



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JULIANA NASCIMENTO MARTINS

**ANÁLISE DE AGENTES DESMETILANTES NA ATIVAÇÃO DE
SEQUÊNCIAS DE DNA METILADAS ENDOGENEAMENTE EM
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
LÍNGUA**

Piracicaba

2019

JULIANA NASCIMENTO MARTINS

**ANÁLISE DE AGENTES DESMETILANTES NA ATIVAÇÃO DE
SEQUÊNCIAS DE DNA METILADAS ENDOGENEAMENTE EM
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE
LÍNGUA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Buco-Dental, na Área de Histologia e Embriologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Cristiane Planello

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA JULIANA NASCIMENTO MARTINS E ORIENTADA PELA PROF.^a DR.^a ALINE CRISTIANE PLANELLO

Piracicaba

2019

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

D366a Martins, Juliana Nascimento, 1989-
Análise de agentes desmetilantes na ativação de sequências de DNA metiladas endogeneamente em linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua / Juliana Nascimento Martins. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Aline Cristiane Planello.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Vitamina C. 2. Imunoterapia. 3. Metilação de DNA. 4. Neoplasias bucais.
I. Planello, Aline Cristiane, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of demethylating agents in the activation of sequences of methylated DNA endogenously in cell line of spinocellular carcinoma of tongue

Palavras-chave em inglês:

Vitamin C

Immunotherapy

DNA methylation

Mouth neoplasms

Área de concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Aline Cristiane Planello [Orientador]

Rui Barbosa de Brito Júnior

Luciane Martins Zylbergeld

Data de defesa: 14-05-2019

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-9135-0326>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9658357423596134>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 14 de Maio de 2019, considerou a candidata JULIANA NASCIMENTO MARTINS aprovada.

PROF^ª. DR^ª. ALINE CRISTIANE PLANELLO

PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

PROF^ª. DR^ª. LUCIANE MARTINS ZYLBERGELD

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Gustavo, cuja participação foi decisiva para que eu concluísse meu mestrado. Muito obrigada, por sempre acreditar em mim e ser meu maior incentivador. Te amo para sempre!

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 131803/2017-4.

Quero agradecer, primeiramente, a **Deus** o autor e consumidor da minha fé. O Senhor da minha vida, que cuida de mim em todos os momentos. Faço minhas as palavras do salmista: *“Pois o Senhor é bom; o seu amor dura para sempre, e a sua fidelidade não tem fim (Sl 100:5)”*.

Ao meu **Pai** pelo sustento, amparo e amor incondicionais. Sem você nada disso seria possível.

Ao meu marido, **Gustavo**, que esteve comigo em todas as circunstâncias e me auxiliou em tudo que precisei. Sua serenidade e paciência foram primordiais nas situações difíceis. Muito obrigada pelo amor incansável, carinho e dedicação e também pelos sábios conselhos que me nortearam em momentos decisivos.

Aos meus **avós** e minha **sogra** que tanto me amam e me sustentam em oração.

À minha **orientadora**, Prof.^a Dr.^a Aline Cristiane Planello, profissional competente, que compartilhou comigo o seu conhecimento e me apresentou ao intrigante mundo da biologia molecular.

Aos **docentes** do departamento de Histologia e Embriologia, Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line, Prof.^a Dr.^a Ana Paula de Souza e Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques por contribuírem para minha formação e pelos sensatos ensinamentos.

Aos meus **amigos**, Luziana, Samuel e Rachel, pelo apoio e as noites agradáveis regadas a boas risadas, e por tornarem os meus dias em Piracicaba menos enfadonhos.

RESUMO

A metilação do DNA possui papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer. Modificações epigenéticas como esta podem estar associadas a carcinogênese, visto que são capazes de ocorrer precocemente e anteceder as alterações genéticas. Todavia, apesar do relevante avanço das pesquisas sobre o câncer, a abordagem terapêutica continua a ser um desafio. Embora as anormalidades genéticas tenham sido o foco primário da grande maioria das terapias, as alterações epigenéticas são agora alvos de muitos estudos, especialmente com o emprego do inibidor da metilação do DNA, o 5-aza-CdR. Neste contexto, recentemente a Vitamina C ressurgiu como um promissor agente anticancerígeno, capaz de promover a desmetilação do DNA e o aumento da hidroximetilação em células neoplásicas, condição que permite a re-expressão de genes supressores de tumor, a indução da diferenciação celular e a amplificação de sinais imunes. Este estudo investigou, em células de carcinoma espinocelular oral de língua (SCC-9), a expressão de genes que poderiam potencializar os efeitos benéficos já reconhecidos dos agentes desmetilantes, 5-aza-CdR e Ácido Ascórbico, e também a transcrição de genes relacionados a prováveis efeitos colaterais decorrentes da utilização destes fármacos. As células cultivadas foram divididas em três grupos, e estes respectivamente tratados com meio padrão (controle), 5-aza-CdR (0,3 μM) e Vitamina C (150 μM) durante 48 horas. Os níveis de expressão dos genes *KRT13*, *MAGEA1*, *MAGEB2*, *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2* e *SLUG* foram analisados por PCR em tempo real que mostrou aumento da expressão do gene *KRT13* tratado com 5-aza em relação ao controle. O gene *MAGEA1* também apresentou expressão aumentada com o uso do agente 5-aza em relação ao grupo não tratado. Quanto ao gene *MAGEB2*, ocorreu aumento da expressão gênica em ambos os grupos de tratamento, 5-aza e Vitamina C, quando comparados com o controle. Portanto, a baixa dosagem de 5-aza-CdR promoveu, na linhagem celular SCC-9, o aumento da expressão dos genes de antígeno de câncer e testículo (*MAGEA1* e *MAGEB2*) considerados alvos promissores na imunoterapia contra o câncer, bem como, do gene *KRT13* condição que sinaliza a redução da tumorigenicidade celular. Enquanto que o Ácido Ascórbico aumentou exclusivamente a expressão do gene *MAGEB2*, o que indica seu potencial em amplificar a imunogenicidade das células de câncer oral.

Palavras-chave: Vitamina C. 5-aza-CdR. Imunoterapia. Metilação do DNA. Câncer oral.

ABSTRACT

DNA methylation plays a key role in the development and progression of cancer. Epigenetic modifications like this may be associated with carcinogenesis since they are capable of occurring early and precede the genetic alterations. However, despite the relevant advances in cancer research, the therapeutic approach remains a challenge. Although genetic abnormalities have been the primary focus of the vast majority of therapies, epigenetic changes are now the targets of many studies, especially with the use of the 5-aza-CdR DNA methylation inhibitor. In this context, Vitamin C has recently emerged as a promising anticancer agent, capable of promoting DNA demethylation and increased hydroxymethylation in neoplastic cells, a condition that allows the re-expression of tumor suppressor genes, induction of cell differentiation and amplification of immune signals. This study investigated the expression of genes that could potentiate the already recognized beneficial effects of demethylating agents, 5-aza-CdR and Ascorbic Acid, as well as the transcription of related genes in oral squamous cell carcinoma (SCC-9) the probable side effects of the use of these drugs. The cultured cells were divided into three groups and respectively treated with standard medium (control), 5-aza-CdR (0,3 μ M) and Vitamin C (150 μ M) for 48 hours. The expression levels of the *KRT13*, *MAGEA1*, *MAGEB2*, *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2* and *SLUG* genes were analyzed by real-time PCR which showed increased expression of the 5-aza treated *KRT13* gene over the control. The *MAGEA1* gene also showed increased expression with the use of the 5-aza agent over the untreated group. As for the *MAGEB2* gene, there was an increase in gene expression in both treatment groups, 5-aza and Vitamin C, when compared to the control group. Therefore, the low dose of 5-aza-CdR promoted in the SCC-9 cell line increased expression of cancer and testis antigen (*MAGEA1* and *MAGEB2*) genes considered promising targets in cancer immunotherapy, as well as gene *KRT13* condition that signals the reduction of cellular tumorigenicity. While Ascorbic Acid only increased expression of the *MAGEB2* gene, indicating its potential in amplifying the immunogenicity of oral cancer cells.

Keywords: Vitamin C. 5-aza-CdR. Immunotherapy. DNA methylation. Oral cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da metilação do DNA.....	19
Figura 2 - Padrão e perfil de metilação do DNA.....	20
Figura 3 - Vias de desmetilação do DNA.....	25
Figura 4 - Processo da transição epitélio-mesenquimal	31
Figura 5 - Representação esquemática da metodologia desenvolvida na pesquisa.....	37
Figura 6 - Teste de viabilidade celular para o Ácido Ascórbico	38
Figura 7 - Expressão relativa por PCR quantitativa do gene KRT13 nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$).....	39
Figura 8 - Expressão relativa por PCR quantitativa do gene MAGEA1 nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	40
Figura 9 - Expressão relativa por PCR quantitativa do gene MAGEB2 nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	41
Figura 10 - Expressão relativa por PCR quantitativa dos genes TIMP1, TIMP2, MMP2 e SLUG nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$).....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição da linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua SCC-9.....	33
Tabela 2 - Sequência dos primers para análise de expressão qPCR.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido L-ascórbico
cDNA	DNA complementar
CEC	Carcinoma de células escamosas
CH ₃	Radical metil
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CTA	Antígenos específicos de câncer e testículo
DHA	Ácido dehidroascórbico
DNMT	DNA metiltransferase
DNMT1	DNA metiltransferase de manutenção 1
DNMT3A	DNA metiltransferase <i>de novo</i> 3 ^a
DNMT3B	DNA metiltransferase <i>de novo</i> 3B
DNMTis	Inibidores de DNA metiltransferase
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
VER	Retrovírus Endógeno
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GLUTs	Transportadores de hexoses
HERV	Retrovírus Endógeno Humano
HUGO	Organização do Genoma Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>KRT13</i>	Queratina 13
<i>MAGE</i>	Família do gene de antígenos de melanoma
<i>MAGEA1</i>	Membro A1 da família <i>MAGE</i>
MAGEA1	Antígeno associado ao melanoma 1
MAGEA3	Antígeno associado ao melanoma 3
<i>MAGEB2</i>	Membro B2 da família <i>MAGE</i>
MAGEB2	Antígeno associado ao melanoma B-2
MBD	Proteínas de ligação de DNA metilado
MEC	Matriz extracelular
<i>MMP2</i>	Metaloproteinase de Matriz 2
<i>MMP9</i>	Metaloproteinase de Matriz 9

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RT-qPCR	Transcritase reversa – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SAM	S-adenosilmetionina
SCC-9	Linhagem celular de carcinoma espinocelular de Língua
SVCTs	Co-transportadores de sódio-ascorbato
<i>SLUG</i>	Fator de transcrição de dedo de zinco
TET	do inglês, <i>Ten-eleven translocation</i>
TET1	do inglês, <i>Ten-eleven translocation 1</i>
TET2	do inglês, <i>Ten-eleven translocation 2</i>
<i>TIMP1</i>	Inibidor de Metaloproteinases de Matriz 1
<i>TIMP2</i>	Inibidor de Metaloproteinases de Matriz 2
Vitamina C	do inglês, <i>L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn ²⁺	Zinco
5-aza-CdR	5-aza-2'-desoxicitidina
5C	5-citosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÍNGUA	17
2.2	EPIGENÉTICA: METILAÇÃO DO DNA	18
2.3	METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER	20
2.4	DROGAS EPIGENÉTICAS: 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA	21
2.5	VITAMINA C	23
2.6	PECULIARIDADES DOS GENES ANALISADOS	27
2.6.1	<i>KRT13</i> (Queratina 13)	27
2.6.2	<i>MAGEA1</i> e <i>MAGEB2</i> (Antígeno Específico de Câncer e Testículo)	28
2.6.3	<i>MMP2</i> (Metaloproteinase de Matriz 2)	29
2.6.4	<i>TIMP1</i> e <i>TIMP2</i> (Inibidores de Metaloproteinases de Matriz)	30
2.6.5	<i>SLUG</i> (Fator de Transcrição Dedo de Zinco).....	30
3	PROPOSIÇÃO	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
5	RESULTADOS	38
5.1	ANÁLISE DE MTT PARA ÁCIDO ASCÓRBICO	38
5.2	EXPRESSÃO DO GENE <i>KRT13</i>	38
5.3	EXPRESSÃO DO GENE <i>MAGEA1</i>	39

5.4	EXPRESSÃO DO GENE <i>MAGEB2</i>	40
5.5	EXPRESSÃO DE <i>MMP2</i> , <i>TIMP1</i> , <i>TIMP2</i> E <i>SLUG</i>	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO 1 – RELATÓRIO DE VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO	62

1 INTRODUÇÃO

A epigenética pode ser caracterizada como modificações na expressão gênica que ocorrem independentemente de alterações na sequência do DNA (Dawson et al., 2012). Dentre os mecanismos epigenéticos está a metilação do DNA, que consiste em uma alteração química covalente, na qual um radical metil (CH₃) liga-se ao carbono 5' da base nitrogenada citosina, geralmente seguida por uma base guanina. Após a adição do radical, a base nitrogenada passa a ser denominada de 5-metilcitosina (5mC). Esse processo é catalisado e mantido por uma família de enzimas conhecida como DNA metiltransferases (DNMTs) (Xing et al., 2018).

Esta modificação é imprescindível em diversos processos celulares, como na regulação gênica e organização da cromatina durante a embriogênese e gametogênese (Luo et al., 2018). Logo, a metilação aberrante do DNA está associada a várias patologias (Dor e Cedar, 2018), inclusive o câncer.

A compreensão científica desta relação causal existente entre a metilação anormal do DNA e o desenvolvimento de doenças humanas propiciaram a criação de terapias-alvo. Estas são direcionadas à dinâmica da metilação e são utilizadas como abordagem terapêutica em algumas neoplasias – síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda (Liu et al., 2016; Ramos et al., 2015). No entanto, estudos sobre a aplicação destas em tumores sólidos – como câncer oral – ainda são insipientes (Loo et al., 2019).

Os fármacos mais comumente usados em tais terapias são conhecidos como inibidores de DNA metiltransferase (DNMTis) e apresentam ação citotóxica e desmetilante sobre os genes. Dentre as formulações disponíveis, o medicamento 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR) apresenta maior eficácia na desmetilação (Ramos et al., 2015).

Os efeitos previamente caracterizados dos fármacos epigenéticos foram atribuídos a sua habilidade de re-expressar genes supressores de tumor – apoptose celular – e induzir a diferenciação celular – redução da capacidade celular em reprogramar-se para estados indiferenciados. Entretanto, novos efeitos provenientes destes medicamentos foram evidenciados. Dentre os quais, a capacidade de tornar a célula tumoral mais imunogênica, tanto pela expressão de retrovírus endógenos (ERVs) quanto pela re-expressão de antígenos específicos de câncer/testículos (CTAs), em regiões metiladas endogeneamente (Loo et al., 2019).

Concomitantemente a este cenário, relatos científicos recentes que associam epigenética e Ácido Ascórbico (AA) mostram que esta substância funciona como cofator da atividade das enzimas *Ten-Eleven Translocation* (TETs) e promove a desmetilação do DNA (Sajadian, 2016).

Ainda que promissores, os fármacos desmetilantes têm seu uso limitado no câncer sólido e poucas pesquisas são realizadas explorando o uso destes agentes no câncer oral. Além disso, são escassos os trabalhos que investigaram os possíveis efeitos colaterais resultantes do aumento da expressão de alguns genes que poderiam favorecer a proliferação e a resistência das células tumorais (Gerecke et al., 2018; Roulois et al., 2015; Karahoca e Momparler, 2013).

Diante da relevância dos argumentos apresentados, resolveu-se investigar a expressão de genes capazes de induzir os efeitos benéficos – aumento da diferenciação celular (*KRT13*) (Safadi et al., 2019; Belaldalvar et al., 2016) e expressão de antígeno de câncer e testículo (*MAGEA1* e *MAGEB2*) (Gjerstorff et al., 2015) – dos agentes desmetilantes, 5-aza-CdR e Ácido Ascórbico, em células de carcinoma espinocelular de língua (SCC-9). Igualmente, optou-se por estudar a transcrição de genes relacionados a possíveis efeitos colaterais, migração e invasão celular (*MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2*) (Trypuć et al., 2016; Lin et al., 2013; Brew e Nagase, 2010) bem como, transição epitélio-mesenquimal (*SLUG*) (Haslehurst et al., 2012) decorrentes da utilização destes medicamentos hipometilantes, nesta mesma linhagem celular. Também, avaliou-se a hipótese de os efeitos farmacológicos do Ácido Ascórbico isolado serem comparáveis aos de baixa dosagem de 5-aza-2'-desoxicitidina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÍNGUA

Segundo o parecer da World Health Organization (WHO, 2019) há 657.000 novos casos de câncer oral e faringe a cada ano e destes 330.000 resultam em morte. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019) estimou a incidência deste tipo de neoplasia em 14.700 (quatorze mil e setecentos) casos somente no ano de 2018.

O carcinoma de células escamosas (CEC) de cavidade oral corresponde a neoplasia de cabeça e pescoço mais frequente, responsável por aproximadamente 95% dos casos (Mroueh et al., 2017; Kaur et al., 2016). A língua é o local mais comum de ocorrência desta patologia, cuja incidência torna-se mais expressiva a cada ano, em diversos países (Siegel et al., 2016). Particularmente, comporta-se de maneira agressiva e ocasiona invasão local e metástase linfonodal (Zhao et al., 2018).

O câncer é uma desordem complexa, multifatorial e heterogênea, com distintas propriedades biológicas. Desenvolve-se como resultado de inúmeros desequilíbrios moleculares (Feinberg et al., 2006) e tais alterações estão, frequentemente, associadas à desregulação da expressão gênica, no CEC oral. Condição esta que pode desempenhar papel fundamental no desenvolvimento e seguimento da doença (Gasche e Goel, 2012).

Apesar do reconhecimento da epigenética como fator chave para a carcinogênese, ainda hoje, a quimioterapia convencional é utilizada como tratamento padrão. Contudo, este tipo de abordagem terapêutica é associada a altas taxas de recidiva e nenhuma melhora no prognóstico de sobrevida do paciente (Bharadwaj et al., 2019), motivos que poderiam contrariar sua prescrição como método de referência.

Neste contexto, a hipermetilação aberrante nas ilhas CpG de genes supressores de tumor é considerada uma alteração essencial na evolução da tumorigênese oral (Gasche et al., 2011). Embora existam, na literatura científica, evidências que associam a metilação do DNA à patogênese do carcinoma de células escamosas, não há relatos que descrevam claramente os genes envolvidos na progressão do CEC oral (Zhao et al., 2018).

2.2 EPIGENÉTICA: METILAÇÃO DO DNA

O termo epigenética foi descrito inicialmente por Conrad Waddington em 1950, para caracterizar modificações no genoma herdadas durante a divisão celular e que são independentes de alterações na sequência do DNA (Dawson e Kouzaride, 2012). Os eventos epigenéticos são reversíveis e capazes de alterar a estrutura da cromatina e, desta maneira, promover o controle preciso da estabilidade genômica (Cimmino et al., 2018; Berger et al., 2009).

Existem distintas categorias de modificações epigenéticas, dentre as quais, a metilação do DNA é a principal e mais investigada alteração que ocorre no genoma. Tal mecanismo consiste na adição de um grupo metil no carbono de posição 5' do nucleosídeo citosina, presente em uma sequência de dinucleotídeo CpG (citosina-fosfato-guanina). Este processo resulta na formação da 5-metilcitosina e ocorre pela ação de enzimas denominadas de DNA metiltransferases (Bird, 2002).

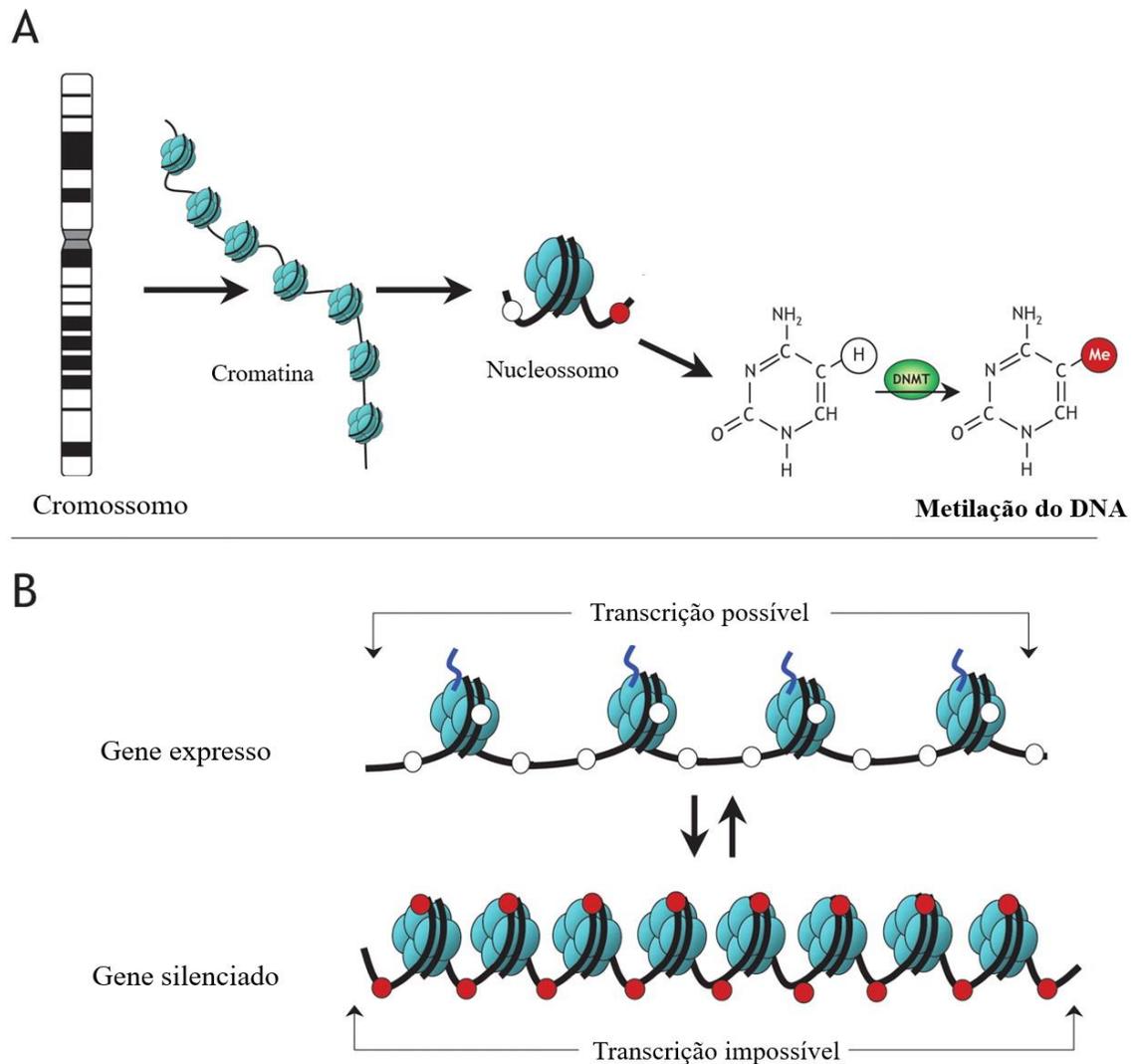
Na figura 1 é esquematizado o mecanismo da metilação do DNA. Em (A) é ilustrado a catálise da metilação do DNA realizada pelas enzimas DNMTs. E (B) a modulação dinâmica da organização da cromatina e a expressão gênica, induzidas pela metilação do DNA. A cromatina, quando aberta, permite a expressão do gene, no entanto, esta estrutura ao sofrer condensação promove o silenciamento gênico. Salienta-se que as esferas brancas representam citosinas não metiladas e as esferas vermelhas ilustram as citosinas metiladas.

As DNA metiltransferases removem o radical metil do substrato doador SAM (S-adenosilmetionina) e o adicionam à citosina (Patra et al., 2008). Em mamíferos, as DNMTs *de novo* (DNMT3A e DNMT3B) acrescentam o grupo CH₃ em sítios não metilados, o que ocorre principalmente durante o desenvolvimento embrionário. Enquanto a DNMT de manutenção (DNMT1) adiciona a marca epigenética em DNAs hemimetilados durante a divisão celular, sendo responsável pela herança do padrão de metilação (Groth et al., 2007).

Quanto aos dinucleotídeos CpG, é estabelecido cientificamente que estes podem ser encontrados tanto dispersos no genoma, quanto em aglomerados denominados de ilhas CpG. Estas regiões do DNA apresentam mais de 150 pares de bases e aproximadamente 50% de nucleosídeos citosina e guanina. Além disso, a maioria destas ilhas estão localizadas na região promotora de um grande número de genes (Feinberg et al., 2006). Cerca de 60% dos genes dos mamíferos apresentam ilhas CpG em seus promotores e éxons. Em condições normais, estes

loci não são metilados, ao contrário da maioria dos CpGs (Putiri et al., 2016).

Figura 1 - Esquema da metilação do DNA



Fonte: Adaptado de Rodenhiser e Mann, 2006

A metilação do DNA é uma marca que caracteriza a identidade celular dos mamíferos e é imprescindível para o desenvolvimento normal (Xing et al., 2018; Zhang et al., 2018). Logo, esta desempenha papel primordial em inúmeros processos biológicos, tais como, controle da replicação celular, estabilidade e manutenção da expressão gênica e regulação da diferenciação celular (Zhang et al., 2018; Fouse et al., 2010).

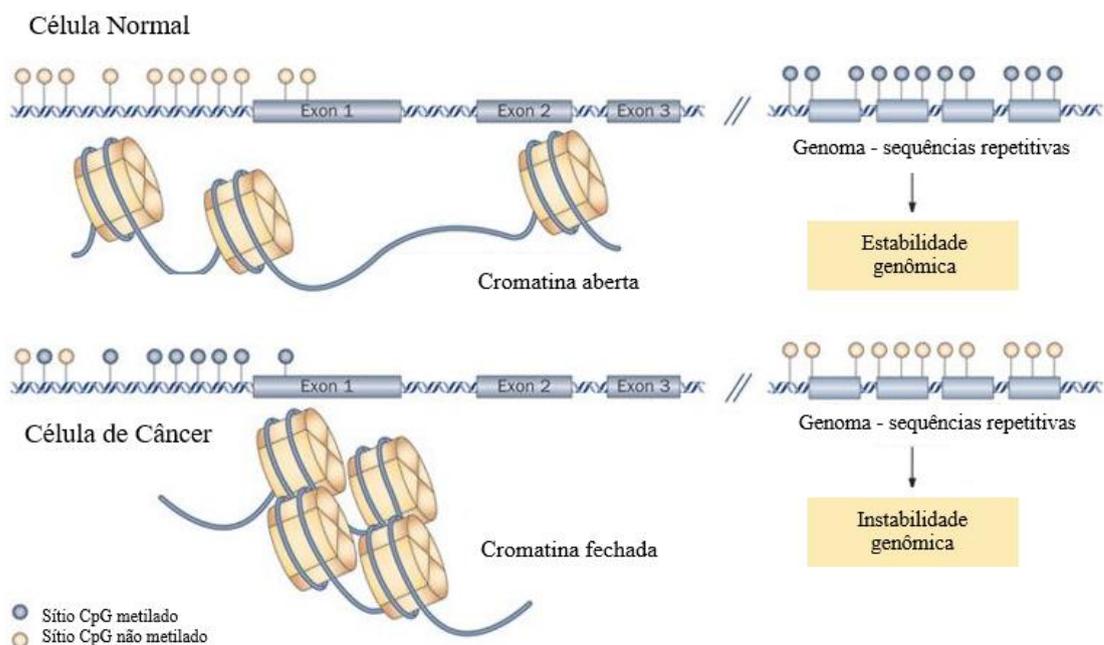
E, por isso, alterações no perfil epigenético podem ter efeitos danosos e desencadear patologias, inclusive o câncer (Ushijima e Asada, 2010).

2.3 METILAÇÃO DO DNA E CÂNCER

O silenciamento gênico é um fenômeno necessário a vida dos organismos eucariontes e particularmente essencial em inúmeros processos fisiológicos. E como a maioria dos eventos biológicos pode tornar-se desregulado e propiciar o surgimento de doenças (Jones e Baylin, 2007).

Hoje, sabe-se que a célula tumoral é hipometilada globalmente em seções de íntrons e sequências repetitivas, e pode apresentar padrão de hipermetilação em locais específicos do DNA – regiões regulatórias – ricos em dinucleotídeos CpGs, como nas ilhas CpG (Jones e Baylin, 2007). De maneira distinta, a célula normal é hipermetilada e apresenta-se desmetilada nas regiões regulatórias. Como pode ser observado no esquema da figura 2. Nesta é demonstrado o padrão e o perfil de metilação do DNA normal e aberrante.

Figura 2 - Padrão e perfil de metilação do DNA



Fonte: Adaptado de Lao e Grady, 2011.

Esta metilação anormal do DNA, especialmente na região promotora, pode alterar a expressão gênica (Laird, 2010). E, inclusive, silenciar genes essenciais envolvidos nas principais vias celulares – reparo do DNA, controle do ciclo celular e apoptose – e comprometer suas funções (Ushijima e Asada, 2010), paisagem epigenética muito comum no câncer (Esteller, 2008).

A hipometilação global do DNA também pode contribuir para o desenvolvimento de neoplasias, isto porque este padrão anormal de metilação é capaz de ativar oncogenes e aumentar a instabilidade genômica (Gasche e Goel, 2012; Tost, 2009).

Desta forma, o desequilíbrio dos mecanismos epigenéticos podem desregular a expressão de genes de maneiras distintas (Harris et al., 2018). Aliás, estudos recentes demonstram que a metilação do DNA exerce função significativa no desenvolvimento, progressão e metástase neoplásica (Zhao et al., 2018).

Existem pesquisas que buscam justificar o mecanismo pelo qual a metilação do DNA promove a repressão transcricional. Algumas afirmam que esta prática decorre da inibição direta da ligação de fatores de transcrição (Gasche e Goel, 2012). Em contrapartida, outras sugerem que tal modificação epigenética induz a ligação de uma família de enzimas, conhecida como proteínas MBD nos *loci* contendo ilhas CpG metiladas, o que resultaria na compactação da cromatina e consequente supressão da transcrição gênica (Hendrich e Bird, 1998; Bird, 1993).

O grau de metilação do DNA em determinado *locus* é uma característica hereditária e pode ser modificado por exposições ambientais e dieta (Husquin et al., 2018), bem como, alterado à medida em que envelhecemos, o que contribui potencialmente para o desenvolvimento de doenças humanas (Ziller et al., 2013), incluindo o câncer (Xing et al., 2018).

É importante salientar que as aberrações epigenéticas, normalmente, são modificações que precedem o desenvolvimento de afecções e, portanto, valiosos indicadores de risco e prognóstico de doenças (Kelly et al., 2010).

2.4 DROGAS EPIGENÉTICAS: 5-AZA-2'-DESOXICITIDINA

A metilação do DNA é uma modificação hereditária somática covalente, isto é, uma

característica transmitida às células filhas durante a replicação celular e apresenta capacidade de reversibilidade. A dinâmica desta alteração a torna um alvo atraente para a terapia epigenética. (Yang et al., 2014).

Logo, a relação entre o padrão de metilação e a desmetilação da citosina é um processo mutável que interfere na estrutura da cromatina e, desta maneira, modula o acesso da RNA polimerase II. Esta circunstância afeta diretamente a transcrição gênica (Bird, 1993).

Diante disso, o mecanismo da desmetilação do DNA pode ocorrer através de dois processos: ativo – requer ação enzimática e resulta na remoção do radical CH₃ – ou passivo – acionado pela perda do radical metil decorrente da inibição ou ausência da DNMT de manutenção.

Neste contexto, as principais terapias desenvolvidas foram relacionadas a modulação das enzimas responsáveis por adicionar a marca de metilação. Estes fármacos são denominados inibidores de DNA metiltransferases e impedem a atividade das DNMTs mediante seu aprisionamento permanente. Este mecanismo farmacológico promove a desmetilação global do genoma, e tem por finalidade induzir a re-expressão de genes aberrantemente silenciados (Ramos et al., 2015; Yang et al., 2014; Hassler et al., 2012; Kelly et al., 2010).

Distintos DNMTs são descritos na literatura científica, dentre estes, a droga 5-aza-CdR é considerada a substância com maior eficácia na desmetilação do DNA, mais estável e, além disso, aprovada para tratamento em humanos (Ramos et al., 2015, Hassler et al., 2012).

Este fármaco é um análogo sintético do nucleosídeo citosina e é incorporado a molécula de DNA durante a mitose. E então, este aprisiona irreversivelmente a DNA metiltransferase de manutenção (Patel et al., 2010), e a degrada por proteólise. Assim, a fita recém sintetizada não é metilada e o padrão de desmetilação é transferido passivamente como herança semiconservativa (Zhang et al., 2017).

O medicamento 5-aza-2'-desoxicitidina está disponível na forma de pó liofilizado em frasco-ampola para solução injetável por via intravenosa, na concentração de 50mg. Apresenta esquema posológico peculiar, realizado em regime de dosagem cíclica de 3 (Infusão contínua de 3 horas - de 8/8 horas x 3 dias consecutivos a cada 6 semanas) ou 5 dias (Infusão contínua de 1 hora x 5 dias consecutivos a cada 4 semanas), e período de tratamento mínimo de

4 ciclos. A principal diferença entre os regimes está no tempo de infusão reduzido do tratamento de 5 dias, o que possibilita sua execução em ambiente ambulatorial. Todavia, este esquema terapêutico é indicado apenas para pacientes portadores de síndrome mielodisplásica. Após cada ciclo de terapia são realizados exames hematológicos para monitorar a resposta imunológica e a citotoxicidade da droga (ANVISA, 2018; Derissen et al, 2013).

O tratamento de células cancerígenas com esta droga epigenética em baixa dosagem promove ação duradoura antitumorigênica, paralisação do ciclo celular e efeitos imunomodulatórios que aumentam a detecção da célula tumoral pelo sistema imunológico (Yau et al., 2016).

Nos últimos anos, novos estudos foram desenvolvidos com a finalidade de estender o tratamento medicamentoso com inibidores de DNA metiltransferase para tumores sólidos (Yang et al., 2014). Estes demonstraram resultados favoráveis quando combinados os inibidores da metilação e a quimioterapia convencional. Entretanto, a abordagem farmacológica exclusiva com DNMTis apresentou menor eficácia (Gerecke et al., 2018).

No entanto, apesar do êxito de ensaios pré-clínicos e clínicos, o fármaco 5-aza-CdR possui indicação terapêutica restrita, destinado apenas a algumas neoplasias hematológicas – síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda (Loo, Ettayebi e De Carvalho, 2019; Yang et al., 2014). Ademais, a prescrição é realizada exclusivamente para pacientes adultos, dos quais somente 50% respondem ao tratamento (Derissen et al., 2013).

2.5 VITAMINA C

Concomitantemente a este cenário de conquistas científicas, a promissora função anticancerígena do Ácido Ascórbico é investigada desde a década de 70. Ao longo dos anos, as pesquisas envolvendo a Vitamina C foram oscilantes e controversas, mas continuamente alicerçadas na esperança de que as propriedades antioxidantes do AA sejam capazes de inibir o desenvolvimento de neoplasias.

A Vitamina C é um micronutriente ácido, hidrossolúvel, primordial para síntese de colágeno nos tecidos conjuntivos. Além disso, desempenha inúmeras funções no organismo, tais como, ação antioxidante – envolvida no retardamento do envelhecimento – e proteção de doenças crônicas –, síntese de catecolaminas e suporte ao sistema imunológico (Camarena e Wang, 2016).

Coincidentemente, as pesquisas demonstram que os níveis séricos de Ácido Ascórbico estão reduzidos em pacientes portadores de neoplasia, inclusive CEC oral (Juneja et al., 2017; Kaur et al., 2016). Esta situação corrobora com o pressuposto da Vitamina C ser capaz de alterar o epigenoma e, conseqüentemente, interferir no desenvolvimento de doenças (Camarena e Wang, 2016).

Os seres humanos não sintetizam a Vitamina C e, portanto, a ingestão desta substância por meio da dieta ou suplementação é essencial para o desenvolvimento saudável. Pode ser encontrada nos alimentos de duas formas distintas: reduzida – ácido L-ascórbico (AA) – ou oxidada reversível – ácido dehidroascórbico (DHA). A versão AA é fisiologicamente ativa e possui 100% de atividade vitamínica. Enquanto que, a variante DHA apresenta maior estabilidade e percentual funcional de 75 a 80%. No entanto, no meio intracelular de forma natural e apropriada em virtude de um sistema de oxirredução ocorre o equilíbrio entre ambos os ácidos, cuja concentração é bastante elevada, com variação entre 1 a 10 mM (May, 2011).

A absorção ocorre nos enterócitos do intestino delgado e é acumulada nas células por intervenção de dois tipos de proteínas: co-transportadores de sódio-ascorbato (SVCTs) – responsável pelo carreamento do AA – e transportadores de hexoses (GLUTs) – encarregado do transporte do DHA (Savini et al., 2008).

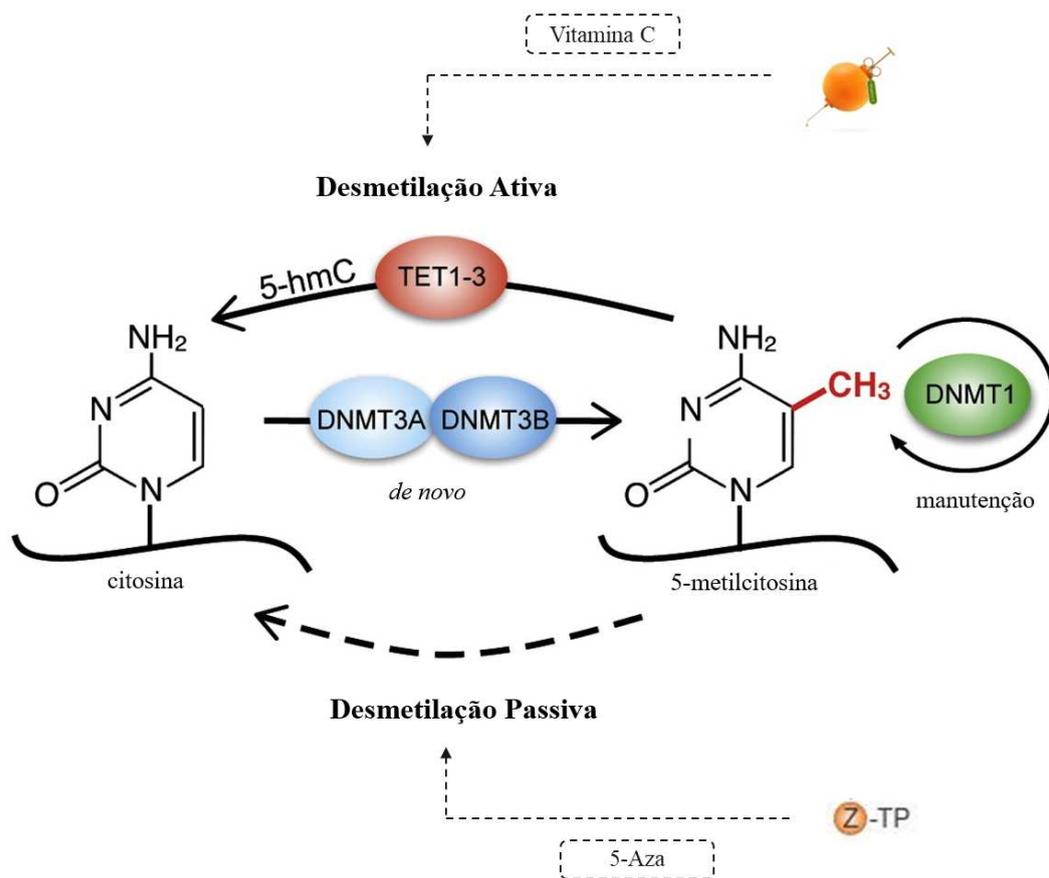
No entanto, apesar de sua relevância ser bem esclarecida, desde sua descoberta em 1927, suas propriedades biológicas continuam a ser evidenciadas (Du et al., 2012). Atualmente, seu potencial medicinal é sustentado por uma série de observações *in vitro* (Mingay et al., 2018; Sajadian et al., 2016) e *in vivo* (Xia et al., 2017) e até mesmo em alguns testes clínicos (Takahashi, et al., 2012). Entretanto, estas análises, em sua grande maioria, limitam-se a avaliação do Ácido Ascórbico em esquema terapêutico combinado com drogas quimioterápicas (Liu et al., 2016). Nestas, o efeito sinérgico entre a Vitamina C e os fármacos DNMTis foi distintamente elucidado.

Mediante esta perspectiva, o conhecimento da ação farmacocinética e o reconhecimento dos mecanismos epigenéticos possibilitaram a descoberta de duas características valiosas do Ácido Ascórbico: o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio e a desmetilação do DNA intermediada pela ativação das enzimas *Ten-Eleven Translocation* (Shenoy et al., 2018).

Este grupo de dioxigenases – TET1, TET2 e TET3 –, diferentemente dos inibidores

de DNA metiltransferase, atuam na via de desmetilação ativa. Isto porque, promovem a hidroxilação da 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), e sucessivamente em outros dois subprodutos, os quais podem ser substituídos por citosinas não metiladas através do sistema de reparo do DNA (Putiri et al., 2016). Este processo ocorre naturalmente e resulta na reversão específica do *locus* da metilação do DNA (Rasmussen e Helin, 2016). Neste âmbito, a Vitamina C funciona como um cofator para as enzimas TET, facilita a atividade destas proteínas e aumenta a desmetilação ativa (Sajadian et al., 2016). Na figura 3 é ilustrado os mecanismos de ação da Vitamina C e dos DNMTs, ambos são agentes hipometilantes. Contudo, estes se diferenciam pela via de ativação da desmetilação do DNA.

Figura 3 - Vias de desmetilação do DNA



Fonte: Adaptada de Ambrosi et al., 2017

A percepção da função da metilação do DNA aberrante no mecanismo

tumorigênico permitiu com que os agentes desmetilantes se tornassem o foco das terapias epigenéticas. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de reprogramação celular relacionados ao processo de desmetilação. São necessárias investigações complementares, inclusive que possibilitem a compreensão do efeito da 5hmC na manutenção da metilação do DNA (Rasmussen e Helin, 2016).

Apesar disso, sabe-se que a síntese da base intermediária 5hmC é a segunda modificação do DNA mais significativa. Seus níveis globais são variáveis nos distintos tecidos normais, e sua perda é descrita em uma série de neoplasias, tais como, tumores de pulmão, cólon, cérebro, mama, fígado, próstata, rim e melanoma (Arviden et al., 2017).

Também, estudos científicos publicados recentemente mostraram redução significativa do nível de 5-hidroximetilcitosina em carcinoma de células escamosas – CEC –, inclusive oral (Nunez et al., 2018; Wang et al., 2017). Circunstância que torna a base 5hmC um potencial marcador preditivo de mau prognóstico e sobrevida para múltiplos tipos de câncer (Chen et al., 2016).

Neste aspecto, evidências emergentes sugerem que o Ácido Ascórbico desempenha função primordial na conversão da 5mC em 5hmC. Aliás, predispõe as células de melanoma à apoptose (Sajadian et al., 2016). Do mesmo modo, em concentrações fisiológicas por via oral (Shenoy et al., 2018), a Vitamina C é capaz de promover a desmetilação do DNA e consequente re-expressão de genes supressores de tumor (Young, et al., 2015).

Esta particularidade também é descrita em análises realizadas em linhagem celular de linfoma, na qual o AA em concentrações farmacológicas de via intravenosa, aumentou a expressão de gene supressor de tumor e apresentou efeito quimiossensibilizante sobre as células examinadas (Shenoy et al., 2017).

Em relação aos tumores sólidos, estudos pré-clínicos confirmam que a Vitamina C, além de apresentar potencial atividade anticancerígena, reduz a toxicidade dos agentes quimioterápicos (Monti et al., 2012). Igualmente, quando associada ao DNMTi 5-aza-CdR, o Ácido Ascórbico promove a inibição da proliferação de células tumorais e o aumento da morte celular programada. Além disso, tais efeitos estão associados ao restabelecimento da resposta imune inata em pacientes portadores de neoplasias hematológicas (Liu et al., 2016).

Sendo assim, a Vitamina C pode ser considerada um mediador crítico da

desmetilação epigenômica (Camarena e Wang, 2016). Sobre a qual, os fatores ambientais e genéticos capazes de influenciar sua síntese, bem como, absorção, transporte e metabolismo podem modular o controle epigenético e interferir no processo saúde-doença (Young et al., 2015).

Contudo, até o momento, não há pesquisas *in vivo* que esclareçam de maneira fidedigna a capacidade do Ácido Ascórbico em reprogramar a metilação tumoral, além de posologia e esquema de tratamento adequados (Shenoy et al., 2017).

Diante dos argumentos apresentados, é incontestável o potencial do AA como um promissor agente desmetilante, no entanto, a documentação epidemiológica na literatura científica sobre a relação entre Vitamina C e o câncer, ainda é incipiente e necessita de novas análises (Young et al., 2015).

2.6 PECULIARIDADES DOS GENES ANALISADOS

2.6.1 *KRT13* (Queratina 13)

O gene da queratina 13 codifica uma proteína que é expressa normalmente em células diferenciadas do epitélio estratificado escamoso não corneificado (Schweizer, 2006). Denominada oficialmente em 2006 pela Organização do Genoma Humano (HUGO) como queratina, esta proteína consiste em uma estrutura filamentosa intermediária, expressa na camada suprabasal e de característica ácida, cuja função é manter a integridade estrutural e a estabilidade das células epiteliais (Takkem et al., 2018).

O padrão de expressão das queratinas é altamente conservado e, portanto, qualquer alteração na taxa de crescimento ou nível de diferenciação destas proteínas, podem ocasionar neoplasias (Safadi et al., 2019; Belaldalvar et al., 2016). Em CEC oral, algumas pesquisas mostram que a expressão de *KRT13* é observada em tumores com perfil de diferenciação moderado a elevado. Entretanto, a superexpressão desta queratina sugere a natureza agressiva do tumor, bem como, a predisposição a metástase (Belaldalvar et al., 2016).

No entanto, apesar do reconhecimento da importância da K13 na carcinogênese, os mecanismos epigenéticos envolvidos nestas alterações são incertos. Sabe-se apenas que o promotor do gene que expressa esta proteína é hipermetilado (Naganuma et al., 2014).

2.6.2 *MAGEA1* e *MAGEB2* (Antígeno Específico de Câncer e Testículo)

Os antígenos de câncer e testículo compreendem uma família de genes que são expressos praticamente de maneira exclusiva em células germinativas humanas normais, e de forma aberrante na maioria das células tumorais (Beppu et al., 2017; Gordeeva, 2015).

No testículo, por se tratar de um sítio protegido da ação antigênica, os CTAs que são proteínas altamente imunogênicas, apresentam atividade inócua e, portanto, constituem um alvo propício para a imunoterapia específica contra o câncer. (Gjerstorff et al., 2015). A atribuição dos antígenos de câncer e testículo na tumorigênese não está bem esclarecida, todavia pode estar relacionada com a regulação da transcrição gênica, o aumento do ciclo celular e a supressão da cascata de sinalização da apoptose (Heninger et al., 2016).

Atualmente estão documentadas aproximadamente 100 famílias de genes, entretanto, nem todos são capazes de induzir resposta imune. Isto posto, para que seja efetivamente considerado imunoterapêutico o CTA deve enquadrar-se nas três particularidades:

- a) Expressão em distintos tipos de câncer;
- b) Quando manifesto em uma determinada neoplasia sua expressão deve ser proporcional ao estágio clínico-patológico;
- c) Apresentar expressão simultânea com pelo menos outro antígeno.

Dentre os primeiros a serem identificados e mais significativos CTAs estão os antígenos *MAGEA1* e *MAGEB2*.

A família *MAGEA* é composta de 12 membros, que estão localizados na região q28 do cromossomo X. Estes apresentam baixa expressão nos tecidos normais, quase restrita aos testículos, especificidade imprescindível aos antígenos, a fim de impedir a autoimunidade (Kerker et al., 2016; Cabalero e Chen, 2009).

O *MAGEA1* foi o primeiro antígeno humano a ser caracterizado. E, apesar de induzir a imunidade humoral espontânea, suscita uma resposta celular baixa, e improvável de ser detectada em pacientes com câncer. Esta circunstância não compromete a função deste antígeno que de maneira surpreendente regula a expressão de genes envolvidos no crescimento de células tumorais (CTdatabase, 2019).

Já a família de genes *MAGEB* é constituída por 4 membros, dos quais o gene *MAGEB2* é o mais expresso. Esta classe gênica está agrupada na posição p21.3 do cromossomo X, e é homóloga a família *MAGE*. No entanto, são transcritos de maneira fisiológica não somente nos testículos, mas também na placenta. Além disso, ao contrário da família *MAGEA*, os genes *MAGEB* originam resposta imune exclusivamente humoral (CTdatabase, 2019).

Contudo, apesar das diferenças existentes entre as classes gênicas *MAGEA* e *MAGEB*, ambas são reguladas pela desmetilação do promotor (Pattani et al., 2012).

2.6.3 MMP2 (Metaloproteinase de Matriz 2)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases dependente de Zn^{2+} , inicialmente identificadas como proteínas processadoras da catálise hidrolítica do colágeno (Amar, Smith e Campos, 2017). Desta maneira, participam da remodelação fisiológica da matriz extracelular (MEC) e manutenção das propriedades bioquímicas e mecânicas dos tecidos (Trypuć et al., 2016).

Entretanto, embora as MMPs sejam essenciais em inúmeros processos biológicos e eventos celulares fisiológicos, há interesse crescente nestas enzimas, decorrente de descobertas científicas que descrevem sua participação significativa no desenvolvimento de doenças especialmente o câncer (Löffek et al., 2011).

A atividade das metaloproteinases de matriz é regulada por expressão gênica, modificações pós-traducional da proteína, indutores de atividade enzimática e por inibidores fisiológicos, estes denominados de inibidores teciduais de metaloproteinases – TIMPs. Contudo, o desequilíbrio sérico entre as MMPs e TIMPs promove a ruptura da homeostase e o consequente aparecimento de alterações patológicas (Liu e Khalil, 2017).

Ainda neste sentido, acredita-se que as células neoplásicas também secretam enzimas proteolíticas. Estas além de degradarem as membranas basais e os componentes da MEC, em um processo crucial para invasão local e metástase (Lin et al., 2013), liberam moléculas biologicamente ativas, que favorecem o crescimento tumoral (Trypuć et al., 2016).

As MMPs apresentam diversas classes, cuja classificação baseia-se em dois aspectos:

- a) Organização estrutural – domínio funcional;

b) Substrato específico de degradação.

Diante disso, a classe das gelatinases que compreende os tipos A (MMP2) e o B (MMP9), degradam especificamente o colágeno desnaturado (gelatinas) e o colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal (Cieplak e Strongin, 2017) e por isso são consideradas enzimas primordiais para invasão e metástase do câncer oral (Ruan et al., 2014).

A análise da expressão de MMPs no câncer bucal é uma ferramenta importante no prognóstico. Muitos estudos relatam aumento da expressão de MMP2 e MMP9 e as relacionam a invasão e a metástase no CEC oral (Hong et al., 2006).

2.6.4 *TIMP1* e *TIMP2* (Inibidores de Metaloproteinases de Matriz)

Os *TIMPs* no genoma humano constituem uma classe de 4 espécies conhecidas – *TIMP 1*, *2*, *3* e *4*. Os inibidores não possuem domínios específicos e por isso são capazes de impedir a ação de todos os tipos de MMPs (Brew e Nagase, 2010).

Estes agentes são proteínas multifuncionais que, além da atividade inibidora sobre as metaloproteinases de matriz, desempenham outras funções, tais como, regulação da proliferação celular e apoptose (Jiang et al., 2002). No entanto, também são capazes de estimular o crescimento e promover ação antiapoptótica (Brew e Nagase, 2010).

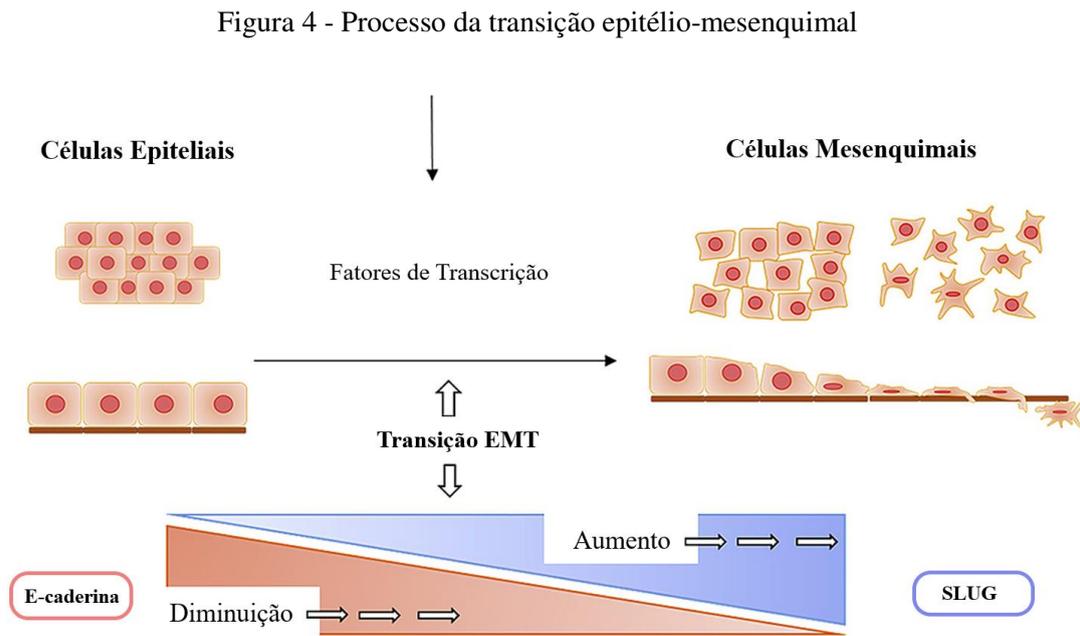
O *TIMP1* é um potente inibidor de MMPs, exceto para algumas enzimas associadas a membrana (MT-MMP), liga-se fortemente a MMP9, enquanto *TIMP2* interage com MMP2 (Cieplak e Strongin, 2017).

Os genes *TIMP1* e *TIMP2* são os inibidores mais pesquisados, isso porque, estão diretamente relacionados a progressão e a metástase tumoral (Pulukuri et al., 2007). Entretanto, diferem-se quanto ao processo transcricional em neoplasias. O gene *TIMP1* é superexpresso (Cheng et al., 2016) em uma grande variedade de linhagens de câncer (Cheng et al., 2016), enquanto que o gene *TIMP2* permanece silenciado devido a hipermetilação do promotor (Pulukuri et al., 2007).

2.6.5 *SLUG* (Fator de Transcrição Dedo de Zinco)

É um fator de transcrição dependente de Zn^{2+} também conhecido como *SNAI2*. Além de apresentar atividade crucial na organogênese, possui função antiapoptótica e

capacidade de reprimir a transcrição da E-caderina – glicoproteína transmembrana encarregada de garantir a manutenção da adesão celular (Ashaie et al., 2016). Seu mecanismo de ação está baseado em sua capacidade de regular a transição epitélio-mesenquimal (EMT), conforme ilustrado no esquema da figura 4.



Fonte: Adaptado de Lee et al., 2016

Este processo biológico é fundamental durante o desenvolvimento embrionário, tal como, para a cicatrização e regeneração tecidual. No entanto, a superexpressão de *SLUG* reprime a expressão da proteína mesenquimal E-caderina. Esta circunstância permite que as células epiteliais imóveis sofram modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, e adquiram um fenótipo mesenquimal – células estaminais cancerígenas (Peng et al., 2017). Tal condição favorece a invasão, metástase e inclusive a resistência celular à drogas antitumorais (Haslehurst et al., 2012). Entretanto, este processo é controverso, pois a degradação parcial da matriz – mas não a completa – é deletéria (Nakamura et al., 2018).

O *SLUG* é expresso em vários tipos de câncer, inclusive em CEC oral, nos quais regula inúmeros processos relacionados com a tumorigênese, dentre estes, a proliferação, a apoptose e a motilidade celular (Nakamura et al., 2018).

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do tratamento com os agentes desmetilantes 5-aza-CdR e Vitamina C, em células de carcinoma espinocelular oral de língua (SCC-9), na regulação da expressão gênica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar a expressão de genes capazes de potencializar os efeitos benéficos dos agentes desmetilantes, 5-aza-CdR e Ácido Ascórbico, em linhagem celular de carcinoma espinocelular de Língua (SCC-9). Para tal analisamos os genes:

KRT13 – relacionado ao aumento da diferenciação celular

MAGEA1 e *MAGEB2* – associados a imunogenicidade celular – alvos da imunoterapia contra o câncer.

Avaliar a transcrição de genes relacionados a prováveis efeitos colaterais decorrentes da utilização dos fármacos hipometilantes 5-aza-CdR e Ácido Ascórbico, na mesma linhagem celular (SCC-9). Desta maneira investigamos os genes:

MMP2, *TIMP1* e *TIMP2* – correlacionados a migração e invasão celular.

SLUG – alusivo a transição epitélio-mesenquimal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

a) Linhagem celular e cultura de células

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular de carcinoma epidermoide de língua humano SCC-9 (ATCC® CRL-1629™) na passagem 52, cultivadas em meio padrão: DMEM/Ham's F12 suplementado com Hidrocortisona (400 ng/ml), Soro Fetal Bovino (FBS) (10%), Penicilina (100 U/ml), Estreptomicina (100 µg/ml) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Conforme especificações da tabela 1.

Tabela 1 - Descrição da linhagem celular de carcinoma espinocelular de língua SCC-9

Característica	Detalhamento
Linhagem celular	SCC9
Código de acesso	CRL-1629
Mutações (homozigose)	TP53 c.822_853del32 CDKN2A c.1_150del150
Doença	CEC de língua
Espécie	Homo sapiens
Sexo	Masculino
Idade	25 anos
Tumorigênica	Sim

Fonte: American Type Culture Collection

Inicialmente, as células foram expandidas e plaqueadas em meio padrão, na concentração de 7.5×10^4 céls/mL, em placa de 96 poços (n = 8), durante 24 horas para adesão celular. Em seguida, foram submetidas ao ensaio de carenciamento, no qual, as células permaneceram em meio sem FBS, no período de 24 horas, com a finalidade de sincronizar o ciclo celular.

b) Ensaio de citotoxicidade pelo método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) para o Ácido Ascórbico

Após o carenciamento celular, foi realizado o teste de MTT (Invitrogen, Carlsband, CA, USA), conforme as orientações do fabricante. Este teste avaliou, com o auxílio de análise colorimétrica, o metabolismo das células após o tratamento com o Ácido Ascórbico em diferentes concentrações e assim, determinou a porcentagem de viabilidade celular.

A princípio as células foram subdivididas em 7 grupos:

Grupo 1: Células não submetidas ao tratamento com Ácido Ascórbico – imediatamente após o carenciamento

Grupo 2: Células cultivadas em meio sem suplementação com Ácido Ascórbico – Controle Negativo

Grupo 3: Células tratadas com Ácido Ascórbico na concentração de 50 μM

Grupo 4: Células tratadas com Ácido Ascórbico na concentração de 100 μM

Grupo 5: Células tratadas com Ácido Ascórbico na concentração de 150 μM

Grupo 6: Células tratadas com Ácido Ascórbico na concentração de 200 μM

Grupo 7: Células cultivadas em meio suplementado com Triton 1% – Controle Positivo.

Ambos os grupos foram submetidos a seus respectivos tratamentos durante o período máximo de 48 horas. Decorridas as primeiras 24 horas, o meio específico de cada grupo foi removido e substituído por outro, que permaneceu por mais 24 horas.

Posteriormente ao tratamento, foi executado o ensaio de citotoxicidade propriamente dito. Para isto, os sobrenadantes dos grupos foram removidos e estes incubados em meio complementado com o reagente MTT, na concentração de 0,3 mg/ml, no decorrer de 3 horas à 37 °C e 5% de CO₂. Logo após, os cristais de formazam, resultantes da redução do MTT, foram solubilizados com etanol 100% e a absorbância medida no comprimento de onda de 570 nm, em um leitor automático de placas de cultura. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular, e não demonstraram citotoxicidade para nenhuma das concentrações de Vitamina C. O teste de MTT foi realizado apenas para a análise do Ácido Ascórbico, pois o departamento já havia executado anteriormente o ensaio para o fármaco 5-aza-CdR [0,3 - 300 μM].

c) Tratamento celular com drogas desmetilantes

Determinados os referenciais de citotoxicidade para os agentes desmetilantes 5-aza-CdR e Vitamina C, em um segundo momento, foram realizadas as análises propostas pela pesquisa. Para tal, primeiramente as substâncias foram preparadas conforme as orientações do fabricante:

- 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR): A substância 5-aza-CdR (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foi diluída em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1%.
- Vitamina C (L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate): O fármaco Ácido Ascórbico (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha) foi diluído em água destilada.

Posteriormente, as células de carcinoma epidermoide de língua foram expandidas, plaqueadas e carenciadas conforme descrito. E em seguida, subdivididas em 3 grupos:

Grupo C: Células tratadas apenas com meio padrão – Controle

Grupo D: Células tratadas com 5-aza-CdR na concentração de 0,3 μ M

Grupo V: Células tratadas com Ácido Ascórbico na concentração de 150 μ M

Ambos os grupos foram submetidos a seus respectivos tratamentos durante o período máximo de 48 horas. Decorridas as primeiras 24 horas, o meio específico de cada grupo foi removido e substituído por outro, que permaneceu por mais 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata biológica.

d) Extração de RNA

As células de cada um dos grupos de tratamento foram lavadas com PBS na concentração de 1% e tripsinizadas. E então, os pellets celulares foram lisados e incubados em reagente Trizol[®]/clorofórmio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e armazenados a -80 °C. Em um segundo momento, foi realizada a extração do RNA e a purificação, com o auxílio de isopropanol, conforme as recomendações do fabricante. Rapidamente, após a purificação dos ácidos nucleicos cada uma das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). Neste, foram mensuradas a concentração e a pureza amostral. Todas as eluições apresentaram razões A260nm/A280nm apropriadas de aproximadamente 2,0. E imediatamente, os RNAs extraídos e purificados, foram armazenados

a -80 °C.

e) Transcrição Reversa e Análise de Expressão

As amostras de RNAs isolados foram transcritas em cDNAs. Durante o processo foi utilizado o sistema Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Posteriormente, foram realizadas as análises de expressão gênica através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR - LightCycler® 480 System, Roche). Para tal, foram selecionados sete genes: *KRT13*, *MAGEA1*, *MAGEB2*, *MMP2*, *SLUG*, *TIMP1* e *TIMP2*. As reações foram realizadas em volume final de 10 µl usando o reagente Lumino CT qPCR ready mix (Sigma Aldrich, Darmstadt, Alemanha). A concentração dos primers foi de 250 nM e as sequências estão apresentadas no quadro 2. As condições da PCR foram: 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72 °C por 15 segundos. Nas reações foram incluídos controles negativos para cada gene, e estas foram executadas em duplicata técnica. Neste estudo, o gene de referência escolhido foi o GAPDH, a partir do qual, os dados da expressão gênica relativa foram normalizados. O método utilizado para a análise quantitativa foi o fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Na tabela 2 estão esquematizadas as sequências dos primers dos genes analisados.

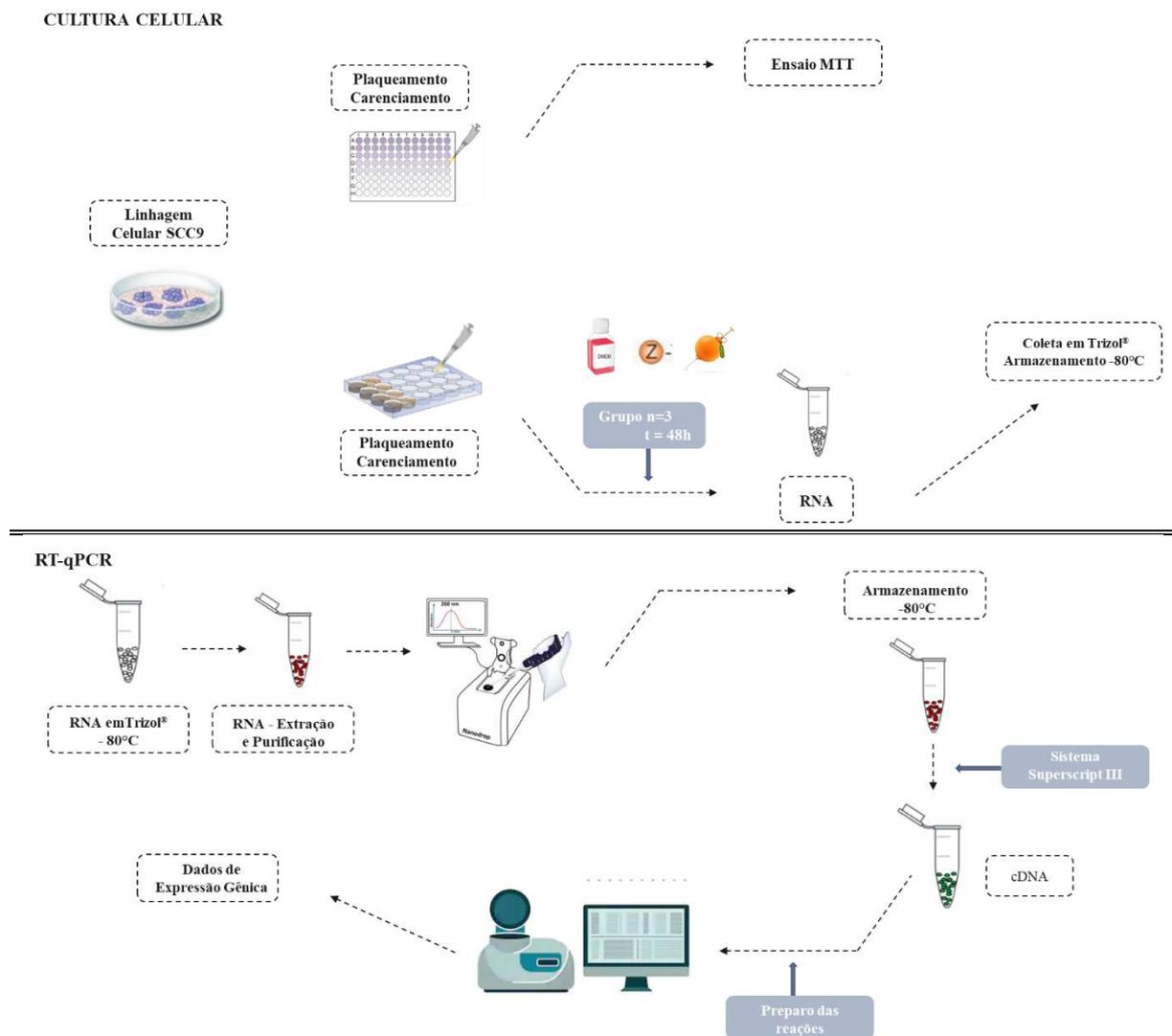
Tabela 2 - Sequência dos primers para análise de expressão qPCR

Gene	Forward 5' -> 3'	Reverse 5' -> 3'
<i>GAPDH</i>	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC	CCACCACCCTGTTGCTGTAG
<i>KRT13</i>	CCCCAGGCATTGACCTGAC	TGTTGGTAGACACCTCCTTGTC
<i>MAGEA1</i>	CCATCAACTTCACTCGACAGAGG	CGGAACAAGGACTCCAGGATAC
<i>MAGEB2</i>	GGCCTTGAGCTGAATAAAGTCAA	ACTGAGCAGGGATTTCCTCATC
<i>TIMP1</i>	ACCACCTTATACCAGCGTTATGA	GGTGTAGACGAACCGGATGTCAG
<i>TIMP2</i>	GCTGCGAGTGCAAGATCACG	TGGTGCCCGTTGATGTTCTTC
<i>MMP2</i>	CCCACTGCGGTTTTCTCGAAT	CAAAGGGGTATCCATCGCCAT
<i>SLUG</i>	CGAACTGGACACACATACAGTG	CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT

f) Análises Estatísticas

Para as análises de expressão gênica foi usado o programa GraphPad Prism 8, e utilizado o teste de Shapiro Wilk para verificar a distribuição normal, o Teste F para verificar igualdade de variâncias e o Teste estatístico t Student ($p < 0.05$). Para medir o tamanho do efeito – *effect size* – foi usado o teste Eta squared, onde 0.01 = pequeno efeito, 0.03 = médio efeito e 0.5 = grande efeito. Diante disso, a metodologia utilizada neste estudo pode ser sintetizada conforme a figura abaixo.

Figura 5 - Representação esquemática da metodologia desenvolvida na pesquisa



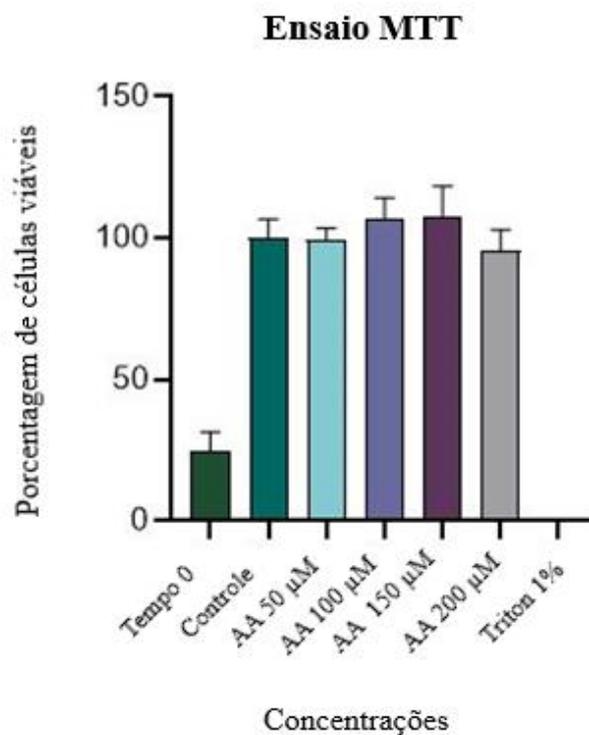
Fonte: Autora, 2019

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE MTT PARA ÁCIDO ASCÓRBICO

Na análise de viabilidade celular realizada para o uso do Ácido Ascórbico, nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade, e mantiveram o percentual de células viáveis de aproximadamente 100%, como demonstrado na Figura 6. As concentrações foram selecionadas em concordância com as grandezas de referência descritas na literatura, e estão próximas dos valores fisiológicos de Vitamina C.

Figura 6 - Teste de viabilidade celular para o Ácido Ascórbico

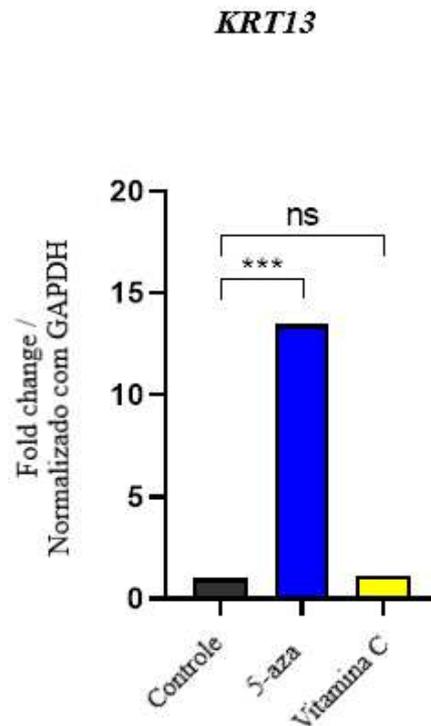


5.2 EXPRESSÃO DO GENE *KRT13*

Na análise de expressão de *KRT13*, foi observado aumento na expressão deste gene por intermédio do uso de 0,3 µM de 5-aza-CdR ($p = 0.0002$) durante 48 horas em relação ao grupo não tratado. O tamanho do efeito – *effect size* – foi grande ($\eta^2 = 0.97$). Já o Ácido

Ascórbico na concentração de 150 μM por 48 horas não alterou a expressão deste gene em relação ao controle ($p = 0.88$), conforme ilustra a figura 7.

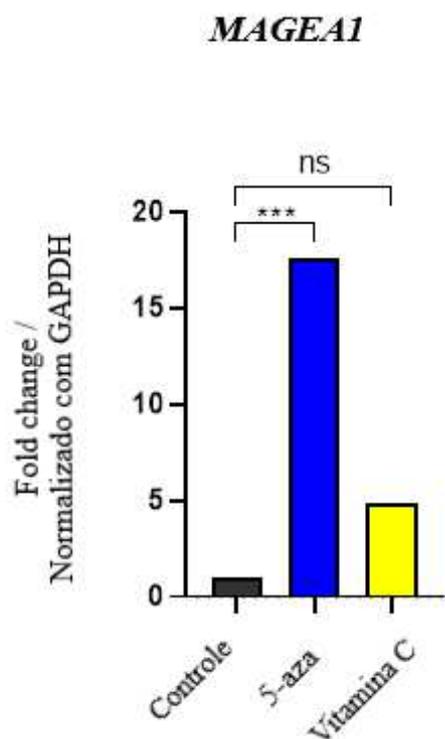
Figura 7 - Expressão relativa por PCR quantitativa do gene *KRT13* nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$)



5.3 EXPRESSÃO DO GENE *MAGEA1*

Na análise de expressão do gene *MAGEA1*, foi constatado aumento na expressão deste com o uso de 0,3 μM de 5-aza ($p = 0.0009$) por 48 horas em relação ao grupo não tratado. O tamanho do efeito foi grande ($\eta^2 = 0.95$). Enquanto que a utilização de Ácido Ascórbico na concentração de 150 μM durante 48 horas não alterou a expressão deste gene em relação ao controle ($p = 0.1922$), condição esquematizada na figura 8.

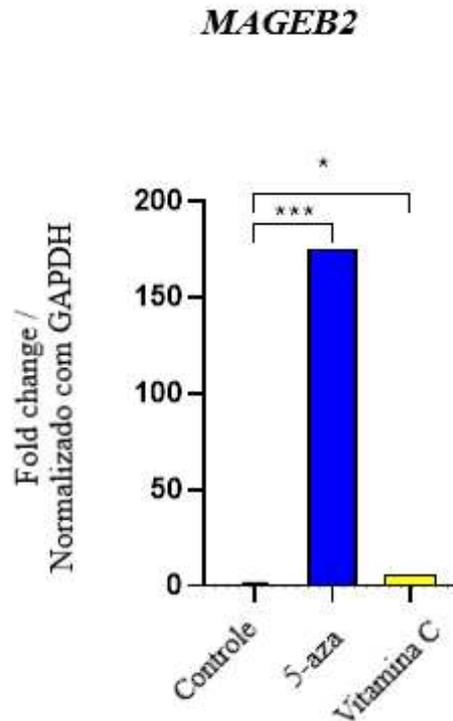
Figura 8 - Expressão relativa por PCR quantitativa do gene *MAGEA1* nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)



5.4 EXPRESSÃO DO GENE *MAGEB2*

A análise de expressão de *MAGEB2* apresentou aumento do nível de expressão gênica, mediante a administração de 0,3 μM de 5-aza ($p = 0.0002$) durante 48 horas em relação ao grupo controle, e tamanho do efeito alto ($\eta^2 = 0.95$). Além disso, a suplementação de Ácido Ascórbico na concentração de 150 μM por 48 horas também aumentou a expressão deste gene em relação ao grupo não tratado ($p = 0.0342$), cujo tamanho do efeito foi médio ($\eta^2 = 0.7$), de acordo com a figura 9.

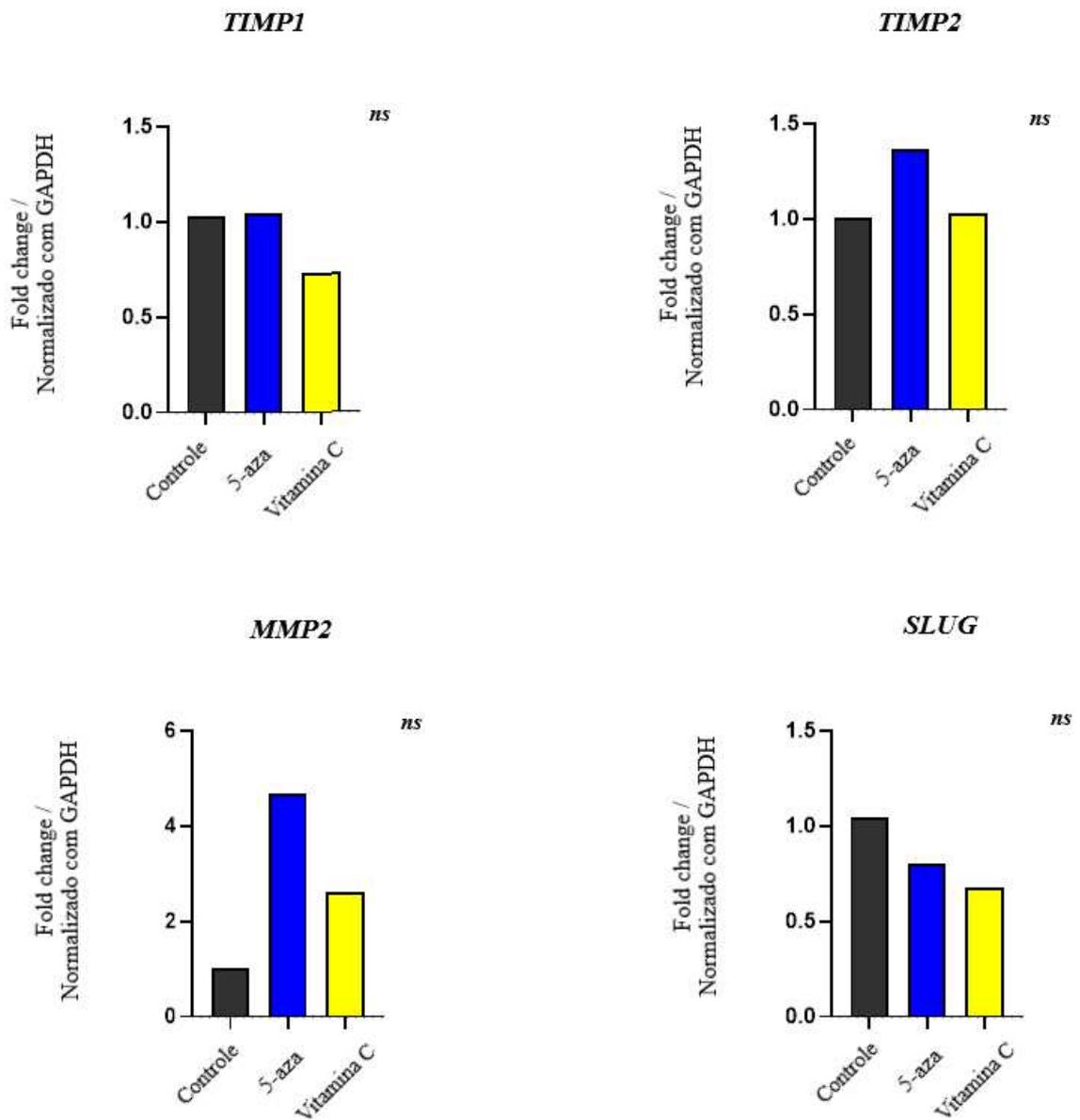
Figura 9 - Expressão relativa por PCR quantitativa do gene *MAGEB2* nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)



5.5 EXPRESSÃO DE *MMP2*, *TIMP1*, *TIMP2* E *SLUG*

Nas análises dos genes *MMP2* (5-aza x Controle, $p = 0.2722$ e Vitamina C x Controle, $p = 0.0627$), *TIMP1* (5-aza x Controle, $p = 0.8324$ e Vitamina C x Controle, $p = 0.3271$), *TIMP2* (5-aza x Controle, $p = 0.0602$ e Vitamina C x Controle, $p = 0.8148$) e *SLUG* (5-aza x Controle, $p = 0.4347$ e Vitamina C x Controle, $p = 0.3269$) não foram constatadas diferenças na expressão destes genes, tanto na aplicação de $0,3 \mu\text{M}$ de 5-aza, quanto na suplementação com $150 \mu\text{M}$ de Ácido Ascórbico, durante 48 horas de tratamento para ambos os fármacos, em relação ao grupo controle, circunstância exemplificada na figura 10.

Figura 10 - Expressão relativa por PCR quantitativa dos genes *TIMP1*, *TIMP2*, *MMP2* e *SLUG* nas células SCC-9. Valores mostrados em fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)



6 DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou alterações na expressão de genes responsáveis pela ativação de sequências de DNA metiladas endogeneamente em face ao uso dos agentes desmetilantes do DNA, o inibidor da metilação 5-aza-CdR, e o ativador das enzimas TET, o Ácido Ascórbico, nas células de linhagem de CEC oral. Estas regiões metiladas endogeneamente estão associados às vias imune-oncológicas, consideradas novos alvos para a terapia epigenética contra o câncer. Além disso, o trabalho investigou se o uso de 5-aza-CdR e Ácido Ascórbico poderia ter como efeito colateral o aumento da expressão de genes associados a invasão celular.

Os efeitos antitumorais da baixa dosagem do fármaco 5-aza-CdR são descritos em inúmeros tipos de câncer. Estes estudos relatam que as propriedades deste agente desmetilante resultam da sua capacidade em reexpressar genes que foram silenciados de forma aberrante por hipermetilação e, desta forma, induzir a expressão de genes que promovem a diferenciação celular, a apoptose e a redução na sua capacidade tronco (Sharma et al., 2010).

Contudo, trabalhos recentes descrevem novos mecanismos de ação das drogas desmetilantes, os quais podem ser benéficos no combate ao fenótipo tumoral. Estes medicamentos são capazes de estimular propriedades imunomodulatórias em células malignas e, além disso, impulsionar a imunogenicidade tumoral (Yoo et al., 2019). Tais particularidades são decorrentes da ativação de elementos transponíveis – HERVs - retrovírus endógeno humano - cujo aumento da expressão afeta negativamente a sobrevivência das células cancerígenas e induz o mimetismo viral – e da re-expressão de CTAs – facilita a detecção e destruição das células neoplásicas pelo sistema imunológico (Jones et al., 2019; Narayanan et al., 2017; Roulois et al., 2015).

Estas descobertas foram de extrema relevância para a pesquisa contra o câncer, pois propiciam uma nova perspectiva da terapêutica, capaz de melhorar a imunogenicidade do próprio paciente e, possivelmente, promover a remissão da doença.

Dentro deste cenário, os efeitos desmetilantes do Ácido Ascórbico começaram a ser explorados. Dessa forma, foi possível identificar a capacidade da Vitamina C em modular a atividade genômica e, portanto, interferir na regulação epigenética (Ngo et al., 2019; Gerecke et al., 2018; Liu et al., 2016).

O presente estudo investigou a expressão de genes relacionados a diferenciação e invasão celular, e também CTAs. Neste observou-se o aumento da expressão de alguns destes genes ao serem tratados isoladamente com os agentes demetilantes, Vitamina C e 5-aza-CdR.

A expressão do gene *KRT13* é perdida pela metilação do DNA na malignização das lesões orais. A redução da queratina 13 no câncer bucal é confirmada por Adami et al. (2017) e Farrukh et al. (2015). O uso de 5-aza nesta pesquisa demonstrou um aumento na expressão de *KRT13*. Apesar da desmetilação de genes associados a diferenciação celular não ser uma implicação inédita ocasionada pelos agentes desmetilantes, o silenciamento deste gene é fundamental na carcinogênese oral (Naganuma et al., 2014) e, por isso, a investigação de sua expressão nas células de CEC oral, em consequência do uso destas substâncias foi considerada.

O tratamento desta mesma linhagem celular com a droga 5-aza também aumentou a expressão dos CTAs, *MAGEA1* e *MAGEB2*. Os CTAs estão frequentemente sujeitos ao controle pela metilação do DNA (Steele et al., 2009; De Smet et al., 1996) Ademais, com exceção dos testículos, placenta e ovários fetais, a expressão da família *MAGE* é suprimida nos tecidos normais. (Simpson et al., 2005).

Alguns trabalhos mostraram que *MAGEB2* é o gene da família *MAGEB* mais expresso em distintos tipos de câncer e, portanto, é um antígeno altamente reconhecido pelo sistema imune. Ainda, a superexpressão deste gene em tumores orais primários é consequência da desmetilação de seu promotor (Pattani et al., 2012).

A expressão da família *MAGEB* pode aumentar a proliferação celular, entretanto não é evidente se estes genes podem ser considerados oncogenes. Quando superexpresso nos queratinócitos orais, o *MAGEB2* aumentou a proliferação destas células, no entanto, esta condição não foi evidenciada em linhagens de câncer oral (Pattani et al., 2012).

A premissa de induzir a expressão de CTAs e por conseguinte, a imunogenicidade celular, difere da abordagem clássica do tratamento epigenético, cujo propósito é aumentar a expressão de supressores de tumor. No entanto, a família *MAGE* é considerada um foco potencial para as vacinas contra o câncer, em razão da sua eficiência ao promover respostas imunológicas humoral e celular (Schooten et al., 2018; Daudi et al., 2014)

De fato, atualmente, muitos pesquisadores estão empenhados em desenvolver vacinas que teriam como alvo os CTAs. Deste modo, múltiplos ensaios clínicos foram

realizados, principalmente direcionados ao antígeno MAGEA3 (Schooten et al., 2018). Todavia, mesmo diante de resultados encorajadores, numerosas reações adversas foram relatadas (Zajac et al., 2017).

A expressão de antígenos de câncer e testículo nos tumores é heterogênea e ocorre apenas em algumas células da massa tumoral (Pattani et al., 2012). Por este motivo, a ativação de CTAs por meio do uso de agentes desmetilantes torna-se um alvo atraente para a terapia, visto que são capazes de gerar peptídeos antigênicos responsáveis por aumentar a imunogenicidade celular. Aliás, os antígenos de câncer e testículo podem ser reativados rapidamente e de forma robusta através do tratamento com os DNMTis (Pattani et al., 2012). Circunstância evidente nesta pesquisa, na qual constatou-se que o gene *MAGEB2* apresentou maior expressão frente ao uso de 5-aza. Condição também verificada nas células tratadas com o Ácido Ascórbico.

O fármaco 5-aza-2'-desoxicitidina é considerado um dos mais importantes tratamentos epigenéticos contra o câncer, e seus efeitos benéficos são descritos em uma série de pesquisas (Cheishvili et al., 2015; Yoo e Jones, 2006). No entanto, alguns estudos relataram o aumento da capacidade de invasão celular em linhagens de células tratadas com a droga 5-aza-CdR. E este efeito colateral, certas vezes, foi associado ao aumento da expressão de MMPs – endopeptidases importantes para o fenótipo de invasão tumoral (Yu e Kim, 2016; Sato et al., 2003).

Contudo, no presente estudo, não foram encontradas alterações significativas na expressão de *MMP2*, *TIMP1* e *TIMP2* e *SLUG*. Ainda assim, sabe-se que estes dados não são suficientes para excluir um possível efeito negativo da utilização do medicamento 5-aza no tratamento das células de câncer oral, bem como, compreende-se a necessidade de executar outros experimentos que analisem a migração e a invasão celular mediante o uso dos fármacos desmetilantes.

Em contrapartida, o Ácido Ascórbico é uma substância segura e bem tolerada como suplemento vitamínico. Desta forma, poderia ser utilizada convenientemente no cuidado do paciente em tratamento contra o câncer. No presente trabalho, a Vitamina C foi capaz de aumentar a expressão gênica apenas do gene *MAGEB2*. Isso nos mostra que o AA tem potencial desmetilante em linhagens celulares de câncer oral. Obviamente, novos ensaios em concentrações distintas e tempos diferentes podem contribuir para elucidar a função da

Vitamina C neste tipo de tumor.

O Ácido Ascórbico exerce ação desmetilante de forma distinta do fármaco 5-aza – desmetilação ativa – e atua como um cofator e ativador das enzimas desmetilantes TETs. Estas dioxigenases produzem a 5hmC a partir da oxidação de 5mC que será substituída pela 5C na reação de reparo de nucleotídeos (Shenoy, et al., 2018; Young et al., 2015).

A imunoprecipitação da cromatina de TET1 *in vivo* mostra que ela é altamente enriquecida em ilhas CpG, a maioria das quais está associada aos promotores. Ademais, em contraste com a TET1, a estrutura de TET2 não apresenta qualquer domínio discernível que permita a ligação direta ao DNA e, portanto, é potencialmente recrutada para o DNA genômico por domínios distintos a TET1 ou estruturas secundárias do DNA (Rasmussem et al., 2016).

Alguns estudos relatam que a modificação 5hmC é capaz de recrutar fatores de transcrição específicos e modificar a cromatina (Wu et al., 2014). Desta maneira, não é possível saber se os efeitos benéficos provenientes da utilização da Vitamina C descritos na literatura são apenas resultantes do aumento de expressão de genes-chave ou ainda, da modificação da cromatina em decorrência do aumento de 5hmC.

A quantidade de 5hmC é relativamente alta nos melanócitos e diminui progressivamente nos estágios da transformação maligna. Igualmente, a 5hmC é perdida durante a transformação da displasia ao carcinoma espinocelular oral. Condições que corroboram para que pesquisas apontem que a perda de 5hmC possa ser considerada um novo marcador para a maioria dos tipos de câncer (Cuevas-Nunez et al., 2018; Jäwert et al., 2013). Com relação ao uso da vitamina C no câncer, trabalhos recentes mostram, além do aumento da 5hmC, efeitos pró-apoptóticos do Ácido Ascórbico, sendo estes mais pronunciados quando em associação ao 5-aza, como diminuição da malignidade, da proliferação e potencial invasivo em alguns tipos tumorais (Liu et al., 2016)

Ainda não havia na literatura científica estudo que demonstrasse a capacidade do Ácido Ascórbico em esquema de suplementação único de aumentar a expressão de CTAs. Ou sequer que verificasse os possíveis efeitos colaterais decorrentes da utilização desta vitamina no câncer. Semelhantemente, em relação ao CEC oral existem poucos estudos documentados sobre a abordagem terapêutica mediante o uso do medicamento 5-aza. Do mesmo modo, não foi encontrado nenhum estudo que avaliasse o efeito da Vitamina C no câncer oral.

Esta investigação é um prospecto preliminar, que deve ser ampliada para outras linhagens celulares de câncer oral, assim como, para queratinócitos normais. Além disso, outros ensaios devem ser executados, a saber: a análise de metilação de DNA e a hidroximetilação. Não obstante, os resultados apresentados neste estudo são promissores e relevantes na abordagem terapêutica contra o câncer oral.

7 CONCLUSÃO

A baixa dosagem de 5-aza-CdR promoveu, na linhagem celular SCC-9, o aumento da expressão de genes CTAs, considerados alvos promissores na imunoterapia contra o câncer. Além disso, propiciou o aumento da expressão gênica de *KRT13*, condição esta que sinaliza a redução da tumorigenicidade celular. Enquanto o tratamento com o Ácido Ascórbico foi responsável pelo aumento da expressão do gene *MAGEB2*, exclusivamente. Desta forma, a baixa dosagem de 5-aza-CdR pode apresentar efeitos benéficos nas células de câncer oral através do aumento da expressão de genes responsáveis por estimular a imunogenicidade tumoral. Igualmente, a Vitamina C demonstrou ser um agente com grande potencial para atuar nestas vias. Diante disso, sugere-se que novos estudos sejam realizados para avaliar os efeitos destes agentes desmetilantes inclusive em outras linhagens celulares.

REFERÊNCIAS*

Adami GR, O'Callaghan TN, Kolokythas A, Cabay RJ, Zhou Y, Schwartz JL. A loss of profilin-1 in late-stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2017 Aug;46(7):489-495. doi: 10.1111/jop.12523.

Amar S, Smith L, Fields GB. Matrix metalloproteinase collagenolysis in health and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Nov;1864(11 Pt A):1940-1951. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.04.015.

Ambrosi C, Manzo M, Baubec T. Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *J Mol Biol.* 2017 May 19;429(10):1459-1475. doi: 10.1016/j.jmb.2017.02.008.

Arvinden, VR, Deva Magendhra Rao AK, Rajkumar T, Mani S. Regulation and Functional Significance of 5-Hydroxymethylcytosine in Cancer. *Epigenomes* 2017 Nov, 1;3(19). doi: 10.3390/epigenomes1030019.

Ashaie MA, Chowdhury EH. Cadherins: The Superfamily Critically Involved in Breast Cancer. *Curr Pharm Des.* 2016;22(5):616-38.

Bharadwaj R, Sahu BP, Haloi J, Laloo D, Barooah P, Keppen C, Deka M, Medhi S. Combinatorial therapeutic approach for treatment of oral squamous cell carcinoma. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019 Dec;47(1):572-585. doi: 10.1080/21691401.2019.1573176.

Belaldavar C, Mane DR, Hallikerimath S, Kale AD. Cytokeratins: Its role and expression profile in oral health and disease. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Jan;28(1):77-84.

Beppu S, Ito Y, Fujii K, Saida K, Takino H, Masaki A, et al. Expression of cancer/testis antigens in salivary gland carcinomas with reference to MAGE-A and NY-ESO-1 expression in adenoid cystic carcinoma. *Histopathology.* 2017 Aug;71(2):305-315. doi:

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

10.1111/his.13226.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009 Apr 1;23(7):781-3. doi: 10.1101/gad.1787609.

Bird AP. Functions for DNA methylation in vertebrates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1993;58:281-5.

Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1998 Nov;18(11):6538-47.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6-21.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2018 [acesso 2019 Jan 7]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6384192018&pIdAnexo=10654373

Brasil. CTDatabase. 2005-2019. [acesso 2019 Jan 7]. Disponível em: <http://www.cta.lncc.br/>

Brasil. Instituto Nacional do Câncer. 2018. [acesso 2019 Jan 7]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>

Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): na ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):55-71. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.

Caballero OL, Chen YT. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci.* 2009 Nov;100(11):2014-21. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01303.x.

Camarena V, Wang G. The epigenetic role of vitamin C in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Apr;73(8):1645-58. doi: 10.1007/s00018-016-2145-x.

Cheishvili D, Boureau L, Szyf M. DNA demethylation and invasive cancer: implications for therapeutics. *Br J Pharmacol.* 2015 Jun;172(11):2705-15. doi: 10.1111/bph.12885.

Chen K, Zhang J, Guo Z, Ma Q, Xu Z, Zhou Y, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer. *Cell Res.* 2016 Jan;26(1):103-18. doi: 10.1038/cr.2015.150.

Cheng G, Fan X, Hao M, Wang J, Zhou X, Sun X. Higher levels of TIMP-1 expression are associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer.* 2016 Apr 30;15(1):30. doi: 10.1186/s12943-016-0515-5.

Cieplak P, Strongin AY. Matrix metalloproteinases - From the cleavage data to the prediction tools and beyond. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017 Nov;1864(11 Pt A):1952-1963. doi: 10.1016/j.bbamcr.2017.03.010.

Cimmino L, Neel BG, Aifantis I. Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. *Trends Cell Biol.* 2018 Sep;28(9):698-708. doi: 10.1016/j.tcb.2018.04.001.

Classon M, LaMarco K, De Carvalho DD. Drug-induced activation of "junk" DNA – A path to combat cancer therapy resistance? *Oncoscience.* 2017 Oct 1;4(9-10):115-116. doi: 10.18632/oncoscience.364.

Cuevas-Nunez MC, Gomes CBF, Woo SB, Ramsey MR, Chen XL, Xu S, et al. Biological significance of 5-hydroxymethylcytosine in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Jan;125(1):59-73.e2. doi: 10.1016/j.oooo.2017.06.006.

Daudi S, Eng KH, Mhawech-Fauceglia P, Morrison C, Miliotto A, Beck A, Matsuzaki J, Tsuji T, Groman A, Gnjatic S, Spagnoli G, Lele S, Odunsi K. Expression and immune responses to MAGE antigens predict survival in epithelial ovarian cancer. *PLoS One.* 2014 Aug 7;9(8):e104099. doi: 10.1371/journal.pone.0104099.

Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell.* 2012 Jul 6;150(1):12-27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.

De Smet C, De Backer O, Faraoni I, Lurquin C, Brasseur F, Boon T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jul 9;93(14):7149-53.

Derissen EJ, Beijnen JH, Schellens JH. Concise drug review: azacitidine and decitabine. *Oncologist*. 2013;18(5):619-24. doi: 10.1634/theoncologist.2012-0465.

Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet*. 2018 Sep 1;392(10149):777-786. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31268-6.

Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1826(2):443-57. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.06.003.

Farrukh S, Syed S, Pervez S. Differential Expression of Cytokeratin 13 in Non Neoplastic, Dysplastic and Neoplastic Oral Mucosa in a High Risk Pakistani Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(13):5489-92.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet*. 2006 Jan;7(1):21-33.

Fouse SD, Nagarajan RO, Costello JF. Genome-scale DNA methylation analysis. *Epigenomics*. 2010 Feb;2(1):105-17. doi: 10.2217/epi.09.35.

Gasche JA, Hoffmann J, Boland CR, Goel A. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *Int J Cancer*. 2011 Sep 1;129(5):1053-63. doi: 10.1002/ijc.25764.

Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol*. 2012 Nov; 8(11): 1407–1425. doi: 10.2217/fon.12.138

Gerecke C, Schumacher F, Edlich A, Wetzel A, Yealland G, Neubert LK, et al. Vitamin C promotes decitabine or azacytidine induced DNA hydroxymethylation and subsequent reactivation of the epigenetically silenced tumour suppressor CDKN1A in colon cancer cells. *Oncotarget*. 2018 Aug 28;9(67):32822-32840. doi: 10.18632/oncotarget.25999.

Gjerstorff MF, Andersen MH, Ditzel HJ. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):15772-87.

Gordeeva OF. [Expression of Cancer-Testis Antigens of Magea and Mageb Families in

Mouse Embryonic Fibroblasts Cultured in vitro]. *Ontogenez*. 2015 Jun;46(3):186-97. Russian.

Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G. Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):721-33.

Harris CJ, Scheibe M, Wongpalee SP, Liu W, Cornett EM, Vaughan RM, et al. A DNA methylation reader complex that enhances gene transcription. *Science*. 2018 Dec 7;362(6419):1182-1186. doi: 10.1126/science.aar7854.

Haslehurst AM, Koti M, Dharsee M, Nuin P, Evans K, Geraci J, et al. EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2012 Mar 19;12:91. doi: 10.1186/1471-2407-12-91.

Hassler MR, Klisaroska A, Kollmann K, Steiner I, Bilban M, Schiefer AI, et al. Antineoplastic activity of the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine in anaplastic large cell lymphoma. *Biochimie*. 2012 Nov;94(11):2297-307. doi: 10.1016/j.biochi.2012.05.029.

Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1998 Nov;18(11):6538-47.

Heninger E, Krueger TE, Thiede SM, Sperger JM, Byers BL, Kircher MR, et al. Inducible expression of cancer-testis antigens in human prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Dec 20;7(51):84359-84374. doi: 10.18632/oncotarget.12711.

Hong Q, Jun T, Lei J, Xiling J, Tamamura R. Expression and Clinical Significance of Matrix Metalloproteinase-2 and Its Inhibitor TIMP-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J hard tissue biol*. 2006 Mar;15(2):54-60.

Husquin LT, Rotival M, Fagny M, Quach H, Zidane N, McEwen LM, MacIsaac JL, et al. Exploring the genetic basis of human population differences in DNA methylation and their causal impact on immune gene regulation. *Genome Biol*. 2018 Dec 18;19(1):222. doi: 10.1186/s13059-018-1601-3.

Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the

main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177-183.

Jäwert F, Hasséus B, Kjeller G, Magnusson B, Sand L, Larsson L. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and TET2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2013 Oct;33(10):4325-8.

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene*. 2002 Mar 28;21(14):2245-52.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):683-92.

Jones PA, Ohtani H, Chakravarthy A, De Carvalho DD. Epigenetic therapy in immunology. *Nat Rev Cancer*. 2019 Mar;19(3):151-161. doi: 10.1038/s41568-019-0109-9.

Juneja S, Rathore AS, Sharma K, Shetty D, Jain A. Antioxidant-Oxidant Index as a Biomarker in Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Squamous Cell Carcinoma: A Biochemical Study. *J Clin Diagn Res*. 2017 Mar;11(3):ZC05–ZC08. doi: 10.7860/JCDR/2017/22909.9371.

Karahoca M, Momparler RL. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clin Epigenetics*. 2013 Feb 1;5(1):3. doi: 10.1186/1868-7083-5-3.

Kaur J, Politis C, Jacobs R. Response on: Comments on "Salivary 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, malondialdehyde, vitamin C, and vitamin E in oral pre-cancer and cancer: diagnostic value and free radical mechanism of action". *Clin Oral Investig*. 2016 Mar;20(2):397. doi: 10.1007/s00784-015-1688-9.

Kelly TK, De Carvalho DD, Jones PA. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1069-78. doi: 10.1038/nbt.1678.

Kerkar SP, Wang ZF, Lasota, J, Park T, Patel K, Groh E, et al. MAGE-A is More Highly Expressed Than NY-ESO-1 in a Systematic Immunohistochemical Analysis of 3668 Cases. *J Immunother*. 2016 May 39(4), 181–187. doi: 10.1097/CJI.000000000000119.

Laird PW. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010 Mar;11(3):191-203. doi: 10.1038/nrg2732.

Lao VV, Grady WM. Epigenetics and colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Oct 18;8(12):686-700. doi: 10.1038/nrgastro.2011.173.

Lee HM, Hwang KA, Choi KC. Diverse pathways of epithelial mesenchymal transition related with cancer progression and metastasis and potential effects of endocrine disrupting chemicals on epithelial mesenchymal transition process. *Mol Cell Endocrinol.* 2017 Dec 5;457:103-113. doi: 10.1016/j.mce.2016.12.026.

Lin CW, Chen PN, Chen MK, Yang WE, Tang CH, Yang SF, et al. Kaempferol reduces matrix metalloproteinase-2 expression by down-regulating ERK1/2 and the activator protein-1 signaling pathways in oral cancer cells. *PLoS One.* 2013 Nov 20;8(11):e80883. doi: 10.1371/journal.pone.0080883.

Liu J, Khalil RA. Matrix Metalloproteinase Inhibitors as Investigational and Therapeutic Tools in Unrestrained Tissue Remodeling and Pathological Disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;148:355-420. doi: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.003.

Liu M, Ohtani H, Zhou W, Ørskov AD, Charlet J, Zhang YW, et al. Vitamin C increases viral mimicry induced by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Sep 13;113(37):10238-44. doi: 10.1073/pnas.1612262113.

Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J.* 2011 Jul;38(1):191-208. doi: 10.1183/09031936.00146510.

Loo Yau H, Ettayebi I, De Carvalho DD. The Cancer Epigenome: Exploiting Its Vulnerabilities for Immunotherapy. *Trends Cell Biol.* 2019 Jan;29(1):31-43. doi: 10.1016/j.tcb.2018.07.006.

Luo C, Hajkova P, Ecker JR. Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science.* 2018 Sep 28;361(6409):1336-1340. doi: 10.1126/science.aat6806.

May JM. The SLC23 family of ascorbate transporters: ensuring that you get and keep your daily dose of vitamin C. *Br J Pharmacol*. 2011;164(7):1793–1801. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01350.x.

Mingay M, Chaturvedi A, Bilenky M, Cao Q, Jackson L, Hui T, et al. Vitamin C-induced epigenomic remodelling in IDH1 mutant acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2018 Jan;32(1):11-20. doi: 10.1038/leu.2017.171.

Monti DA, Mitchell E, Bazzan AJ, Littman S, Zabrecky G, Yeo CJ, et al. Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLoS One*. 2012;7(1):e29794. doi: 10.1371/journal.pone.0029794.

Mroueh R, Haapaniemi A, Grénman R, Laranne J, Pukkila M, Almangush A, et al. Improved outcomes with oral tongue squamous cell carcinoma in Finland. *Head Neck*. 2017 Jul;39(7):1306-1312. doi: 10.1002/hed.24744.

Naganuma K, Hatta M, Ikebe T, Yamazaki J. Epigenetic alterations of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2014 Dec 20;14:988. doi: 10.1186/1471-2407-14-988.

Nakamura R, Ishii H, Endo K, Hotta A, Fujii E, Miyazawa K, Saitoh M. Reciprocal expression of Slug and Snail in human oral cancer cells. *PLoS One*. 2018 Jul 3;13(7):e0199442. doi: 10.1371/journal.pone.0199442.

Ngo B, Van Riper JM, Cantley LC, Yun J. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nat Rev Cancer*. 2019 Apr 9. doi: 10.1038/s41568-019-0135-7.

Patel K, Dickson J, Din S, Macleod K, Jodrell D, Ramsahoye B. Targeting of 5-aza-2'-deoxycytidine residues by chromatin-associated DNMT1 induces proteasomal degradation of the free enzyme. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jul;38(13):4313-24. doi: 10.1093/nar/gkq187.

Patra SK, Patra A, Rizzi F, Ghosh TC, Bettuzzi S. Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. *Cancer Metastasis Rev*. 2008 Jun;27(2):315-34. doi: 10.1007/s10555-008-9118-y.

Pattani KM, Soudry E, Glazer CA, Ochs MF, Wang H, Schussel J, et al. MAGEB2 is activated by promoter demethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2012;7(9):e45534. doi: 10.1371/journal.pone.0045534.

Peng CY, Liao YW, Lu MY, Yu CH, Yu CC, Chou MY. Downregulation of miR-1 enhances tumorigenicity and invasiveness in oral squamous cell carcinomas. *J Formos Med Assoc*. 2017 Oct;116(10):782-789. doi: 10.1016/j.jfma.2016.12.003.

Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N, Rao JS. Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene*. 2007 Aug 9;26(36):5229-37.

Putiri EL, Tiedemann RL, Thompson JJ, Liu C, Ho T, Choi JH, Robertson KD. Distinct and overlapping control of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by the TET proteins in human cancer cells. *Genome Biol*. 2014 Jun 23;15(6):R81. doi: 10.1186/gb-2014-15-6-r81.

Ramos MP, Wijetunga NA, McLellan AS, Suzuki M, Grealley JM. DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. *Epigenetics Chromatin*. 2015 Mar 17;8:11. doi: 10.1186/s13072-015-0004-x.

Rasmussen KD, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 2016 Apr 1;30(7):733-50. doi: 10.1101/gad.276568.115.

Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ*. 2006 Jan 31;174(3):341-8.

Roulois D, Loo Yau H, Singhanian R, Wang Y, Danesh A, Shen SY, Han H, Liang G, Jones PA, Pugh TJ, O'Brien C, De Carvalho DD. DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts. *Cell*. 2015 Aug 27;162(5):961-73. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.056.

Ruan M, Zhang Z, Li S, Yan M, Liu S, Yang W, Wang L, Zhang C. Activation of Toll-like receptor-9 promotes cellular migration via up-regulating MMP-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014 Mar 21;9(3):e92748. doi: 10.1371/journal.pone.0092748.

Safadi RA, Abdullah NI, Alaaraj RF, Bader DH, Divakar DD, Hamasha AA, et al. Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2019 Mar;99:1-8. doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.12.007.

Sajadian SO, Tripura C, Samani FS, Ruoss M, Dooley S, Baharvand H, et al. Vitamin C enhances epigenetic modifications induced by 5-azacytidine and cell cycle arrest in the hepatocellular carcinoma cell lines HLE and Huh7. *Clin Epigenetics*. 2016 Apr 30;8:46. doi: 10.1186/s13148-016-0213-6.

Sant DW, Mustafi S, Gustafson CB, Chen J, Slingerland JM, Wang G. Vitamin C promotes apoptosis in breast cancer cells by increasing TRAIL expression. *Sci Rep*. 2018 Mar 28;8(1):5306. doi: 10.1038/s41598-018-23714-7.

Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Feb 19;95(4):327-30.

Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV. SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*. 2008 Apr;34(3):347-55.

Schooten E, Di Maggio A, van Bergen En Henegouwen PMP, Kijanka MM. MAGE-A antigens as targets for cancer immunotherapy. *Cancer Treat Rev*. 2018 Jun;67:54-62. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.04.009.

Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, Langbein L, Lane EB, Magin TM, Maltais L, Omary MB, Parry DA, Rogers MA, Wright MW. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*. 2006 Jul 17;174(2):169-74.

Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):27-36. doi: 10.1093/carcin/bgp220.

Shenoy N, Bhagat T, Nieves E, Stenson M, Lawson J, Choudhary GS, et al. Upregulation of TET activity with ascorbic acid induces epigenetic modulation of lymphoma cells. *Blood Cancer J*. 2017 Jul 21;7(7):e587. doi: 10.1038/bcj.2017.65.

Shenoy N, Creagan E, Witzig T, Levine M. Ascorbic Acid in Cancer Treatment: Let the Phoenix Fly. *Cancer Cell*. 2018 Nov 12;34(5):700-706. doi: 10.1016/j.ccell.2018.07.014.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332.

Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005 Aug;5(8):615-25.

Steele N, Finn P, Brown R, Plumb JA. Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo. *Br J Cancer*. 2009 Mar 10;100(5):758-63. doi: 10.1038/sj.bjc.6604932.

Suíça. World Health Organization – WHO. 2017 [acesso 2019 Jan 7]. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/oralcancer/en/>

Takahashi H, Mizuno H, Yanagisawa A. High-dose intravenous vitamin C improves quality of life in cancer patients. *Personalized Medicine Universe*. 2012 Jul;1(1):49-53.

Takkem A, Barakat C, Zakaraia S, Zaid K, Najmeh J, Ayoub M, Seirawan MY. Ki-67 Prognostic Value in Different Histological Grades of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Nov 29;19(11):3279-3286.

Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol*. 2010. Jan;44(1):71-81. doi: 10.1007/s12033-009-9216-2.

Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci*. 2010 Feb;101(2):300-5. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01434.x.

Wang Y, Hu H, Wang Q, Li Z, Zhu Y, Zhang W, et al. The level and clinical significance of 5-hydroxymethylcytosine in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study in 95 patients. *Pathol Res Pract*. 2017 Aug;213(8):969-974. doi: 10.1016/j.prp.2017.04.016.

Wu H, Wu X, Shen L, Zhang Y. Single-base resolution analysis of active DNA demethylation

using methylase-assisted bisulfite sequencing. *Nat Biotechnol.* 2014 Dec;32(12):1231-40. doi: 10.1038/nbt.3073.

Xia J, Xu H, Zhang X, Allamargot C, Coleman KL, Nessler R, et al. Multiple Myeloma Tumor Cells are Selectively Killed by Pharmacologically-dosed Ascorbic Acid. *EBioMedicine.* 2017 Apr;18:41-49. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.02.011.

Xing X, Zhang B, Li D, Wang T. Comprehensive Whole DNA Methylome Analysis by Integrating MeDIP-seq and MRE-seq. *Methods Mol Biol.* 2018;1708:209-246. doi: 10.1007/978-1-4939-7481-8_12.

Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G. Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer Cell.* 2014 Oct 13;26(4):577-90. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.028.

Yau HL. Characterizing the effects of the DNA methylation inhibitor 5-AZA-CdR during CD8 T cell expansion [abstract]. In: *Proceedings of the Second CRI-CIMT-EATI-AACR International Cancer Immunotherapy Conference: Translating Science into Survival; 2016 Sept 25-28; New York, NY. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Immunol Res* 2016;4(11 Suppl):Abstract nr B053.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jan;5(1):37-50. doi: 10.1038/nrd1930. Review. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Feb;5(2):121.

Young JI, Züchner S, Wang G. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annu Rev Nutr.* 2015;35:545-64. doi: 10.1146/annurev-nutr-071714-034228.

Yu SM, Kim SJ. 5-Azacytidine regulates matrix metalloproteinase-9 expression, and the migration and invasion of human fibrosarcoma HT1080 cells via PI3-kinase and ERK1/2 pathways. *Int J Oncol.* 2016 Sep;49(3):1241-7. doi: 10.3892/ijo.2016.3612.

Zajac P, Schultz-Thater E, Tornillo L, Sadowski C, Trella E, Mengus C, Iezzi G, Spagnoli GC. MAGE-A Antigens and Cancer Immunotherapy. *Front Med (Lausanne).* 2017 Mar 8;4:18. doi: 10.3389/fmed.2017.00018.

Zhang X, Hu M, Lyu X, Li C, Thannickal VJ, Sanders YY. DNA methylation regulated gene expression in organ fibrosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017 Sep;1863(9):2389-2397. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.05.010.

Zhang Y, Yuan Y, Wu H, Xie Z, Wu Y, Song X, Wang J, Shu W, Xu J, Liu B, Wan L, Yan Y, Ding X, Shi X, Pan Y, Li X, Yang J, Zhao X, Wang L. Effect of verbascoside on apoptosis and metastasis in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2018 Aug 15;143(4):980-991. doi: 10.1002/ijc.31378.

Zhao C, Zou H, Zhang J, Wang J, Liu H. An integrated methylation and gene expression microarray analysis reveals significant prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2018 Nov;40(5):2637-2647. doi: 10.3892/or.2018.6702.

Ziller MJ, Gu H, Müller F, Donaghey J, Tsai LT, Kohlbacher O, et al. Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nat.* 2013 Aug 22;500(7463):477-81. doi: 10.1038/nature12433.

ANEXO 1 – RELATÓRIO DE VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

ANÁLISE DE AGENTES DESMETILANTES NA ATIVAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA METILADAS ENDOGENEAMENTE EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÍNGUA

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	1%
2	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	1%
3	repositorio.unifesp.br Fonte da Internet	1%
4	docplayer.com.br Fonte da Internet	<1%
5	Maura M. Fukujima Goto, Vanda M. Gimenes Gonçalves, Abimael Aranha Netto, André Moreno Morcillo et al. "Neurodesenvolvimento de lactentes nascidos a termo pequenos para a idade gestacional no segundo mês de vida", Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 2005 Publicação	<1%
6	abbm.org.br Fonte da Internet	<1%
7	www.locus.ufv.br Fonte da Internet	<1%