etilistas ou tabagistas, ausência de doenças dos tecidos duros ou moles bucais (exceto cárie), sem mobilidade dentária, profundidade de sondagem ≤ 3 mm,

ausência de doenças sistêmicas ou uso crônico de drogas anti-inflamatórias, ausência de gravidez ou lactação atual;

(B) Grupo carcinoma espinocelular de boca (CEC): adultos (idade 18 anos ou mais); fumantes ou não, etilistas ou não, independente da condição sistêmica, desde que fosse possível realizar a cirurgia. Esses pacientes tinham suspeita de CEC e, por este motivo, foram submetidos à biópsia. Somente após a confirmação do diagnóstico os voluntários foram convidados a participar da pesquisa;

(C) Grupo margem tumoral: as amostras foram obtidas dos mesmos pacientes do grupo CEC.

Coleta e processamento das amostras

Grupo controle (C): todos os pacientes incluídos neste grupo foram submetidos à terapia periodontal básica. Biópsias cirúrgicas foram realizadas a partir de um colar gengival removido ao redor dos dentes. No grupo controle este procedimento cirúrgico foi feito por razões estéticas (p.ex. gengivoplastia).

Grupo carcinoma espinocelular (CEC): todos os pacientes incluídos neste grupo foram submetidos a procedimentos de biópsia de tecido com a remoção de cerca de 2 - 5 mm de tecido, devido às suspeitas de CEC. Após confirmação, uma parte de cada amostra foi processada para pesquisa.

Grupo margem tumoral (MT): uma segunda biópsia foi realizada nos mesmos pacientes CEC. Uma amostra de cerca de 5 mm de diâmetro foi removida da região próxima da lesão, cerca de 1 cm distante da margem clínica do tumor.

Após os procedimentos de biossegurança e anestesia de bloqueio, os tecidos de interesse foram removidos. Para obter resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras foram rapidamente inseridas em meio de incorporação adequado (Tissue-Tek® composto OCT, Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, EUA) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido até serem acondicionadas em

Biofreezer a -80 °C, para melhor manutenção da integridade celular até que o DNA genômico (gDNA) pudesse ser extraído.

Desenho da Pesquisa

Amostras homogeneizadas

Parte dos tecidos gengivais e tumorais foram designados para a homogeneização com "Turrax" (modelo MA102 / MINI, Marconi, Piracicaba, SP, Brasil), em tubos de plástico estéreis de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de extração de DNA (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), EDTA 5 mM e SDS a 0,5%) sob refrigeração. Os tubos de plástico contendo solução de extração e tecidos foram colocados em *racks* tipo biocooler. Cada amostra foi numerada para preservar a confidencialidade dos voluntários. Foram separadas em três grupos:

- Grupo controle (C) (n = 10);
- Grupo margem do tumor (MT) (n = 10);
- Grupo carcinoma espinocelular de boca (CEC) (n = 10).

Amostras Microdissecadas

A outra porção das 30 amostras foi embebida em criopreservador OCT incluído em recipiente adequado para posterior microtomização em criostato (Leica CM1850, Leica Microsystems Wetzlar, DE) e captura dos tecidos por CML (Arcturus Microdissection Instrument, Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA).

Os tecidos foram serialmente cortados em criostato, com espessura de 7 µm, a partir do bloco de tecido congelado. Os cortes foram montados em lâminas de vidro com membrana *polyethylenenaphthalate* (Arcturus® PEN membrana, BioSystem Applied, Foster City, CA, EUA). Imediatamente antes da microdissecação, as fatias com as amostras microtomizadas foram processadas para a microdissecção pela incubação em etanol a 75% durante 1 minuto, seguido por duas lavagens de 30 segundos cada em água RNase-free, para a remoção do meio de montagem. As lâminas contendo os cortes foram então coradas com hematoxilina-eosina, incubadas em solução alcoólica crescente (75%, 95% e

100%) durante 30 segundos cada e seguida por desidratação final em xilol durante 5 minutos. A coloração foi realizada de forma breve, seguida pela remoção do excesso de corante com a lavagem rápida para proporcionar uma visualização aceitável da morfologia. Apenas para permitir a seleção de células e tecidos alvo, sem excessos de corante para não interferir nas subseqüentes técnicas de análise molecular.

A CML foi realizada em 15 cortes consecutivos, montados em três lâminas com 5 cortes cada, usando lasers de corte combinados (IV – infra-vermelho e UV – ultra violeta) para cada uma das amostras coletadas. CML foi usada sob um microscópio invertido (ampliação x 10) e as respectivas definições foram ajustados como se segue: força do laser de IV - 50 a 60 mW, com uma duração de 20 ms e um tamanho de *spot* de 35 mm; a velocidade de corte de UV utilizada foi de 540 mm/s.

Cada um dos cortes de tecido era composto por tecido epitelial e tecido conjuntivo a partir do mesmo paciente. No entanto, ao passo que um dos objetivos do estudo foi comparar o padrão de metilação entre ambos os tecidos no mesmo grupo, as microdissecções foram feitas para separar cada um dos tecidos. Desta forma, o desenho dos grupos envolvidos neste estudo foi definido como se segue:

- Grupo Controle (n = 10)²:

- a. Tecido epitelial do grupo controle (n = 5)

- b. Tecido conjuntivo do grupo controle (n = 5)

- Grupo Margem Tumoral (n = 10)³:

- a. Tecido epitelial do grupo margem tumoral (n = 5)

- b. Tecido conjuntivo do grupo margem tumoral (n = 5)

² Para parear com o número de amostras dos grupos CEC e MT 5 amostras do grupo controle foram sorteadas.

³ Após processamento, apenas 5 das 10 amostras de tumor e 5 das 10 amostras margem tumoral apresentaram quantidade suficiente de DNA para realizar as análises de metilação propostas por este trabalho.

- Grupo CEC (n = 10)³:

a. Tecido epitelial do grupo CEC (n = 5)

b. Tecido conjuntivo do grupo CEC (n = 5)

Cada amostra foi dividida em tecido epitelial e conjuntivo, resultando em 30 amostras microdissecadas. A captura por microdissecção a laser foi realizada conforme mostrado na Figura 16.

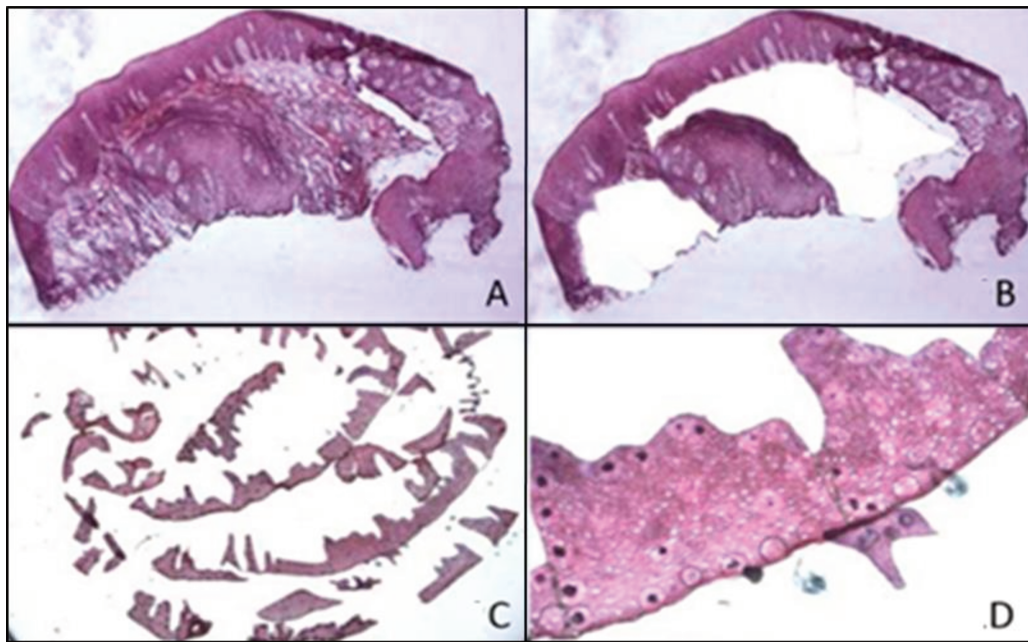


Figura 16 - Imagens histológicas de amostra de tecido controle corado pelo HE. (A) corte de 7 µm de amostra controle. Notam-se os tecidos epitelial e conjuntivo antes da captura pela microdissecção a laser. (B) mostra a lâmina após microdissecção do tecido conjuntivo; ampliação x 2. (C-D) mostram o tecido epitelial capturado sobre um CAP; ampliação de x 10 e x 40, respectivamente.

Extração de DNA

Amostras Homogeneizadas

Após homogeneização com solução de extração, adicionou-se 10 µL de proteinase K (20 mg/mL) em cada amostra e incubou-se a 65 °C durante a noite para lisar as células. Em seguida as moléculas de DNA foram extraídas e

purificadas pela sequência de extração de fenol/clorofórmio, seguida de precipitação com cloreto de sódio e etanol, como descrita por Trevilatto e Line (2000). O sedimento de DNA foi ressuspensão em 50 µl de tampão TE (Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Imediatamente após a extração, os ácidos nucleicos presentes em cada eluição foram quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience, São Paulo, SP, Brasil) para verificar a concentração e pureza dos gDNAs. Os gDNAs extraídos foram armazenados a -20 °C, para posterior utilização.

Amostras Microdissecadas

Os CAPs (Arcturus® CaPSURE LCM Macro Caps, BioSystem Applied, Foster City, CA) contendo os tecidos microdissecados foram transferidos e adaptados em tubos de 0,5 mL (Eppendorf, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA), contendo 1,5 mL de tampão de extração e 10 µl de proteinase K, e, em seguida, os tubos foram invertidos para imergir amostras e incubados durante 3 horas a 56 °C. O Microkit DNA QIAamp® (Qiagen, Mississauga, ON, CA) foi utilizado para a extração e purificação do DNA, seguindo as recomendações do fabricante. As concentrações dos DNAs foram estimadas como descrito anteriormente.

Modificação por Bissulfito de Sódio

Após a extração uma quantidade inicial de 300 ng de gDNA purificado foi modificado por bissulfito de sódio (Methyl SEQR™ Bisulphite Conversion Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), onde as citosinas sofrem conversão para uracilas, porém, as citosinas metiladas permanecem inalteradas. O protocolo foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. O DNA processado foi ressuspensão em um volume final de 50 µL de tampão TE e armazenado a 4 °C.

COBRA *LINE1*

Para analisar o estado de metilação das sequências repetitivas *LINE1* foi realizada a análise COBRA como descrito anteriormente (Kitkumthorn; Mutirangura, 2011; Kitkumthorn *et al.*, 2012). Segundo os autores, os *primers* foram desenhados para serem específicos para nucleotídeos na região reguladora da sequência *LINE1* (GenBank: M80343). As análises COBRA foram realizadas em duplicata. Para cada amostra, em um volume final de 25 µL, foi realizada amplificação por PCR em solução contendo amostras de DNA convertidas por bissulfito (18 ng), *GoTaq Green Master Mix* (Promega Corporations, Madison, WI, EUA) e 10 mM de cada *primer*: *forward* - 5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT-3' e *reverse* - 5'-RTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA-3'. As amostras foram submetidas a 40 ciclos em temperatura de anelamento de 50 °C. Em seguida, 10 µL dos produtos gerados pela amplificação (160 pb) foram digeridas com enzimas de restrição *TaqI* (2U) e *TasI* (2U) em tampão de *TaqI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), em um volume final de 20 µl, a 65 °C por 16h. As enzimas podem reconhecer duas regiões diferentes do amplicon, sendo uma região para cada enzima. *TasI* reconhece e cliva a região AATTG, enquanto que *TaqI* reconhece e cliva a região TCGA. Desta forma, após digestão, havia quatro possibilidades de estado de metilação: (a) os amplicons metilados, *TaqI* positivos, geraram dois fragmentos de 80 pb de DNA; (b) os amplicons desmetilados, *TasI* positivo, geraram fragmentos de 62 e 98 pb; (c) a primeira região metilada e a segunda desmetilada, não havia corte de enzima e (d) a primeira região desmetilada e a segunda metilada formavam-se fragmentos de 62, 18 e 80 pb (Figura 17).

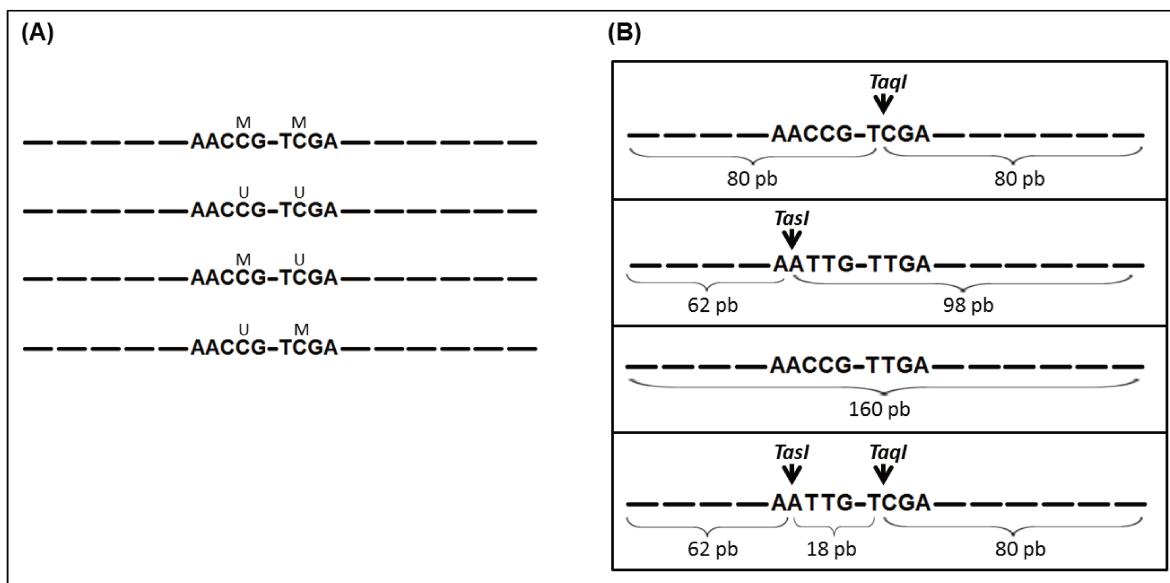


Figura 17 - Sequência *LINE1* estudada. (A) Amplicon com quatro diferentes possibilidades de metilação de acordo com os *loci*: ambos metilados; ambos desmetilados; o primeiro metilado e o segundo não metilado e o primeiro não metilado e o segundo metilado. (B) sequências possivelmente identificadas após tratamento por bissulfito e os respectivos cortes após tratamento com enzimas de restrição (*TaqI* e *TasI*).

Todas as amostras foram submetidas à análise COBRA em duplicata. Padrões comerciais (EpiTect® - PCR control DNA set, QIAGEN, Mississauga, ON, CA), com níveis de metilação de 0% e 100%, estiveram presentes em cada uma das reações sendo sujeitos às mesmas condições as quais as amostras foram submetidas. Estes controles foram incluídos em duplicatas em cada experimento. Alíquotas de 10 µL dos controles e dos produtos de PCR digeridos foram coradas com marcador de ácidos nucleicos (*Gel Red™*, Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) seguindo a recomendação do fabricante. Posteriormente, foram submetidas à corrida em gel de poliacrilamida vertical a 8%, com tampão TBE (Tris-Borato 89 mM em EDTA 2 mM, pH 8,0), a 20 mA por 40 minutos, para a identificação das bandas. A intensidade dos fragmentos no gel foi quantificada usando um programa de imagem (Scion Image - Windows, Scion Corporation, NIH, Bethesda,

MD, EUA). As análises foram realizadas em triplicata e os valores apresentados em porcentagem.

Análise do Padrão de Metilação do *LINE1*

A classificação dos níveis de metilação de *LINE1* foi realizada de acordo com Kitkumthorn e colaboradores (2012) em quatro grupos, dependendo do estado de metilação dos dinucleotídeos CG nas duas extremidades 5' e 3' da sequência: (1) *loci LINE1* contendo 2 CpGs não metilados ($^u C^u C$); (2) *loci LINE1* contendo 2 CpGs metilados ($^m C^m C$); (3) *loci LINE1* contendo CpGs 5'-metilado e 3'-não metilado ($^m C^u C$); e (4) *loci LINE1* contendo CpG 5'-não metilado e 3'-metilado ($^u C^m C$). Após digestão os COBRA-*LINE1* amplificados foram separados em cinco fragmentos de DNA de comprimentos diferentes: 160, 98, 80, 62 e 18 pb. Devido ao tamanho, o fragmento de 18 pb não foi utilizado nos cálculos seguintes. Os estados de metilação dos fragmentos foram: 160 pb - $^m C^u C$; 98 pb - $^u C^u C$; 80 pb constituído de $^m C^m C$ e $^u C^m C$ e 62 pb constituído de $^u C^u C$ e $^u C^m C$. Para calcular o número de dinucleotídeos CpG, a intensidade de cada banda foi dividida pelo número de pb de cadeia dupla da sequência de DNA como se segue: A = 160 pb intensidade fragmento / 160; B = 98 pb intensidade fragmento / 94; C = 80 pb intensidade fragmento / 79; e D = 62 fragmento pb intensidade / 62. Em seguida, os níveis de metilação *LINE1* foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas: percentagem do nível de metilação do *LINE1* = $100 \times (C+A) / (C+A+A+B+D)$; percentagem do *loci* $^m C^u C$ ($^m C^u C\%$) = $100 \times (A) / (((C-D+B) / 2) + A + D)$; percentagem do *loci* $^u C^m C$ ($^u C^m C\%$) = $100 \times (D-B) / ((C-D+B) / 2) + A + D$; percentagem do *loci* $^u C^u C$ ($^u C^u C\%$) = $100 \times B / (((C-D+B) / 2) + A + D)$; e percentagem do *loci* $^m C^m C$ ($^m C^m C\%$) = $100 \times ((C-D+B) / 2) / (((C-D+B) / 2) + D + A)$ (Kitkumthorn *et al.*, 2012).

Análise Estatística dos Resultados

Para a análise estatística, os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de Kruskal-

Wallis com correção de Bonferroni foi utilizado para analisar os níveis de metilação de sites CpG para o controle, margem tumoral e CEC. As probabilidades de $p < 0,05$ foram consideradas como sendo estatisticamente significativas. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software de programa de estatístico (Bioestat 5.0 (Ayres, 2007). O software de computação numérica Matlab 7.0 (Matrix Laboratory, no Novo México, EUA) foi utilizado para gerar os gráficos.

1.3 RESULTADOS

Os parâmetros epidemiológicos da população estudada foram tabulados e estão apresentados na Tabela 3. Os dois grupos (controle e CEC) eram compostos de 10 pacientes cada, com 100% masculino no grupo tumoral e 30% do gênero masculino e 70% do gênero feminino no grupo de controle. Para o grupo controle de 100% nunca usaram tabaco ou álcool, diferente do grupo CEC onde 100% dos pacientes são ou eram tabagistas e 90% usam ou já usaram álcool como etilistas.

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes de acordo com os parâmetros epidemiológicos

Parâmetros		% CONTROLE (n=10)	% CEC (n=10)
Idade (anos)		48.35 ± 8.9	66.90 ± 9.1
Gênero	Femino	70	-
	Masculino	30	100
Uso de tabaco	Não	100	-
	Sim	-	60
	Ex-fumante	-	40
Uso de álcool	Não	100	10
	Sim	-	50
	Ex-etilista	-	40

Um total de 30 amostras (10 - saudáveis (controle), 10 de carcinoma espinocelular de boca e 10 de margem tumoral) foram previamente estudadas por análises histológicas. Os espécimes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e observados ao microscópio óptico (Figura 18). As amostras controle apresentaram tecidos epiteliais e conjuntivos normais (Figura 18A). As amostras da margem tumoral foram obtidas a partir da margem de segurança do tumor e demonstraram, na maioria dos casos, uma concentração elevada de células inflamatórias no tecido conjuntivo (Figura 18B). Os cortes das amostras tumorais mostraram um aumento irregular nas mitoses na camada basal, hiperchromia e tecido hiperplásico com ilhas tumorais irregulares circundadas por infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo (Figura 18C).

Os níveis de metilação de *LINE1* foram analisados e calculados pela técnica COBRA. Os resultados destas análises estão expressos (Figura 18D-H). Todas as amostras apresentaram-se hipometiladas, com diferenças significantes do tecido tumoral ($38,31 \pm 2,72\%$) em relação ao controle ($36,43\% \pm 1,91$) e com a margem tumoral ($36,61\% \pm 2,04$) ($p < 0,05$) (Figura 18D). Entretanto, esta metilação é devido às condições de mistura dos *loci* ($^mC^uC$ e $^uC^mC$) uma vez que ambas as amostras apresentaram baixa dupla metilação ($^mC^mC$); uma média de 14% ($\pm 0,66$) ($p > 0,05$) (Figura 18E). As condições não metiladas ($^uC^uC$) apresentaram uma média de $38,45\%$ ($\pm 3,74$), $41,76$ ($\pm 5,38\%$) e $36,76\%$ ($\pm 2,29$) para os grupos controle, margem tumoral e CEC, respectivamente, com diferença estatística entre a margem tumoral e tumor ($p = 0,005$) (Figura 18H). Quando analisamos as condições de mistura dos dois dinucleotídeos CpG em 5' e 3' (Figura 18F-G), apenas em $^mC^uC$ foram encontradas diferenças estatísticas ($p = 0,028$) entre o tumor e a margem tumoral (Figura 18F).

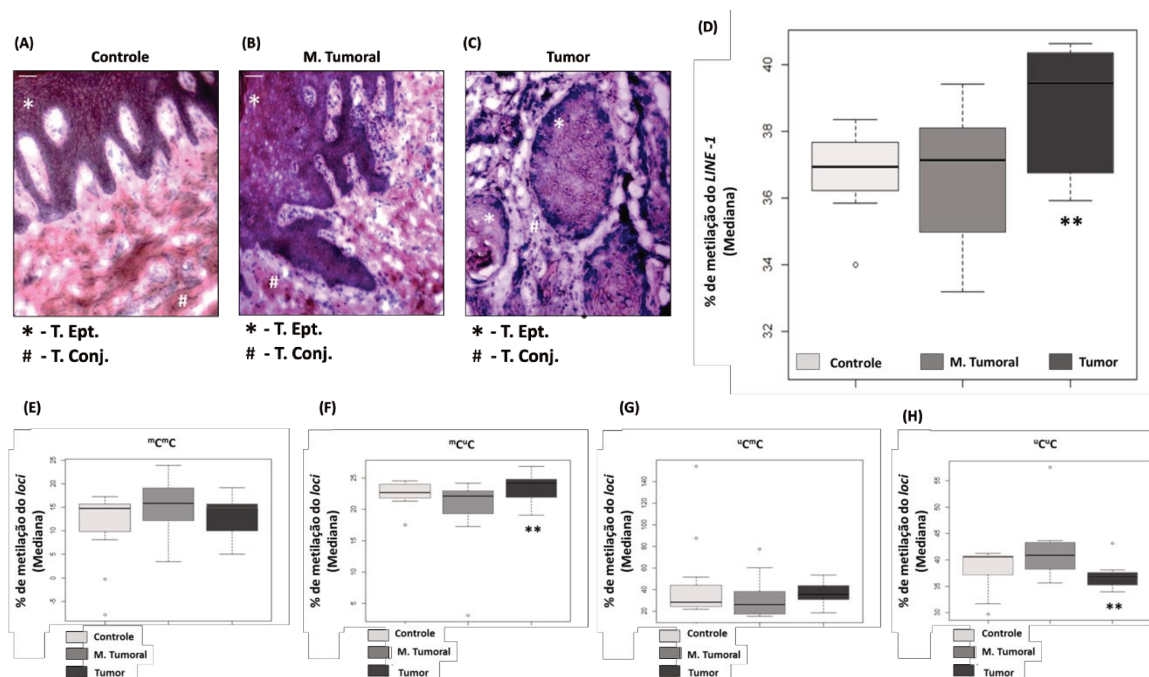


Figura 188 - Determinação do estado de metilação de sequências *LINE1* dos DNAs obtidos a partir de amostras homogeneizadas. (A-C) fotomicrografias de cortes histológicos de amostras dos grupos controle, margem tumoral e tumor, fixados em OCT e corados com HE – tecido epitelial (*TE) e tecido conjuntivo (#TC). (D) os gráficos boxplot representam a percentagem global de metilação do *LINE1*. Os gráficos apresentam mediana \pm desvio-padrão das amostras de controle, margem tumoral e tumor. (E-H) frequência de metilação dos dois CpGs localizados na sequência *LINE1* amplificada e detectada por análise COBRA. (E) mostra a metilação em ambos os loci na região *LINE1* - ^{mC}mC . (F-G) representa a metilação parcial de *LINE1*, um *loci* está metilado enquanto o outro está não metilado - ^{mC}uC e ^{uC}mC . (H) mostra hipometilação em ambos os *loci* na análise *LINE1* - ^{uC}uC . * p < 0,05 grupo CEC em relação ao controle e ** p < 0,05 grupo tumor em relação à margem tumoral (teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados das análises de COBRA-*LINE1* mostraram diferenças tanto quando comparados os grupos quanto quando comparados os tecidos (epitelial x conjuntivo) dentro de um mesmo grupo (Figura B-F). Para as amostras controle, quando os tecidos específicos foram comparados nenhum dos *loci-LINE1* mostrou diferenças estatísticas nas análises (Figura B-F). Por outro lado, foram

observadas diferenças significativas quando os tecidos epiteliais e conjuntivos foram comparados nas amostras de margem tumoral (Figura B-D e F) e amostras de tumor (Figura B-D) ($p < 0,05$). Os tecidos epiteliais também foram comparados entre os grupos e diferenças estatísticas foram encontradas quando comparados: controle x margem tumoral e controle x tumor (Figura B-C e E) ($p < 0,05$). O tecido conjuntivo também teve diferenças quando o grupo controle foi comparado com a margem tumoral (Figura B, D e E) ou com o tumor (Figura B e D) ($p < 0,05$).

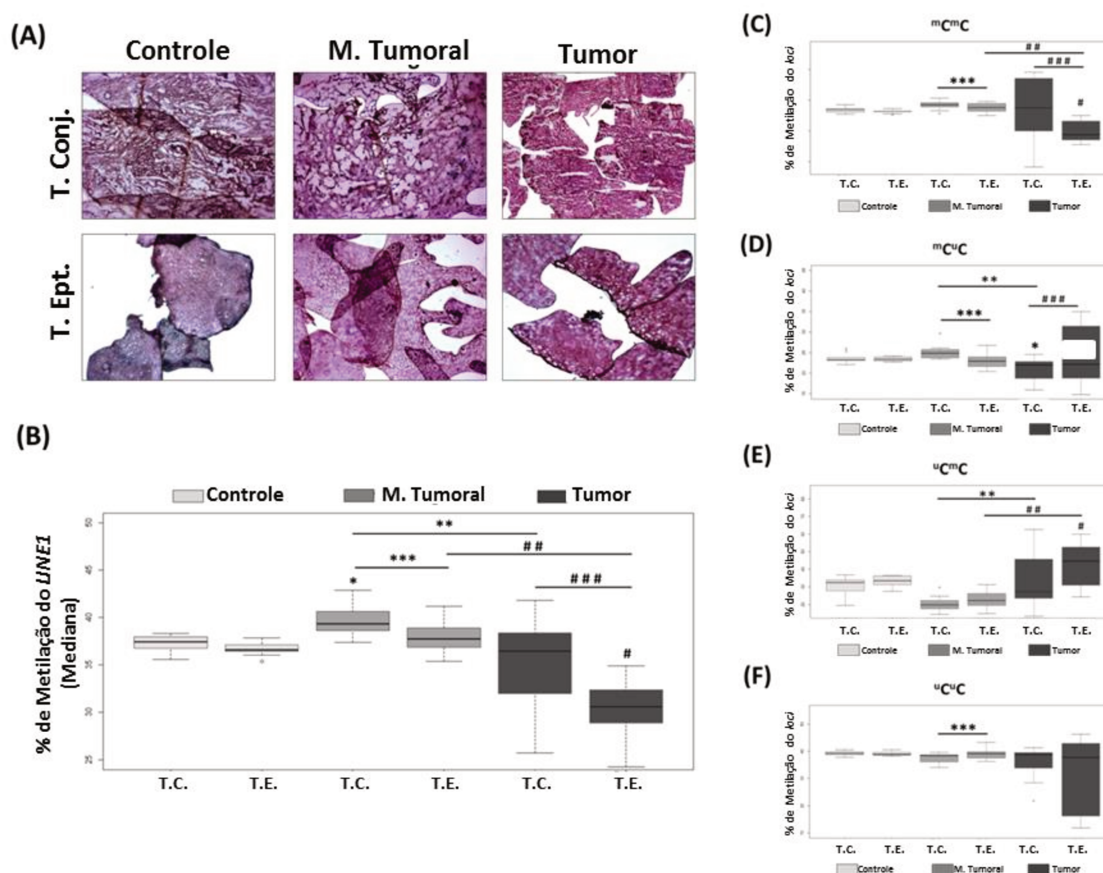


Figura 19 - Determinação do estado de metilação de sequências *LINE1* dos DNAs obtidos a partir de amostras submetidas à microdissecção a laser (CML). (A) fotomicrografias de cortes histológicos após a captura por microdissecção. A primeira linha mostra os tecidos conjuntivos de amostra controle, margem tumoral e tumor, respectivamente. A segunda linha mostra os tecidos epiteliais das mesmas amostras dos tecidos acima. (B-F) os gráficos *boxplot* representam a percentagem global de metilação do *LINE1*. Os gráficos apresentam mediana \pm desvio-padrão dos tecidos conjuntivo e

epitelial das amostras controle, margem tumoral e tumor. (C) mostra a metilação em ambos os *loci* na região *LINE1* - $^{m}C^{m}C$. O tecido epitelial do tumor difere do tecido epitelial das amostras controle (# $p < 0,05$), e tumoral (## $p < 0,05$) bem como do tecido conjuntivo tumoral (### $p < 0,05$). Nas amostras provenientes da margem tumoral, ambos os tecidos diferem (** $p < 0,05$). (D) representa a metilação parcial de *LINE1*, com o primeiro *loci* metilado e o segundo não metilado - $^{m}C^{u}C$. Quando os tecidos específicos foram comparados, o tecido epitelial do tumor diferiu do tecido epitelial de controle (# $p < 0,05$) e do tecido epitelial da margem tumoral (## $p < 0,05$). O tecido conjuntivo da margem tumoral diferiu quando comparado com o tecido conjuntivo do tumor (** $p < 0,05$). (E) representa a metilação parcial de *LINE1*, com o primeiro *loci* não metilado e o segundo metilado - $^{u}C^{m}C$. O tecido conjuntivo da margem tumoral diferiu quando se comparou com os tecidos conjuntivos do controle (* $p < 0,05$) e do tumor (** $p < 0,05$). Entre os grupos, o tecido epitelial diferiu do tecido conjuntivo na margem tumoral (** $p < 0,05$) e no tumor (### $p < 0,05$). (F) mostra hipometilação em ambos os *loci* na análise *LINE1* - $^{u}C^{u}C$. O tecido epitelial diferiu do tecido conjuntivo apenas na margem tumoral (** $p < 0,05$) (teste de Kruskal-Wallis).

1.4 DISCUSSÃO

Estudos morfológicos e moleculares comparativos entre o câncer e os tecidos normais são muito importantes para a total elucidação da fisiopatologia tumoral. Em nossa pesquisa foram coletadas amostras de tecido saudável, CEC e margem tumoral. O tecido saudável foi utilizado como controle do estudo e foi obtido a partir de cirurgia estética gengival. A maioria das amostras do grupo controle era procedente de mulheres (70%), situação comum em cirurgias estéticas, pois as mulheres estão mais insatisfeitas com sua estética periodontal (Agarwal e Rastogi, 2014) ou dental (Tin-Oo *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012) do que pacientes do gênero masculino. Devido às mesmas razões de estética, a idade média do grupo controle foi baixa ($48,35 \pm 8,9$) uma vez que o nível de aceitação na aparência odontológica por pessoas mais velhas pode ser muito maior do que nos mais jovens (Alkhatib *et al.*, 2005). No entanto, as amostras do grupo CEC provieram 100% de homens com idade média de $66,90 \pm 9,1$, concordando com a

literatura que descreve a doença como sendo mais comum entre os homens, principalmente, a partir de 65 anos de idade (Mosele *et al.*, 2009).

O estilo de vida está relacionado com as causas multifatoriais de tumorigênese e dois dos principais fatores de risco são o tabagismo e o consumo de álcool (Anand *et al.*, 2008; Gasche e Goel, 2012). Sendo a cavidade bucal uma porta de entrada para esses patógenos os CECs estudados estão frequentemente associados. Corroborando com a literatura, os nossos resultados mostram que para os pacientes CEC positivos, 100% usam ou já usaram tabaco e 90% usam ou já usaram álcool. O tabagismo e consumo de álcool, têm um impacto direto sobre a regulação dinâmica da expressão gênica modulada por mecanismos epigenéticos (Gasche e Goel, 2012). Um desses mecanismos é a metilação aberrante do DNA que pode silenciar completamente genes importantes para as células e, assim, favorecer o desenvolvimento do câncer (Ushijima e Asada, 2010). Alterações epigenéticas foram relatadas no promotor MAO-gene (monoamina oxidase), tanto em fumantes atuais como ex-fumantes (mais de 10 anos) (Launay *et al.*, 2009). Da mesma forma, o alcoolismo foi mostrado para estar diretamente relacionado a distúrbios epigenéticos, afetando, entre outros, as DNMTs (DNAmetiltransferases), que são proteínas importantes para regulação da metilação do DNA (Veazey *et al.*, 2013; Zakhari, 2013).

Para analisar a metilação global, realizamos o ensaio COBRA-*LINE1*. As amostras de DNA foram extraídas e modificadas por bissulfito de sódio, amplificadas por PCR e em seguida submetidas a enzimas de restrição para avaliação de duas importantes regiões CpG. *LINE1* são abundantes *retrotransposons* que ocupam ~17% do genoma humano (Smit, 1996). Uma sequência *LINE1* completa contém uma região 5' UTR, duas fases de leitura aberta (ORF1 e ORF2) e uma região 3' UTR seguida por uma cauda poli-A (Scott *et al.*, 1987). Os dinucleotídeos CpG em sua 5' UTR frequentemente podem ser metilados e são avaliadas como representantes dos níveis de metilação global do genoma (Kitkumthorn *et al.*, 2012). Inicialmente analisamos o *LINE1* em amostras homogeneizadas, desta forma, foram misturados tecidos epiteliais e conjuntivos.

Os resultados mostram que as amostras tumorais homogeneizadas apresentaram-se hipermetiladas quando comparadas com os grupos margem tumoral e controle (Figura 18). Ao contrário da literatura que confirma que o *LINE1* aparece hipometilado em CEC (Smith *et al.*, 2007; Subbalekha *et al.*, 2009) inclusive em amostras bochecho (Subbalekha *et al.*, 2009). No entanto, quando os tecidos foram analisados separadamente (epitélio e conjuntivo), notou-se grande hipometilação no epitélio das amostras de tumor. Por outro lado, o tecido conjuntivo se mostrou consideravelmente mais metilado (Figura). Estes resultados nos levam a crer que os dados de hipermetilação encontrados em amostras de tumores homogeneizadas são decorrentes da contaminação de tecidos adjacentes ao tumor. Estudos revelaram que eventos epigenéticos aberrantes ocorrem em células do estroma durante a tumorigênese (Hu *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2012). Vieses devem ser cuidadosamente evitados porque amostras de tumores também podem estar contaminadas com células normais, o que pode aumentar a probabilidade de não se perceber o risco para um paciente (Elloumi *et al.*, 2011).

Pelas razões acima expostas e os inesperados resultados de hipermetilação encontrados no grupo tumor em comparação com o controle, decidimos separar os tecidos epiteliais e conjuntivos pela técnica de microdissecção a laser. Quando analisamos as amostras não observamos diferenças consideráveis entre o epitélio e o tecido. Este padrão foi alterado tanto na margem tumoral como nos tecidos de tumor. Talvez as diferenças no grupo margem tumoral possam ter ocorrido devido às células inflamatórias presentes em grandes quantidades no tecido conjuntivo destas amostras (Figura 18A). Esta suposição é apoiada pelos resultados de metilação global do *LINE1* a partir dos tecidos conjuntivos de margem do tumor em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$) (Figura). Mesmo estas diferenças estando relacionadas com tecido conjuntivo estes resultados são motivo de preocupação já que a história do uso do tabaco associado com hipometilação de *LINE1* foi encontrado na mucosa de esôfago não canceroso de pacientes ESCC (carcinoma de células escamosas do

esôfago), confirmando que o uso do tabaco modifica epigeneticamente os tecidos periféricos ao tumor (Shigaki *et al.*, 2012), bem como as nossas conclusões para o epitélio da margem tumoral. Esta constatação é preocupante, pois muitos estudos sobre epigenética de tecidos tumorais têm dado importância à análise de sequências *LINE1* uma vez que o processo de tumorigênese do CEC desmetila os elementos repetitivos (p.ex. *LINE1*) resultando em aumento na instabilidade cromossômica (Gasche e Goel, 2012; Martinez *et al.*, 2012).

Análises epigenéticas tem sido uma forma importante para a compreensão das alterações moleculares nas células tumorais. Como comprovado por outros estudos, nossos resultados demonstram que, para as análises de *LINE1*, existe uma forte relação entre tabagismo e CEC, mesmo depois de o indivíduo parar de fumar. A presença de alterações celulares e moleculares de tecidos adjacentes ao tumor confirmou a real possibilidade de resultados contraditórios. A análise dos tecidos separados (epiteliais e conjuntivos) mostrou isto. Daí a importância de se realizar estudos com amostras mais puras que se possa obter. Finalmente, são necessários incessantes estudos para se compreender os mecanismos moleculares que causam a tumorigênese das células.

1.5 REFERÊNCIAS

Agarwal A, Rastogi N. Knowledge, Behavior, and Attitude of Geriatric Population towards Periodontal Esthetic in and around Bareilly District, Western Uttar Pradesh, India. International Journal of Advanced Dental Science and Technology 2014; 1(1): 41-46.

Alkhatib MN, Holt R, Bedi R. Age and perception of dental appearance and tooth colour. Gerodontology 2005; 22(1): 32-36.

Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research* 2008; 25(9): 2097-2116.

Ayres M, Ayres-Jr, Ayres DL, Santos AAS. *Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas. Versão 5.0.* Belém, Pará: Sociedade Civil Mamirauá, MCT-CNPq, 2007; 324 p.

Blomberg M, Nielsen A, Munk C. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *International Journal of Cancer* 2011; 129: 733-741.

Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of Dental Research* 2008; 87(1): 14-32.

Elloumi F, Hu Z, Li Y, Parker JS, Gulley ML, Amos KD, *et al.* Systematic bias in genomic classification due to contaminating non-neoplastic tissue in breast tumor samples. *BMC Medical Genomics* 2011; 4: 54.

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *British Journal of Cancer* 2006a; 94: 179-183.

Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006b; 27: 1121-1125.

Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncology* 2012; 8(11): 1407-1425.

Grabenbauer GG, Suckorada O, Niedobitek G, Rödel F, Iro H, Sauer R, *et al.* Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment

failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Oncology* 2003; 39: 459-469.

Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, *et al.* Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nature Genetics* 2005; 37: 899–905.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2002; cap 3. pp. 415–428.

Kitkumthorn N, Mutirangura A. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications. *Clinical Epigenetics* 2011; 2: 315-330.

_____, Keelawat S, Rattanatanyong P, Mutirangura A. LINE1 and Alu methylation patterns in lymph node metastases of head and neck cancers. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012; 13: 4469-4475.

Larsen SR, Johansen J, Sørensen JA, Kroghdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2009; 38: 657–662.

Launay JM, Del Pino M, Chironi G, Callebert J, Peoc'h K, Mégnien JL, *et al.* Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation. *PLoS One* 2009; 4(11):e7959.

Martínez JG, Pérez-Escuredo J, Castro-Santos P, Marcos CA, Pendás JL, Fraga MF, *et al.* Hypomethylation of LINE1, and not centromeric SAT- α , is associated with centromeric instability in head and neck squamous cell carcinoma. *Cellular Oncology (Dordr)* 2012; 35(4): 259-267.

Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer* 2006; 43: 60-66.

Moore DL, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology Reviews* 2013; 38: 23–38.

Mosele JC, Barancelli M, Oliveira da Sila S, De Carli JP, Trentin MS, Linden MSS, *et al.* Application of the PCR method for identification of the HPV in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Revista Odonto* 2009; 17(34): 7-12.

Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2008; 68: 1-11.

Murphy SJ, Cheville JC, Zarei S, Johnson SH, Sikkink RA, Kosari F, *et al.* Mate Pair Sequencing of Whole-Genome-Amplified DNA Following Laser Capture Microdissection of Prostate Cancer. *DNA Research* 2012; 19: 395-406.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncology* 2001; 2: 533-543.

Raimondi A, Cabrini R, Itoiz ME. Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2005; 34: 227-231.

Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sanchez J, Garate L, Barrios M, Castillejo JA, Navarro G, Colomer D, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Promoter hypomethylation of the *LINE1* retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene*. 2005; 24: 7213-7223.

Scott AF, Schmeckpeper BJ, Abdelrazik M, Comey CT, O'Hara B, Rossiter JP, *et al.* Origin of the human L1 elements: proposed progenitor genes deduced from a consensus DNA sequence. *Genomics* 1987; 1: 113-125.

Shigaki H, Baba Y, Watanabe M, Iwagami S, Miyake K, Ishimoto T, *et al.* *LINE1* hypomethylation in noncancerous esophageal mucosae is associated with smoking history. *Annals of Surgical Oncology* 2012; 19(13): 4238-4243.

Silva GC, Castilhos ED, Masotti AS, Rodrigues-Junior AS. Dental esthetic self-perception of Brazilian dental students. *Revista Sul-Brasileira de Odontologia - RSBO* 2012; 9(4): 375-81.

Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: Clinical Implications of Multicentric Origin. *Cancer* 1953; 6: 963-968.

Smit AF. The origin of interspersed repeats in the human genome. *Current Opinion in Genetics and Development* 1996; 6: 743–8.

Smith IM, Mydlarz WK, Mithani SK, Califano JA. DNA global hypomethylation in squamous cell head and neck cancer associated with smoking, alcohol consumption and stage. *International Journal of Cancer* 2007; 121(8): 1724–1728.

Spara L, Spara P, Costa AG. Achados epidemiológicos de câncer da cavidade oral em hospital de referência avaliados no período de 1980-2003. *Odontologia Clínica-Científica* 2005; 4(3): 177-83.

Subbalekha K, Pimkhaokham A, Pavasant P, Chindavijak S, Phokaew C, Shuangshoti S, *et al.* Detection of LINE1s hypomethylation in oral rinses of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology* 2009; 45(2): 184-191.

Tan LKS, Ogden GR. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncology* 1997; 33: 177-181.

Tin-Oo MM, Saddki N, Hassan N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. *BMC Oral Health* 2011; 11:6.

Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol. Biotechnol.* 2010; 44: 71-81.

Trevilatto PC, Line SRP. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *Journal of Forensic Odonto-Stomatology* 2000; 18: 6-9.

Tribius S, Ihloff AS, Rieckmann T, Petersen C, Hoffmann M. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Letters* 2011; 304: 71-79.

Tsuchiya K, Shirato H, Nishioka T, Yamazaki A, Hashimoto S, Kagei K, *et al.* Pretreatment apoptotic scores do not predict response to radiation therapy in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2001; 37: 159-163.

Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Science* 2010; 101(2): 300-305.

Veazey KJ, Carnahan MN, Muller D, Miranda RC, Golding MC. Alcohol-induced epigenetic alterations to developmentally crucial genes regulating neural stemness

and differentiation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2013; 37(7): 1111-1122.

Venturi BRM, Cabral MG, Lourenço SQC. Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. *Rev. Bras. Otorrinolaringology* 2004; 70: 385-392.

Zakhari S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Research* 2013; 35(1): 6-16.

Zong Y, Huang J, Sankarasharma D, Morikawa T, Fukayama M, Epstein JI, *et al.* Stromal epigenetic dysregulation is sufficient to initiate mouse prostate cancer via paracrine Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences – PNAS* 2012; 109(50): E3395-E3404.

Worsham MJ. Identifying the risk factors for late-stage head and neck cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy* 2011; 11: 1321.

CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados apresentados nos capítulos anteriores nos mostra a complexidade das alterações moleculares tanto na inflamação quanto no câncer. Foi constatado que a presença destes desvios na normalidade dos tecidos, provoca modificações epigenéticas e de expressão gênica, porém, podendo não estar diretamente relacionadas.

As análises dos tecidos tumorais devem ser realizadas com a maior pureza possível, pois como confirmamos em nosso estudo, a possível contaminação por tecidos adjacentes ao tumor pode gerar resultados inesperados e conseqüentemente falsos positivos ou negativos. Já que, nas amostras homogeneizadas o perfil de metilação demonstrou-se hipermetilado diferente de quando realizado o estudo do tecido epitelial separado do tecido conjuntivo adjacente onde o resultado foi uma hipometilação no epitélio tumoral.

Com base nisso, sugere-se que diferentes regiões passíveis de metilação sejam analisadas para avaliar a existência de sítios específicos relacionados à modulação da expressão gênica. Por fim, a avaliação do padrão de metilação de genes específicos já comprovados como marcadores tumorais devem ser realizados em tecidos homogeneizados e microdissecados para verificação da influência da contaminação por tecidos adjacentes.

REFERÊNCIAS*

Aggarwal BB. *et al.* Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1605-1621.

Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 499-510.

Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *J Cancer Surviv.* 1996; 28:87-101.

Bordini PJ, Grosso SFB, Costa SC. Câncer Bucal, Lesões e Condições Cancerizáveis. In: Kignel S. *Estomatologia: bases do diagnóstico para o clínico geral.* São Paulo: Santos; 2007. p. 331-357.

Camisasca DR, Silami MANC, Honorato J, Dias FL, Faria PAS, Lourenço SQC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with an without recurrence. *ORL.* 2011; 73: 170-176.

Casati L, Colciago A, Celotti F. Epigenetic mechanisms in health an diseases. *Brasília Méd.* 2010; 48(2): 209-218.

Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 2008; 87(1): 14-32.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1073-1081.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares SA. Caspase expression in oral squamous cell carcinoma. *Head and Neck*. 2011; 33(8): 1191-1198.

Dahl E, Wiesmann F, Woenckhaus M, Stoehr R, Wild PJ, Veeck J *et al*. Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2007; 26: 5680–5691.

Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br. J. Cancer*. 2006a; 94: 179-183.

Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 2006b; 27: 1121-1125.

Fukushige S, Kondo E, Horii A. Methyl-CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. *BiochemBiophys Res Commun* 2009; 379: 1021-1026.

Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 1874–1887.

Gao S, Nielsen BS, Kroghdahl A, Sorensen JA, Tagesen J, Dabesteen *Set al*. Epigenetic alterations of the SERPINE1 gene in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Genes Chromosom. Cancer*. 2010; 49: 526-538.

Gigliotti MP, Tolentino ES, Tomita NE, Chinellato LEM. Principais mecanismos de atuação do álcool no desenvolvimento do câncer oral. *Odontol Clín Cient.* 2008; 7(2): 107-112.

Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD, *et al.* Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res* 2008; 68: 10280-10289.

Halliwell B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J* 2007; 401: 1-11.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Heller RS, Dichmann DS, Jensen J, Miller C, Wong G, Madsen OD, *et al.* Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation. *Dev. Dyn.* 2002; 225: 260–70.

Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010, 70: 27-56.

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18: 1427-31.

Little JW, Falace DA, Miller CS, Rhodus NL. Câncer Bucal e Cuidados com o Paciente Oncológico. Manejo Odontológico do Paciente Clinicamente Comprometido. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 415-441.

Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-233.

Luiz RR, Costa AJL, Nadanovsky P. Epidemiologia e Bioestatística em Odontologia. Ed. rev. e ampl. São Paulo: Atheneu; 2008.

Macaluso M, Paggi MG, Giordano A. Genetic and epigenetic alterations as hallmarks of the intricate road to cancer. *Oncogene*. 2003; 22: 6472-6478.

Mehrotra R, Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J. Cancer*. 2006; 43: 60-66.

Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*. 2003; 1: 1001-1008.

Mosele JC, Barancelli M, Oliveira da Sila S, De Carli JP, Trentin MS, Linden MSS *et al.* Application of the PCR method for identification of the HPV in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Revista Odonto*. 2009; 17(34): 7-12.

Moss SF, Blaser MJ. Mechanism of disease: inflammation and the origin of cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 90-97.

Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*. 1998; 17: 3237-3245.

Oliveira NFP, Planello AC, Andia DC, Pardo APS. Metilação de DNA e Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2010; (56): 493-499.

Parolin MB, Reason IJM. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arq Gastroenterol*. 2001; 38(2):138-144.

Perry AS, O'Hurley G, Raheem OA, Brennan K, Wong S, O'Grady A, *et al.* Gene expression and epigenetic discovery screen reveal methylation of SFRP2 in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2013; 132(8): 1771-1780.

Popovic B, Jekic B, Novakovic I, Lukovic L, Konstantinovic V, Babic M *et al.* Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 39: 909-915.

Raimondi A, Cabrini R, Itoiz ME. Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J. Oral Pathol. Med*. 2005; 34: 227-231.

Ricketts CJ, Hill VK, Linehan WM. Tumor-specific hypermethylation of epigenetic biomarkers, including SFRP1, predicts for poorer survival in patients from the TCGA Kidney Renal Clear Cell Carcinoma (KIRC) project. *PLoS One*. 2014; 9(1): e85621.

Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*. 2001; 20:3139-3155.

Rubin H. Fields and field cancerization: the preneoplastic origins of cancer: asymptomatic hyperplastic fields are precursors of neoplasia, and their progression to tumors can be tracked by saturation density in culture. *Bioessays*. 2011; 33: 224-231.

Russo AL, Thiagalingam A, Pan H, Califano J, Cheng KH, Ponte JF *et al.* Differential DNA hypermethylation of critical genes mediates the stage-specific tobacco smoke-induced neoplastic progression of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 2466-2470.

Rutter M, Saunders B, Wilkinson K, Rumbles S, Schofield G, Kamm M, *et al.* Severity of inflammation is a risk factor for colorectal neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterol*; 2004; 126: 451-459.

Sawa T, Ohshima H. Nitrate DNA damage in inflammation and its possible role in carcinogenesis. *Nitric Oxide* 2006; 14: 91-100.

Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J. Cell. Physiol.* 2005; 204: 21-35.

Scully C. Câncer. *Medicina Oral e Maxilofacial: bases do diagnóstico e tratamento*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 177-190.

Silveira FRX, Marcucci G, Weinfeld I, Sugaya NN. Lesões Erosivas e Ulcerativas da Mucosa Bucal. In: Marcucci G. *Fundamentos de odontologia: estomatologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 107-126.

Silverman S, Eversole LR, Truelove EL. *Fundamentos de Medicina Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: Clinical Implications of Multicentric Origin. *Cancer*. 1953; 6: 963-968.

Spara L, Spara P, Costa AG. Achados epidemiológicos de câncer da cavidade oral em hospital de referência avaliados no período de 1980-2003. *Odontologia Clínica-Científica*. 2005; 4(3): 177-83.

Tang WY, Ho SM. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Rev EndocrMetabDisord*. 2007; 8: 173-182.

Teo JL, Kahn M. A via de sinalização Wnt na proliferação e diferenciação celular: Um conto de duas coactivators. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2010; 62(12): 1149-1155.

Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Methods Mol Biol.* 2010; 507:3-20.

Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, *et al.* Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene.* 2006; 25(24): 3479-3488.

Veeck J, Noetzel E, Bektas N, Jost E, Hartmann A, Knuchel R, *et al.* Promotor hypermethylation do gene SFRP2 é uma alteração de alta freqüente e marcador epigenético específico do tumor no câncer de mama humano. *Mol Cancer* 2008; 7: 83.

Venturi BRM, Cabral MG, Lourenço SQC. Carcinoma de células escamosas oral - contribuição de vírus oncogênicos e alguns marcadores moleculares no desenvolvimento e prognóstico da lesão: uma revisão. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2004; 70: 385-392.

Wang DR, Tang D. Hypermethylated SFRP2 gene in fecal DNA is a high potential biomarker for colorectal cancer noninvasive screening. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(4): 524-531.

Worsham MJ. Identifying the risk factors for late-stage head and neck cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2011; 11:1321-1325.

APÊNDICE I



TERMO DE INFORMAÇÃO E CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA CIENTÍFICA



ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS E CÉLULAS DE TECIDO CONJUNTIVO DA MUCOSA BUCAL DE INDIVÍDUOS AFETADOS PELO CARCINOMA ESPINOCELULAR (CEC)

1. INTRODUÇÃO: Leia este termo cuidadosamente, pois o mesmo visa convidá-lo a participar de uma pesquisa, sendo que as informações a seguir irão descrever esta pesquisa e a sua função nela como participante. Caso tenha qualquer dúvida sobre este estudo ou termo, você deverá esclarecê-la com os pesquisadores responsáveis pelo trabalho que estarão apresentando este termo a você: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, a pesquisadora de Pós-Doutorado Denise Carleto Andia ou a aluna de Doutorado Danielle Portinho, do Departamento de Morfologia, área de Histologia, da FOP/UNICAMP; Fone: (19) 2106-5214/ 2106-5381.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DA PESQUISA: Esta pesquisa tem como objetivo avaliar o padrão de metilação (alteração ao redor do DNA que é a molécula que guarda nossas informações dentro da célula). Este padrão será analisado na região promotora de alguns genes (que são partes do DNA) responsáveis pela manutenção da normalidade das células bucais. **Você deve decidir se deseja ou não colaborar com esta pesquisa, entendendo-a o suficiente para fazer uma decisão consciente.** Este tipo de pesquisa é importante e justificável porque poderá trazer avanços sobre o conhecimento da normalidade dos tecidos orais.

DESCRIÇÃO DOS PARTICIPANTES: Irão participar deste estudo indivíduos adultos, do sexo feminino ou masculino, independente da idade, fumantes ou não fumantes, etilistas ou não etilistas e que venham a ser submetidos à biópsia no Orocentro da FOP-UNICAMP. As amostras proverão de tecido de lesão que será removido para biópsia

diagnóstica e a margem cirúrgica será estendida em alguns milímetros para a captura de tecido clinicamente saudável. Não haverá nenhum custo adicional ao paciente decorrente da pesquisa. **Não haverá também separação das amostras por grupo.**

MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA A OBTENÇÃO DA INFORMAÇÃO OU TRATAMENTO DA CONDIÇÃO: Não há métodos alternativos para a obtenção da informação para a realização desta pesquisa.

DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS: As amostras desta pesquisa serão coletadas pela equipe do Orocentro da FOP-UNICAMP (Departamento de Diagnóstico Oral). O material da lesão retirado para biópsia diagnóstica, juntamente com a margem clinicamente saudável, será aproveitado para pesquisa após a autorização do CEP desta Instituição. Assim, o paciente não passará por procedimento cirúrgico específico para a realização desta pesquisa e não haverá risco ou desconforto maior do que aquele já previsto pela própria realização da remoção de tecido para biópsia. Mudanças somente ocorrerão no que diz respeito ao tratamento e armazenamento do material. Após coletado, o material biológico será imediatamente colocado em pequenos frascos plásticos, uma parte seguirá para análise patológica para definição do diagnóstico e outra parte será congelada à -70°C, reservada para a pesquisa científica. Estas amostras serão processadas e o DNA será investigado. O DNA é o material genético aguardado nas células do material coletado. As possíveis alterações encontradas servirão como resultados que poderão auxiliar futuramente em melhores tratamentos. O exame clínico, biópsia e acompanhamento do paciente, serão os mesmos já realizados pelo Cirurgião Dentista que estará tratando o voluntário, portanto, o voluntário não deverá comparecer à clínica exclusivamente por conta da pesquisa.

DESCONFORTOS E RISCOS: Os procedimentos da pesquisa não gerarão riscos ou desconfortos à saúde do voluntário, inclusive porque o voluntário não será submetido à cirurgia ou qualquer outro procedimento devido exclusivamente à pesquisa. e sim o contrário, os pesquisadores do Departamento de Diagnóstico Oral coletarão os tecidos para realização da biópsia devido a suspeita de câncer de boca e, em caso de confirmação o paciente será encaminhado ao tratamento com médico oncologista. Em hipótese alguma a pesquisa atrapalhará o andamento de demais procedimentos aos

quais o paciente deva ser submetido e, portanto, não acrescentará nenhum risco ou desconforto ao voluntário.

VANTAGENS E BENEFÍCIOS AO VOLUNTÁRIO: O voluntário poderá se beneficiar da pesquisa permitindo que seu cirurgião dentista e ou médico responsável pelo tratamento tenham acesso aos resultados da pesquisa. Outro benefício indireto será o avanço do conhecimento na área.

() Sim, desejo receber meus resultados epigenéticos. Neste caso, fica a critério do paciente informar o diagnóstico genético ao cirurgião dentista e ao médico que o trata.

() Não, não desejo receber meus resultados epigenéticos.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA AO SUJEITO: esta pesquisa não objetiva o tratamento do voluntário. Portanto, os responsáveis por esta pesquisa não farão acompanhamento ou assistência ao sujeito já que os mesmos deverão ser efetuados pela equipe profissional que realizará o tratamento do sujeito, o qual terá sua lesão previamente biopsiada pela equipe da área de Semiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, para confirmação do diagnóstico da lesão.

EXCLUSÕES: não existem critérios de exclusão.

ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA E GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS: Os voluntários poderão ter acesso ao andamento da pesquisa e serão esclarecidos sempre que necessário sobre dúvidas a respeito da pesquisa, no telefone de contato das pesquisadoras Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, Dra. Denise Carleto Andia ou MSc. Danielle Portinho, abaixo informado.

DIREITO DE PARTICIPAR, RECUSAR OU SAIR: Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou poderá interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda dos benefícios aos quais de outra forma tenha direito, inclusive com relação ao seu tratamento médico e odontológico.

CONFIDENCIALIDADE DOS REGISTROS: A identificação das amostras será realizada utilizando-se números e não os nomes dos voluntários. Os resultados desta pesquisa

serão apresentados em congressos científicos, porém a identidade dos voluntários não será divulgada nessas apresentações, o mesmo ocorrendo em eventuais publicações. Os resultados encontrados no trabalho somente serão liberados ao voluntário e, caso seja vontade do mesmo, ao cirurgião-dentista e ao médico responsável pelo tratamento.

GARANTIA DE RESSARCIMENTO, INDENIZAÇÃO E REPARAÇÃO DE DANOS: Os voluntários não terão gastos com a participação na pesquisa, já que não prevemos a necessidade de acrescentar visitas extras à FOP para este fim. Em casos excepcionais, nos quais o paciente necessite comparecer à FOP para informações adicionais ou assinaturas, o mesmo será ressarcido no valor gasto com o transporte. Não prevemos nenhum dano ou risco ao paciente decorrente da pesquisa, pois este tecido será coletado durante o procedimento de biopsia para a confirmação da hipótese diagnóstica de câncer bucal, portanto, não há previsão de risco, indenização ou reparação de danos. Sendo assim, não altera em nenhum momento o andamento de outros procedimentos nem a recuperação do paciente depois destes tratamentos. Por não acrescentar nenhum risco ou desconforto ao paciente não prevemos indenização ao voluntário desta pesquisa.

BANCO DE MATERIAL BIOLÓGICO: Este material poderá ser armazenado para posteriormente ser utilizado em outras pesquisas, mas você será comunicado e novo TCLE será obtido. Você pode concordar ou não com esta condição:

- () Sim, concordo em permitir que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.
- () Não, não permito que o material biológico, que será coletado com meu consentimento, faça parte de um Banco de Material Biológico.

VOCÊ ESTARÁ RECEBENDO UMA CÓPIA DESTE TERMO ASSINADA POR VOCÊ E POR UM DOS PESQUISADORES RESPONSÁVEIS

CONTATOS: Em caso de dúvida sobre a pesquisa, entrar em contato com a Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo, a aluna de Pós-Doutorado Denise Carleto Andia e/ou com a aluna de doutorado Danielle Portinho no Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, Av. Limeira 901, Piracicaba-SP. Fone: (019) 2106-5214. E-mail: danielleportinho@hotmail.com

Em caso de dúvida sobre seus direitos como voluntário da pesquisa, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FOP/Unicamp, Fone/Fax (019) 2106-5349, Home Page www.fop.unicamp.br/cep, E-mail: cep@fop.unicamp.br

Recebi informações para participação em pesquisa científica que me foi explicado dentro da minha compreensão. Também tirei minhas dúvidas sobre este estudo com o pesquisador até minha completa satisfação. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidade e sem prejudicar ou influenciar os resultados do estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento e também autorizo a liberação dos dados obtidos da pesquisa aos pesquisadores e para publicação em revistas científicas e congressos. **Não assine este termo se não teve a oportunidade de solucionar suas dúvidas e recebido respostas satisfatórias a todas elas.**

Piracicaba, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do paciente

RG

Telefone:

Danielle Portinho

RG 3.374.715-2

Telefone: (19) 2106-5214

APÊNDICE II

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA – UNICAMP PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA BUCO-DENTAL – HISTOLOGIA

Nº amostra:

P.G.:

Bloco AP nº:

Nome:

Idade: Sexo: () F () M

Cor: () Leucoderma () Melanoderma () Feoderma

Endereço: _____

Cidade: _____

Profissão: _____

Tel: _____ Cel: _____

DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE GERAL

Doença crônica? () Sim () Não Qual(is)? _____

Na família () Sim () Não Qual(is)? _____

Fumante? () Sim () Não () Ex-fumante

Tipo: Quantidade diária: Quanto tempo?

Fumante Passivo? () Sim () Não

Faz uso de álcool? () Sim () Não () Ex-etilista

Tipo: Quantidade diária: Quanto tempo?

HISTÓRICO

Uso de prótese? () Sim () Não

Outro tipo de câncer? () Sim () Não Qual(is)? _____

Câncer na família? () Sim () Não Qual(is)/Quem? _____

DADOS RELATIVOS AO TUMOR

Data da coleta:

Sintomatologia:

Tempo de queixa:

Tratamento anterior:

Amostra: () Tecido saudável () Tecido lesional

Localização:

Tamanho:

TNM:

ANEXO I



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise do padrão de metilação de células epiteliais e células de tecido conjuntivo da mucosa bucal de indivíduos afetados pelo carcinoma espinocelular (CEC)"**, protocolo nº 058/2012, dos pesquisadores Ana Paula de Souza Pardo, Danielle Portinho e Denise Carleto Andia, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 08/11/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Methylation analysis of epithelial cells and connective tissue cells of oral mucosa in individuals affected by squamous cell carcinoma (SCC)"**, register number 058/2012, of Ana Paula de Souza Pardo, Danielle Portinho and Denise Carleto Andia, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 11/08/2012.


Prof. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Note: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO II



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise de metilação no promotor dos genes SOCS1, SOCS2 E SOCS3 em células epiteliais da mucosa bucal e células do tecido gengival de indivíduos afetados pela periodontite crônica: Associação com a expressão de transcritos destes genes**", protocolo nº [050/2010](#), dos pesquisadores Ana Paula de Souza Pardo, Aline Cristiane Planello e Luciana Souto Mofatto, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/06/2010, com alterações em 12/09/2013.

The Ethics Committee in Research of the Piracicaba Dental School - University of Campinas, certify that the project "**DNA methylation analysis of SOCS1, SOCS2 and SOCS3 gene promoters in oral epithelial cells and gingival tissue cells from individuals with chronic periodontitis: association with gene transcription**", register number [050/2010](#), of Ana Paula de Souza Pardo, Aline Cristiane Planello and Luciana Souto Mofatto, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee on Jun 02, 2010; with alterations on Sep 12, 2013.

Prof. Dr. Felipe Bevilacqua Prado
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Profa. Dra. Livia Maria Andalo Tenuta
Coordenadora
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO III



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Análise do padrão de metilação dos genes SOCS1, SOCS2 e SOCS3 em células do epitélio gengival e em células do tecido conjuntivo gengival durante a inflamação periodontal crônica"**, protocolo nº 032/2010, dos pesquisadores Denise Carleto Andia e Ana Paula de Souza Pardo, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 14/05/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Methylation status analysis of the SOCS1, SOCS2 and SOCS3 genes in gingival epithelial cells and gingival connective tissue cells in the chronic periodontal inflammation"**, register number 032/2010, of Denise Carleto Andia and Ana Paula de Souza Pardo, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 05/14/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.