

Charlison Rodrigues da Cunha

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA *EHMT*
EM CÂNCER ORAL**

BRASÍLIA

2022

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

Charlison Rodrigues da Cunha

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA *EHMT*
EM CÂNCER ORAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof^a. Dr^a.: Doralina do Amaral Rabello Ramos

Co-orientador: Prof.: Dr. Eliziário Cesar de Vasconcelos Leitão

**BRASÍLIA
2022**

Charlison Rodrigues da Cunha

MESTRE

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 24 de junho de 2022

Profa. Dra.: Doralina do Amaral Rabello Ramos

Prof.: Dra.: Andréa Barretto Motoyama

Prof.: Dra.: Fabiana Pirani Carneiro

Prof.: Dr.: Eliziário Cesar de Vasconcelos Leitão

Prof.: Dr.: João Geraldo Bugarin Junior

" Não é sobre os genes que você tem, mas sobre o que os seus genes estão fazendo!"

(Bruna Mascaro)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me mantido no caminho certo durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final, mesmo diante de várias adversidades.

Sou grato aos meus pais pelo incentivo e sempre acreditarem no meu potencial, pela força para superar as dificuldades que a vida me apresentou.

Agradeço à minha orientadora Doralina do Amaral Rabello Ramos pela confiança depositada na minha proposta de projeto. Obrigado por me manter motivado durante todo o processo, por sempre estar presente para indicar a direção correta e maestria de ensinar como conduzir todo trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador Eliziário Cesar de Vasconcelos Leitão, meu professor desde a graduação, motivador deste Mestrado, grato pelos ensinamentos clínicos que foram possíveis associar com a parte molecular da pesquisa.

Agradeço a todos do laboratório de patologia molecular do câncer da Universidade Brasília – UnB, em especial ao técnico Fábio Willian, pelo ensino das técnicas, pela assistência, por sanar todas as dúvidas de forma sempre pronta.

Grato por todos os colaboradores do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) pela coleta, armazenamento e envio das amostras e dados clínicos para execução da pesquisa.

Agradecer também à Universidade de Brasília – UnB e todo o seu corpo docente, pela excelência da qualidade técnica de cada um, em especial aqueles que edificaram meu conhecimento científico com as matérias afins para consolidação desse projeto.

Aos órgãos que permitiram esse trabalho, Capes, FAPDF e CNPQ.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de cavidade oral é oriundo de desregulação celular causada por alterações genéticas e epigenéticas. Das diversas formas de alteração fenotípica sem mudanças na sequência de DNA, esta pesquisa se dedicou a verificar as modificações pós-traducionais das histonas provocadas pelas enzimas metiltransferases Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1 (*EHMT1* - *GLP*) e Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2 (*EHMT2*- *G9a*) em câncer oral. Em geral, as metiltransferases tem múltiplos papéis moleculares, dentre eles: metilar resíduos de lisina (K) das histonas, permitindo a transcrição gênica (*H3K4me*, *H3K36me*, *H3K79me*) ou levando ao silenciamento gênico, (*H3K9me*, *H3K24me* e *H4K20me*). Além disso, podem metilar proteínas não histonas como a p53, guardião do genoma humano. Essas alterações proteicas afetam a organização da cromatina e conseqüentemente a regulação gênica, estando associadas a processos fisiológicos ou a processos patológicos. A superexpressão de *EHMT1* e *EHMT2* tem sido atribuída a eventos promotores de câncer como: desregulação transcricional, proliferação celular, adaptação metabólica do microambiente tumoral, transição de células epiteliais com aquisição de características mesenquimais. Esses processos são dinâmicos e permitem ganho de características como: motilidade, invasividade, resistência à apoptose e a fármacos. Esta pesquisa objetivou analisar o perfil de expressão gênica das metiltransferases *EHMT1* e *EHMT2* em carcinomas de células escamosas orais por PCR quantitativa. Obtido o perfil de expressão, foram feitas análises com as características clínicas dos pacientes, sendo elas: idade, gênero, estadiamento tumoral, metástases e recidiva. A fim de complementar os achados laboratoriais, foi realizada análise *in silico* para verificar o perfil de expressão gênica de *EHMT1* e *EHMT2* em câncer oral em dados disponíveis na plataforma online OncoMine. Os resultados da qPCR detectaram hipoexpressão de *EHMT1* e *EHMT2* nas amostras tumorais em relação ao grupo controle, com significância estatística para o primeiro gene. Avaliando a expressão gênica de *EHMT1* e *EHMT2* de acordo com as características clínicas e na análise de contingência, utilizando o teste de Fischer, não foi detectada significância estatística, embora na análise descritiva dos dados brutos, observou-se algumas associações esperadas, de acordo com a literatura, resultados estes que necessitam de confirmação. Na análise *in silico* com dados de estudos distintos, foi constatada hipoexpressão de *EHMT2* nas amostras tumorais em relação às amostras normais, assim como também foi encontrada, em outro estudo, hiperexpressão nas amostras tumorais tanto de *EHMT1* como de *EHMT2*. Desta forma, é possível inferir que a expressão de *EHMT1* e *EHMT2* parece variar e depender de contextos celulares, sítios anatômicos e populações estudadas, portanto o significado clínico-patológico dessas enzimas em carcinoma de células escamosas orais ainda não está totalmente esclarecido, sendo necessários estudos complementares.

Palavras Chaves: Epigenética, Câncer Oral, Metiltransferases, Histonas, *EHMT1*, *EHMT2*.

ABSTRACT

Oral cavity squamous cell carcinoma arises from cellular deregulation caused by genetic and epigenetic changes. Among the different forms of phenotypic alteration without changes in the DNA sequence, this research was dedicated to verifying the post-translational modifications of histones caused by the methyltransferase enzymes Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 1 (*EHMT1* - *GLP*) and Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2 (*EHMT2*- *G9a*) in oral cancer. In general, methyltransferases have multiple molecular roles, including methylating lysine (K) residues of histones, allowing gene transcription (H3K4me, H3K36me, H3K79me) or leading to gene silencing (H3K9me, H3K24me and H4K20me). In addition, they can methylate non-histone proteins such as *p53*, guardian of the human genome. These protein alterations affect chromatin organization and, consequently, gene regulation, being associated with physiological or pathological processes. The overexpression of *EHMT1* and *EHMT2* has been associated to cancer-promoting events such as: transcriptional dysregulation, cell proliferation, metabolic adaptation of the tumor microenvironment, transition of epithelial cells with acquisition of mesenchymal characteristics. These processes are dynamic, allowing the gain of characteristics such as: motility, invasiveness, apoptosis and drug resistance. This research aimed to analyze the gene expression profile of methyltransferases *EHMT1* and *EHMT2* in oral squamous cell carcinomas by quantitative PCR. Besides the expression profile, analyses with the clinical characteristics of patients, namely: age, gender, tumor staging, metastases and recurrence were performed. To complement the experimental findings, *in silico* analysis was performed to verify gene expression profile of *EHMT1* and *EHMT2* in oral cancer in data available at the OncoMine online platform. The qPCR results detected *EHMT1* and *EHMT2* down expression in tumor samples compared to the control group, with statistical significance for the first gene. Evaluating *EHMT1* and *EHMT2* gene expression according to clinical characteristics and with contingency analysis, using Fischer's test, no statistical significance was found, although the descriptive analysis of the data revealed some expected associations, according to the literature, which still need confirmation. In the *in silico* analysis with data from different studies, it was found down expression of *EHMT2* in tumor samples compared to normal samples, as well as overexpression in tumor samples of both *EHMT1* and *EHMT2*. Therefore, it is possible to infer that the expression of *EHMT1* and *EHMT2* seems to vary and depend on cellular contexts, anatomical sites and populations studied, so the clinicopathological significance of these enzymes in oral squamous cell carcinoma is still not fully understood and further studies are necessary.

Keywords: Epigenetics, Oral Cancer, Methyltransferases, Histones, *EHMT1*, *EHMT2*

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Expressão de <i>EHMT1</i> e <i>EHMT2</i> em amostras N e T de CCE oral -----	28
Gráfico 2. Expressão de <i>EHMT1</i> e <i>EHMT2</i> em CCE oral. (N= 22, T= 57) -----	31
Gráfico 3. Expressão de <i>EHMT1</i> e <i>EHMT2</i> em CCE oral. (N= 4, T= 16) -----	31

LISTA DE ILUSTRAÇÕES – FIGURAS

Figura 1. Número de casos novos - câncer de cavidade oral -----	13
Figura 2. Frequência do câncer oral em relação a outros cânceres -----	14
Figura 3. CCE Oral -----	15
Figura 4. CCE Oral – Características Clínicas -----	16
Figura 5. CCE Oral – Histopatológico -----	16
Figura 6. Conformação e regulação da cromatina -----	20
Figura 7. Modificações pós-traducionais de histonas -----	20
Figura 8. Modelo de compactação da cromatina -----	21
Figura 9. Modificações epigenéticas levam à alteração estrutural da cromatina-----	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de risco para carcinoma de células escamosas oral -----	15
Tabela 2. Classificação da gradação tumoral definida pela OMS -----	17
Tabela 3. Sistema de estadiamento (TNM) para câncer oral -----	17
Tabela 4. Categorias de Estadiamento Clínico TNM para CCE oral -----	18
Tabela 5. Características clínicas dos pacientes do HCFMRP -----	29
Tabela 6. Análise de contingência dos dados clínicos -----	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE – Carcinoma de Células Escamosas
cDNA – DNA Complementar
Cq – Quantificação do ciclo
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Fosfato de desoxirribonucleotídeos
EHMT – Histona-lisina N-metiltransferase eucromática
H3K27 – Lisina 27 da histona 3
H3K36 – Lisina 36 da histona 3
H3K4 – Lisina 4 da histona 3
H3K79 – Lisina 79 da histona 3
H3K9 – Lisina 9 da histona 3
H4K20 – Lisina 20 da histona 4
H4K20me3 – Trimetilação da lisina 20 da histona 4
HMTs – Metiltransferase de histona
HUB – Hospital Universitário de Brasília
INCA – Instituto do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
KMTs – Metiltransferase de lisina
Kme1 – Monometilação de lisina
Kme2 – Dimetilação de lisina
Kme3 – Trimetilação de lisina
Me – Metilação
mRNA – RNA mensageiro
µL – Microlitro
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA – Ácido ribonucleico
SAM – S-adenosil metionina
SET – suppressor-enhancer of zeste trithorax

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 O câncer Oral	13
1.2 Epigenética e Alterações Pós-Traducionais em Histonas	19
1.3 As Metiltransferases Proteicas e a Família EHMT	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. SUJEITOS E MÉTODOS	26
4.1 SUJEITOS	26
4.2 MÉTODOS	26
4.2.1 Extração de RNAm e síntese de cDNA	26
4.2.2 PCR quantitativa qPCR	26
4.2.3 Análise estatística	26
4.2.4 Pesquisa <i>In Silico</i>	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Expressão dos genes <i>EHMT1</i> e <i>EHMT2</i>	28
5.2 Dados clínicos dos 42 pacientes com câncer oral	28
5.3 Associação de Dados clínicos com a expressão gênica	30
5.4 Análise de Contigência	30
5.5 Análise <i>in silico</i>	31
6. DISCUSSÃO	32
7. CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER ORAL

A regulação da divisão e da diferenciação celular é realizada por um mecanismo complexo que mantém a população celular dentro dos limites fisiológicos. Mudanças nesta regulação promovem distúrbios de crescimento, de diferenciação ou de ambos, podendo culminar em um câncer, caracterizado como uma doença heterogênea, com crescimento rápido, autônomo e desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos distantes.(1)(2)

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se para cada ano do triênio 2020-2022, no Brasil, 15.210 novos casos de câncer da cavidade oral, sendo 11.200 em homens e 4.010 em mulheres, com 6.605 óbitos. Na figura 1 é possível verificar essa distribuição do número de casos novos de câncer oral para o ano de 2020 pelos 26 estados brasileiros e o Distrito Federal.(2)

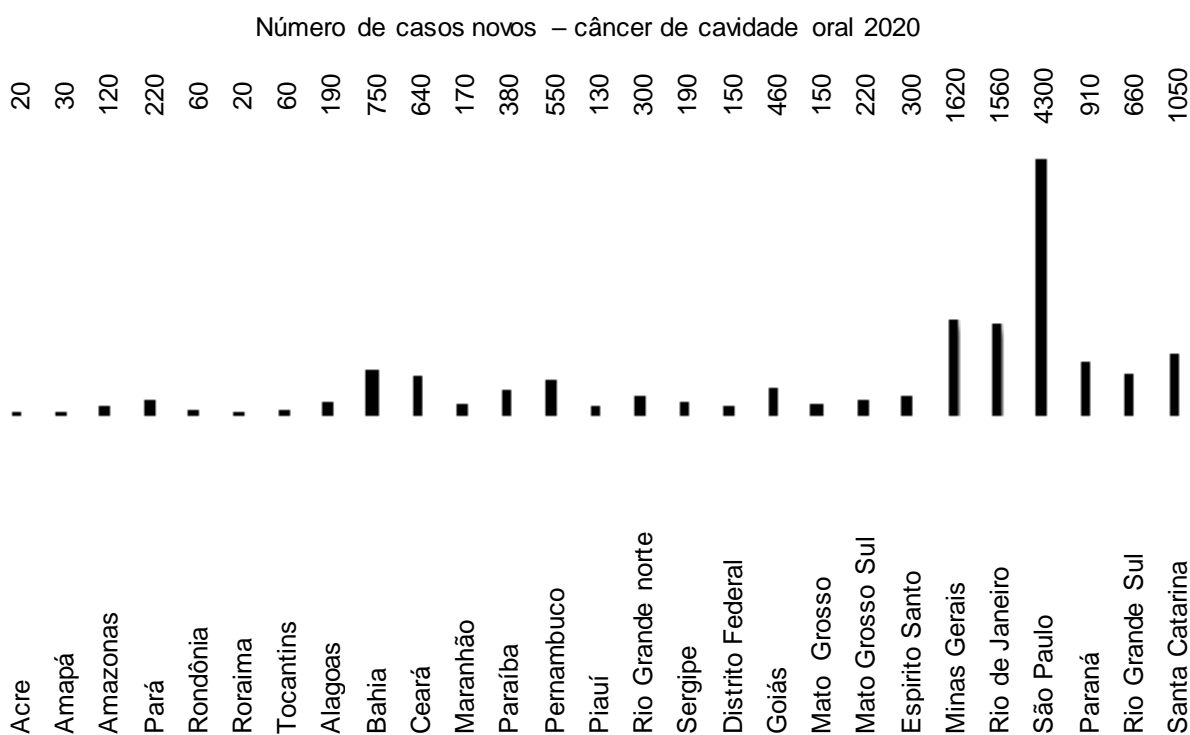



Figura 1.[Adaptado] Número de casos novos de câncer de cavidade oral nos 26 estados brasileiros mais o Distrito Federal para ano de 2020.(2)

A alta taxa de incidência e mortalidade de câncer oral no país está relacionada a vulnerabilidade socioeconômica, ausência de acesso aos serviços de saúde pública, além de hábitos deletérios por parte dos acometidos. O perfil epidemiológico brasileiro indica uma alta incidência e prevalência de câncer em região de cabeça e pescoço, com diminuição de sobrevida e taxa de mortalidade de 20 por 100 mil habitantes, de acordo com registro de óbitos dos pacientes no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), sendo estes elementos norteadores de medidas de controle para a vigilância epidemiológica.(2)

O risco médio nacional estimado de novos casos a cada 100 mil habitantes é de 10,7 para homens e 3,71 para mulheres. Na figura 2, de acordo com o INCA, sem considerar os tumores de pele não melanoma, observa-se a frequência do câncer oral em relação a outros cânceres e sua estimativa para cada 100 mil habitantes, por regiões e por gênero. (2)

Homens				Mulheres		
Estado	Estimativa *	Frequência*		Estado	Estimativa *	Frequência*
Sudeste	13,58	5 ⁰	Sudeste	4,12	13 ⁰	
C. Oeste	8,94	5 ⁰	C. Oeste	2,90	13 ⁰	
Nordeste	7,65	5 ⁰	Nordeste	3,75	11 ⁰	
Sul	13,32	6 ⁰	Sul	4,08	14 ⁰	
Norte	3,98	6 ⁰	Norte	1,69	12 ⁰	

*Estimativa para cada 100.000 habitantes.

** Frequência em relação a outros tipos de cânceres.

Figura 2. Frequência do câncer oral em relação a outros cânceres (sem considerar os tumores de pele não melanoma) e estimativa do número de casos de câncer de cavidade oral para cada 100 mil habitantes por regiões e gênero, para o ano de 2020. [ADAPTADO de Brasil, Ministério da Saúde. Tipos de câncer [Internet]. Estimativa de Câncer no Brasil. 2021 [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>] (2)

De acordo com os dados do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020, dados estatísticos apontam para o surgimento de 377.713 novos casos de câncer oral em todo o mundo, com 177.757 óbitos, sendo que nos últimos 10 anos, a incidência desse tipo de tumor ampliou em cerca de 50%. (3)

Na cavidade oral, foram classificados 45 tipos de tumores, e de todos os grupos das neoplasias malignas orais, o carcinoma de células escamosas (CCE), também conhecido como carcinoma epidermóide, escamocelular ou espinocelular, representa aproximadamente 94% dessas malignidades. (1)(2)

Quanto aos fatores de risco que levam ao processo de oncogênese, o etilismo, o tabagismo, a exposição ao vírus papiloma humano, a desnutrição e a imunossupressão estão relacionados aos cânceres orais. (1)(2)(4)

Desta forma, vários estudos mostram que a maioria das neoplasias malignas orais está relacionada a fatores ambientais, que de forma cumulativa provocam alterações irreversíveis nas células. Esses fatores podem ser físicos, químicos, biológicos, nutricionais, socioeconômicos e sociodemográficos, tabela 1. (1)(5)(6)(7)

Tabela 1. Fatores de risco para carcinoma de células escamosas oral.(1)(5)(6)(7)

Físicos	1. Radiação (Ultravioleta, Raio X)
	2. Trauma crônico (Protético)
Químicos	1. Tabagismo
	2. Etilismo
	3. Agentes fenólicos
Biológicos	1. Vírus HPV-16 e HPV-18 (70% dos casos)
	2. Vírus Epstein-Barr (herpesvírus humano 4)
	3. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)
Nutricionais	1. Deficiência de ferro
	2. Deficiência de vitamina A
	3. Hábitos alimentares
	4. Obesidade
Sóciodemográficos	1. Idade avançada
	2. Sexo masculino
	3. Acesso aos serviços de saúde

O sistema estomatognático possui uma complexa anatomia funcional e, dentre todas as suas estruturas, achados clínicos mostram que o carcinoma de células escamosas pode acometer qualquer sítio da cavidade oral e, de acordo com a sua localização, o comportamento clínico pode variar. Há uma predominância de tumores em língua e assoalho bucal (figura 3), apresentando-se como uma lesão ulcerativa infiltrada, com predileção por homens acima dos 40 anos de idade.(1)(6)

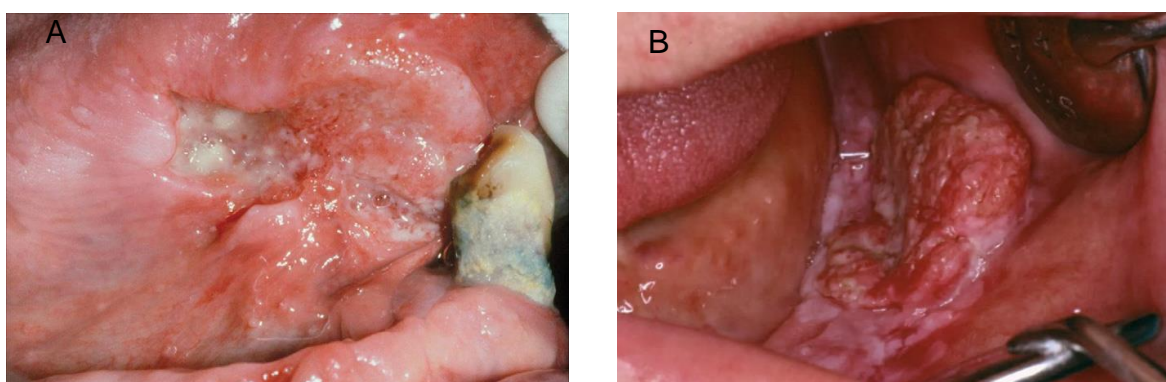


Figura 3. CCE oral **(A)** Lesão cronicamente ulcerada na superfície ventral direita da língua. **(B)** CCE oral, aumento de volume exofítico ulcerado em assoalho bucal.(1)

As lesões tumorais têm aspectos clínicos variáveis, apresentando-se ora como uma lesão exofítica com superfície ulcerada, papilar ou verruciforme, com aumento de volume nodular, ora como endofítica com maior padrão de invasão de tecidos adjacentes, inclusive tecidos

perineurais, que ao serem atingidos podem levar a sintomatologia dolorosa. A invasão do CCE oral para tecidos ósseos evolui com destruição do arcabouço tecidual, evidenciada por achados radiográficos com imagens radiolúcidas e limites imprecisos, definidas como “roído de traça”.(1)

Quanto a sua coloração, a lesão pode apresentar-se esbranquiçada (leucoplásica), avermelhada (eritoplásica) ou a combinação de ambas, eritroleucoplásica, a depender do grau de ceratinização e vascularização da região afetada. Além disso, podem ser observadas lesões ulceradas, hemorrágicas ou necrosadas e as com infecção sobreposta, que dão colorações diferentes – figura 4.(1)(5)(6)(9)

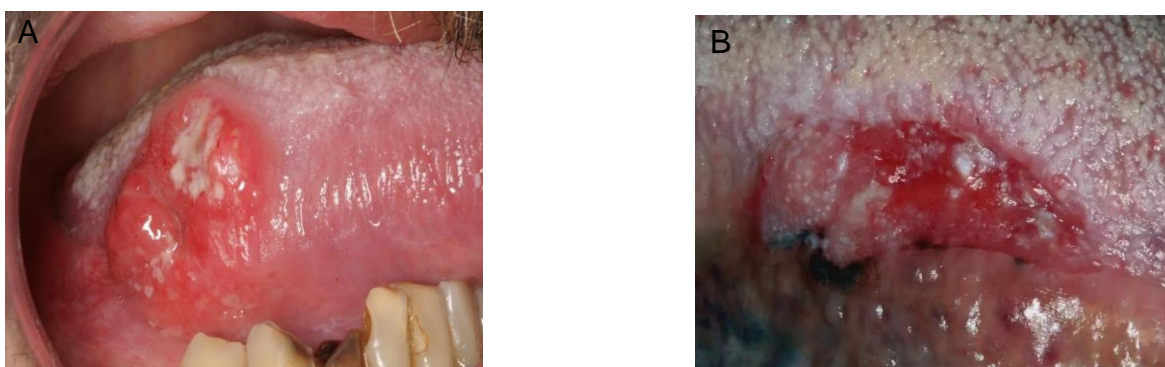


Figura 4. A: CCE em língua, lesão com necrose , B: CCE em língua, lesão eritoplásica.(9)

Em relação ao aspecto histopatológico, pode-se observar invasão e extensão irregular do epitélio tumoral para além da membrana basal, para o estroma. Podem ser encontradas células tumorais individuais, em cordões ou ilhas, com pleomorfismo celular e nuclear, citoplasma eosinofílico e hiper cromatismo nuclear, tornando-se entidades independentes no interior do tecido, sem adesão ao epitélio da superfície (figura 5).(1)(9)(10)

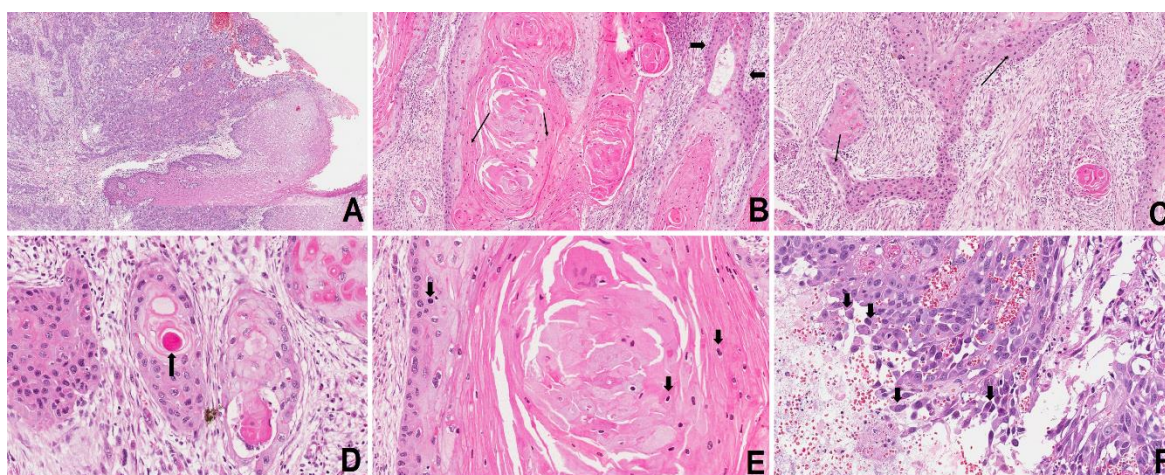


Figura 5. CCE – Histopatológico A: Células tumorais invadindo o estroma. B: Células epiteliais malignas com formação de ilhas, além de disqueratose. C: Células epiteliais malignas em formação de cordões. D: Células epiteliais malignas com pérolas de ceratina. E: Múltiplas mitoses e núcleos hiper cromáticos. F: Núcleos aumentados. (10)

Quanto a gradação histológica, os tumores pouco diferenciados têm pior prognóstico, são mais agressivos e são menos sensíveis à radioterapia do que tumores de grau moderadamente ou bem diferenciados. Pelo estudo histopatológico, a Organização Mundial da Saúde - OMS classifica os CCE em 03 categorias, conforme mostra tabela 2.(11)(12)(13)(14)

Tabela 2. Classificação da gradação tumoral.(11)(13)(14)

Gradação Histológica – OMS	
Parâmetros	Características
Pouco diferenciado	1. Predomínio de células imaturas, Mínima ceratinização 2. Numerosas mitoses típicas e atípicas
Moderadamente diferenciado	1. Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica 2. Pouca ceratinização
Bem diferenciado	1. Arquitetura tecidual semelhante ao padrão epitelial normal

As lesões tumorais malignas também são avaliadas de acordo com seu estadiamento, sendo feito pelo sistema TNM, conforme tabela 3.(1)(12)

Tabela 3. Sistema de estadiamento Tumor – Linfonodos – Metástase (TNM) para câncer oral.(12)

Tamanho e máxima penetração tumoral (T)	
T1	Tumor ≤ 2 cm com PI (profundidade da invasão, não espessura do tumor) ≤ 5 mm
T2	Tumor ≤ 2 cm com PI > 5 mm OU tumor > 2 cm e ≤ 4 cm com PI ≤ 10 mm
T3	Tumor > 2 cm e ≤ 4 cm com PI > 10 mm OU tumor > 4 cm com PI ≤ 10 mm
T4a	Doença local moderadamente avançada Cavidade oral: tumor > 4 cm com PI > 10 mm OU tumor que invade apenas estruturas adjacentes (p. ex., ao longo do osso cortical da mandíbula ou maxila, ou que envolve o seio maxilar ou a pele da face).
T4b	Doença local muito avançada. O tumor invade o espaço mastigatório, placas pterigoides ou a base do crânio e/ou envolve a artéria carótida interna.
Linfonodo regional (N)	
N1	Metástases em um único linfonodo ipsilateral, ≤ 3 cm e sem extensão extranodal.
N2	Metástases em um único linfonodo ipsilateral > 3 cm, mas ≤ 6 cm e sem extensão extranodal; OU em múltiplos nódulos ipsilaterais ≤ 6 cm e sem extensão extranodal; OU em linfonodos bilaterais ou contralaterais ≤ 6 cm e sem extensão extranodal.
N3	Metástase em 1 linfonodo > 6 cm e sem extensão extranodal.
Metástase à distância (M)	
M0	Nenhuma metástase à distância
M1	Metástase à distância

Quando há disseminação de tecido tumoral pelo sistema linfático ou circulatório locorregional de cabeça e pescoço para tecidos adjacentes, há risco maior de metástase para

outros órgãos, e pela evolução da história natural da doença, menores taxas de sobrevida.(1)(13)(14)(15)

Após tratamento inicial e a remissão tumoral, as recidivas são um indicativo de falha, que ocorre devido às células cancerígenas sobreviverem ao tratamento, não sendo destruídas. Cerca de 90% das recidivas ocorrem no primeiro ano de acompanhamento dos pacientes com CCE oral, e nos casos de tumores primários em fase III e IV, a ocorrência de tumores secundários chega a 45%. (14)(15)

Nas fases iniciais da doença, o CCE oral apresenta-se assintomático, e por isso, é comum o diagnóstico ser dado em estágios avançados, o que interfere na evolução da doença. Os prognósticos mais favoráveis ocorrem quando o diagnóstico é feito em estágios iniciais, possibilitando tratamentos menos agressivos, menores comorbidades, sequelas, recidivas e óbitos. A tabela 4 mostra a classificação dos estágios segundo o sistema TNM e o percentual de sobrevida relativa a 5 anos, para câncer de cavidade oral e lábio. A sobrevida é maior que 50% nos estágios iniciais quando comparada com os estágios avançados.(1)(14)(15)

Tabela 4. Categorias de Estadiamento Clínico TNM para CCE oral.(1)

Estágio	Classificação TNM	Taxa de sobrevida de 5 anos	
		Cavidade oral	Lábio
I	T1, N0, M0	68%	83%
II	T2, N0, M0	53%	73%
III	T3, N0, M0 ou T1, T2 ou T3, N1, M0	41%	62%
IV			
IVA	T4a N0 ou N1, M0 ou T1, T2, T3 ou T4a, N2, M0	27%	47%
IVB	Qualquer T, N3, M0 ou T4b, Qualquer N, M0		
IVC	Qualquer lesão M1		

Como já mencionado, além do estadiamento tumoral, o grau histológico e a expressão dos biomarcadores disponíveis atualmente, como o p53, p16 e Ki-67, são alguns dos fatores utilizados para prever o comportamento tumoral e orientar quanto as melhores diretrizes de tratamento. Contudo há certas limitações no uso destes biomarcadores disponíveis, pois são marcadores genéricos para o câncer, não possibilitando necessariamente uma detecção precoce da doença ou uma predição mais acurada de prognóstico ou resposta à terapia. Portanto, o câncer oral ainda necessita de marcadores diagnósticos e prognósticos que sejam úteis no manejo clínico dos pacientes, possibilitando melhores decisões clínicas, o que levará a uma melhor qualidade de vida destes indivíduos.(16)

1.2 Epigenética e Alterações Pós-Traducionais em Histonas

O câncer oral é caracterizado como uma doença complexa e multifatorial que apresenta diversas alterações genéticas, como mutações em proto-oncogenes, responsáveis pelo crescimento celular, e em genes supressores de tumor, cuja função é controlar a divisão celular (17). Também podem ocorrer deleções, como por exemplo, na região do cromossomo 8p ou 1p36 em carcinomas de células escamosas orais ou na região 9p21 e 3p14 em lesões pré-malignas. (18)(19)

Além do processo genético, a epigenética é um outro mecanismo complexo capaz de desencadear distúrbios e contribuir com a carcinogênese. Esse processo age independente de modificações na sequência primária de DNA, mas ocorre por modificação estrutural da dupla fita, alterando as fases de transcrição, tradução ou pós-tradução, e seu produto. (20)(21)

As modificações epigenéticas podem ser adquiridas entre a interação celular e meio ambiente. Processos químicos, físicos, biológicos, nutricionais e sócio-demográficos podem desencadear pequenas alterações químicas no DNA ou em proteínas que o envolva, culminando nas alterações epigenéticas que podem ser perpetuadas pela herança transgeracional nos processos de divisão celular. Normalmente os mecanismos epigenéticos são reversíveis, devido a necessidade do controle dos processos moleculares, contudo em algumas circunstâncias, padrões de desregulação são registrados, podendo provocar alterações estruturais na organização do DNA, favorecendo a expressão ou supressão de genes essenciais nos processos patológicos. (20)(21)(22)

As modificações epigenéticas podem ser classificadas em quatro grupos, como mostra a figura 6: (1) alterações covalentes pós-traducionais das histonas, (observe figura 7, com possíveis modificações incluindo metilação, e as alterações nos resíduos de aminoácidos que estão localizados em posições específicas nas caudas das histonas); (2) mecanismos não-covalentes; (3) por ação de RNA não-codantes (agem inibindo ou ativando a expressão gênica); e por fim as modificações epigenéticas mais estudadas no câncer oral, (4) metilação do DNA, que ocorre nos promotores de genes como o *p16*, *MGMT*, *CDH1*, *E-cad*, *DAPK*, *APC*, *WRN*, *EpCAM*, *SFRP*, *WIF-1* e *DKK-3*, e que geralmente, nesses casos, apresenta-se de forma aberrante. (21)(22)(23)(24)(25)

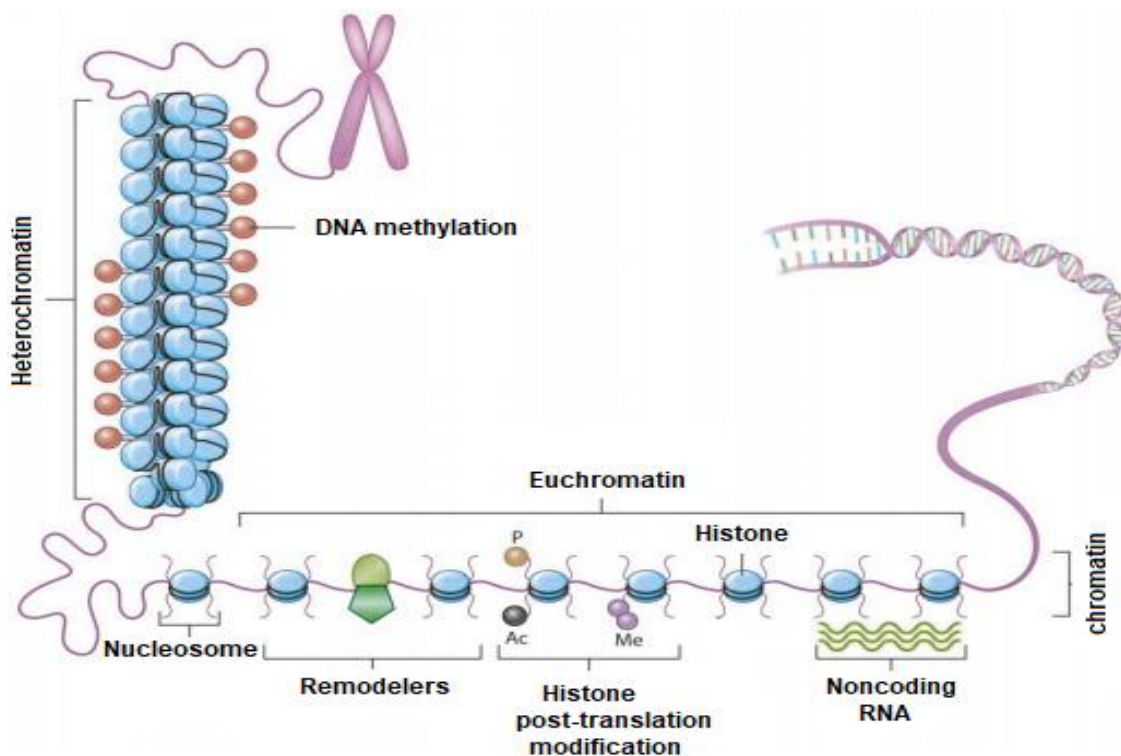


Figura 6. Conformação e regulação da cromatina. Padrões estruturais do material genético que podem ser alterados por modificações em regiões reguladoras, resultando em ativação transcricional ou silenciamento de genes. As modificações podem ocorrer em: **caudas de histonas** (linhas roxas), **nucleossomos** (ovais azuis), **metilação de DNA** (pirulitos vermelhos), **RNAs não codificadores** (ondas verdes). (24)

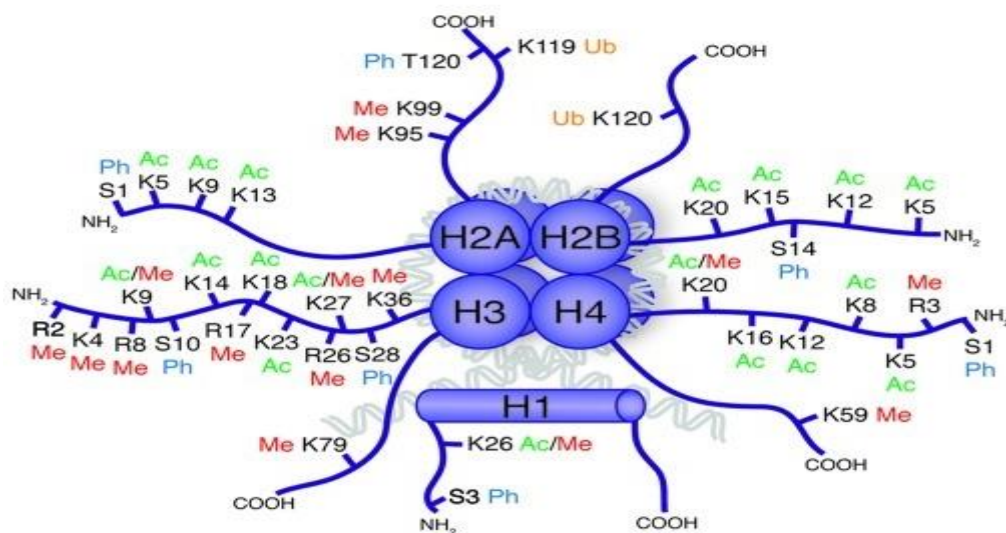


Figura 7. Modificações pós-traducionais de histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4)(25)

Vista a diversidade de possibilidades de alterações epigenéticas, a fim de delinear esta pesquisa, serão descritas com maior ênfase as alterações pós-traducionais das histonas pelo processo de metilação em resíduos de aminoácidos lisina, promovidas pelas enzimas metiltransferases *EHMT1* e *EHMT2*.

A extensa fita dupla de DNA, a fim de uma organização estrutural é enovelada em “carreteis” denominados histonas - figura 8, um processo dinâmico que varia com o microambiente celular e vias de sinalização ativadas. Assim, de acordo com o regime de compactação do material genético, poderão ocorrer dois processos distintos: transcrição (região de eucromatina), ou não transcrição, pela inviabilidade de leitura (região de heterocromatina). A manutenção do genoma depende desta regulação, feita por diversas enzimas e complexos proteicos, sendo que a instabilidade genômica está ligada à iniciação e progressão tumoral. Como exemplo, a metiltransferase de histona *EHMT2*, frequentemente superexpressa em tumores sólidos, está associada a formação de heterocromatina, sendo responsável pelo silenciamento de genes responsáveis pela supressão tumoral, como o TP53, guardião do genoma humano, que regula o ciclo de células alteradas para que haja reparo de danos ou apoptose, quando o reparo não é possível.(26)(27)(28)(29)(30)(31)(32)

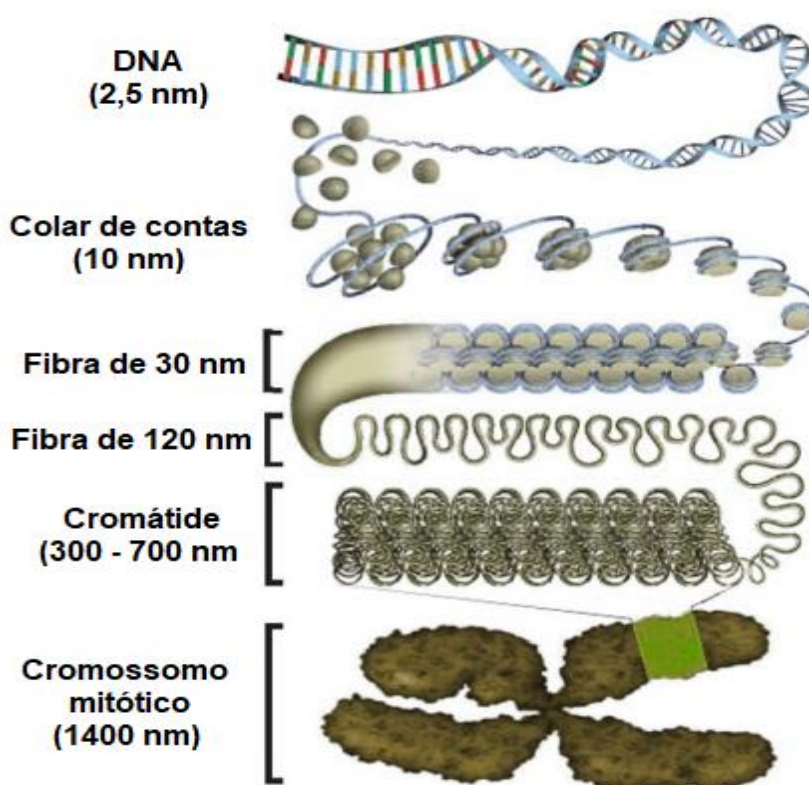


Figura 8. Modelo de compactação da cromatina. DNA hierarquicamente organizado no interior do núcleo de células eucarióticas.(29)

Após sua organização, a cromatina disposta na forma de cromossomo, tem grande parte de sua composição feita pelas proteínas histonas, que são compostas por aminoácidos de carga positiva. Dentre eles há os aminoácidos lisinas que podem ser monometilados, dimetilados ou trimetilados, e os aminoácidos argininas que podem ser monometilados ou dimetilados. A metilação da cauda das histonas pode ser feita em 24 sítios distintos, pelo acréscimo do grupo metil (CH₃) nos (aa) de lisina e arginina - figura 9.(31)(32)(33)(34)

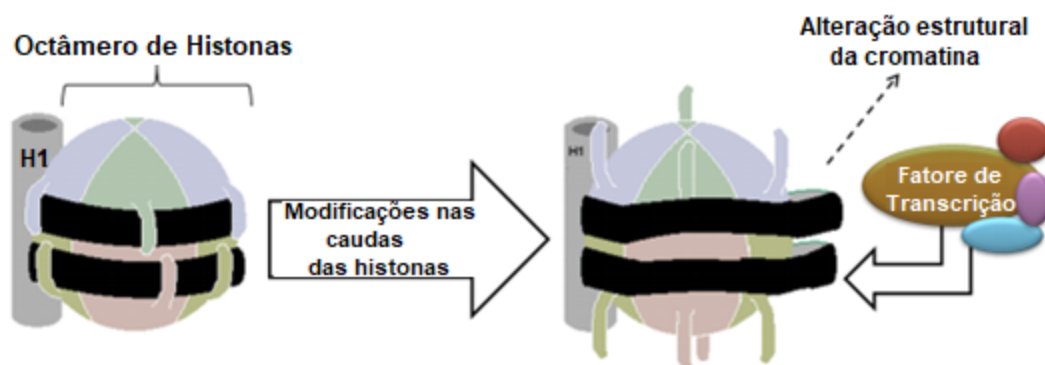


Figura 9. Modificações epigenéticas levam à alteração estrutural da cromatina. Adaptado de Genética: um enfoque conceitual.(33)

Estudos mostram que a desregulação de metiltransferases de histonas são frequentes no câncer, mostrando um potencial regulatório que afeta a estrutura da cromatina, que tem, portanto, padrões de metilação associados à normalidade e à oncogênese. (30)(32)

1.3 As Metiltransferases Proteicas e a Família EHMT

As proteínas histonas metiltransferases (HMT) catalisam a metilação reversível de 1, 2 ou 3 grupos metil (CH₃) reativos, que estão ligados a um átomo de enxofre, pertencente a molécula S-adenosil metionina (SAM) - C₁₅H₂₃N₆O₅S⁺ - (adenosina trifosfato - ATP + metionina), para resíduos de lisina ou arginina no lado nucleofílico da cadeia de proteínas, especificamente nas histonas H3 e H4. As histonas metiltransferases possuem três grandes famílias: duas delas metilam resíduos de lisina, uma com domínio SET (suppressor-enhancer of zeste trithorax), e a outra de proteínas DOT1-like. A terceira família de metiltransferases é responsável pela metilação de argininas, a PRMT (Arginine NMethyltransferase). (34)(35)

As metilações das histonas estão associadas com o silenciamento transcricional ou ativação de genes e mostram-se bastante importantes na formação de áreas de heterocromatina, regiões compactadas e inertes à transcrição, que podem ser constitutivas, como são os centrômeros e telômeros. As metilações de lisina nas histonas levam a diferentes estados de expressão gênica. A di- e trimetilação das lisinas H3K9, H3K24 e H4K20 levam ao silenciamento gênico enquanto a metilação das lisinas H3K4, H3K36 ou H3K79 levam à transcrição gênica. (31)(32)(34)

As enzimas EHMT são da família de metiltransferases que metilam resíduos de lisina e possuem domínio SET. *EHMT1* também denominada *GLP*, tem papel principal de catalisar a mono e a dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me1 e H3K9me2). Em algumas neoplasias malignas, incluindo CCE de cabeça e pescoço e esôfago, o aumento da expressão de *EHMT1*, parece levar ao silenciamento de supressores tumorais, gerando invasão tecidual e metástase, e uma menor taxa de sobrevida, por isto, *EHMT1* parece funcionar como preditora de prognóstico de

tumores malignos. *EHMT2* também denominada *G9a*, tem papel principal de catalisar a mono e dimetilação da lisina 9 da histona 3 (H3K9me1 e H3K9me2). Aumento da expressão da enzima *EHMT2* foi encontrado em vários cânceres e está envolvido com a proliferação e metástase de células cancerosas. Aumento da expressão de *EHMT2* também leva a alterações em diversas funções celulares no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, como a proliferação celular, e também está correlacionado a uma baixa resposta terapêutica a quimioterápicos. (36)(37)(38)(39)(40)(41)

No estudo de Ren A. et al, a inibição de *EHMT2* levou a indução de apoptose e autofagia em duas linhagens de células (Tca8113 e KB) de carcinoma espinocelular oral, concluindo que *EHMT2* pode ser um potencial alvo epigenético para o tratamento do câncer oral. Contudo, este estudo foi realizado em duas linhagens celulares específicas, do banco de células de Shanghai, Chinese Academy of Science, necessitando de outros estudos em outros grupos populacionais que verifiquem padrões de expressão e comportamentos dessas enzimas no câncer oral. (40)

O estudo de Saha mostra que *EHMT1* e *EHMT2*, como metiltransferases de H3K9, foram identificadas com múltiplas alterações, com muitas atividades pró-tumorigênicas, mas algumas onco-supressoras, mostrando a importância de se entender melhor o efeito do nível de metilação na lisina 9 da histona 3 na doença, além da necessidade de se entender melhor o efeito a curto e longo prazo de sua inibição. (36) Uma nota importante é que poucos são os estudos que fazem referências específicas das enzimas metiltransferases *EHMT1* e *EHMT2* nos tecidos da cavidade oral e no câncer oral, enzimas estas que parecem estar associadas a funções oncogênicas importantes, como instabilidade cromossômica e crescimento tumoral, mas que também parecem demonstrar papel antitumoral em alguns cânceres. Por isto, neste estudo buscaremos identificar o perfil de expressão de *EHMT1* e *EHMT2* no câncer oral.

2. JUSTIFICATIVA

O carcinoma de células escamosas de cavidade oral é uma doença que apresenta impacto epidemiológico mundial, com altas taxas de mortalidade e sequelas que geram grandes morbidades, principalmente quando o diagnóstico é tardio, devido em parte, à ausência do conhecimento de alvos terapêuticos e marcadores moleculares que possibilitariam uma medicina de precisão, facilitando e melhorando o diagnóstico e o tratamento.

O CCE possui etiologia multifatorial e os exatos mecanismos que levam a estas alterações não estão totalmente esclarecidos. No âmbito molecular, estudos apontam desregulações epigenéticas pós-traducionais das histonas, associadas a funções oncogênicas, em diversos tipos de câncer, um achado importante que poderá contribuir para elucidar a patogênese, evolução e prognóstico do câncer oral.

Até o presente momento, apesar dos achados sobre as enzimas *EHMT1* e *EHMT2* em outros cânceres, no câncer oral há uma extensa lacuna, ainda pouco explorada, sobre as funções destas metiltransferases de proteína.

A relevância desta pesquisa centra-se na ampliação do conhecimento sobre os padrões de expressão dos genes *EHMT1* e *EHMT2* no câncer oral, visando a aplicabilidade futura na prática clínica, como marcador prognóstico ou de resposta terapêutica, levando a uma melhor qualidade de vida destes pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de expressão gênica das metiltransferases *EHMT1* e *EHMT2* em carcinomas de células escamosas orais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estabelecer o perfil de expressão dos genes *EHMT1* e *EHMT2*, em amostras cirúrgicas de pacientes com câncer oral e em margens de tecido normal, que podem ter comportamento de expressão semelhante ou não aos achados de outros estudos em tecidos normais e tumorais de diversos sítios.

Relacionar o perfil de expressão gênica de *EHMT1* e *EHMT2* com as características dos pacientes, tais como: idade, gênero, sítio da lesão, estadiamento, tratamento, presença de metástases e recidiva.

Estabelecer por análise *in silico* o perfil de expressão gênica de *EHMT1* e *EHMT2* em câncer oral, em dados disponíveis nas plataformas de acesso aberto Oncomine.

4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB (número de registro 24/12).

Em uma colaboração com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), foram obtidas 42 amostras clínicas de tumor e margens, com aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local sob o número de registro 9371/2003.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Das 40 amostras normais e 42 tumorais coletadas, foi extraído o RNA total para análise de expressão dos 02 genes codificadores de metiltransferases de lisina da família *EHMT*. Foi utilizado o kit Allprep DNA-RNA (Qiagen), para extração do RNA total das amostras. Para análise quantitativa com PCR em tempo real (Real Time qPCR) das amostras, o RNA total foi convertido em cDNA usando-se o kit Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo protocolos pré-estabelecidos pelo fabricante.

4.2.2 PCR quantitativa (qPCR)

Cada reação total foi feita em duplicata e em placas de 96 poços, utilizando: Água ultrapura (2,5µL), MasterMix - Universal Taqman® (Thermo Fisher) (5µL), ensaio inventariado com iniciador e sonda Taqman® para cada gene (*EHMT1*: Hs00226978_m1; *EHMT2*: Hs00198710_m1; *β-actina*: Hs99999903_m1, Thermo Fisher) (0,5µL), cDNA da amostra (2µL), totalizando volume final de 10µL.

Para a reação de qPCR, os ciclos do termociclador StepOnePlus™ foram: desnaturação inicial a 95°C – 10 minutos; seguido de 40 ciclos de: desnaturação a 95°C – 15 segundos, anelamento a 60°C - 1 minuto e extensão final a 72°C - 1 minuto. Assim, a amplificação obedece a fórmula $f(n) = 2^n$ tal que $n > 1$. Com $n = 40$, será gerado um total de cópias superior a 2 trilhões do segmento alvo do cDNA.

4.2.3 Cálculo da quantificação relativa dos genes e análise estatística

Para quantificação relativa (QR) foi utilizada a mediana das 09 amostras normais para servir como referência.

O intuito de determinar as médias dos Ciclos de quantificação (Cq) das amostras para os genes *EHMT* foi para calcular e normalizar os valores brutos, por subtração do valor do Cq do gene endógeno (*β-actina*) amplificado juntamente, gerando o valor ΔCq (Cq gene em estudo – Cq gene endógeno).

O ΔCq de cada paciente foi subtraído do ΔCq da referência utilizada (mediana das amostras normais), levando ao valor $\Delta\Delta Cq$. A quantificação relativa (QR) do gene de interesse, normalizada com a *β-actina* e relativa às amostras normais, foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

Com a obtenção do valor da QR final foi feita a análise estatística utilizando-se o teste de Mann-Whitney unicaudal para amostras independentes e o teste exato de Fisher na análise de contingência dos parâmetros clínicos, com o programa GraphPad Prism® versão 7.03. O teste utilizado para cada análise foi especificado na apresentação dos resultados. A significância estatística foi definida como $p < 0,05$, representando uma confiabilidade de 95% da análise.

4.2.4 Pesquisa *In Silico*

Uma comparação entre a análise *in silico* e os nossos resultados experimentais foi realizada. Para análise *in silico* foi utilizada a plataforma de acesso aberto Oncomine da Thermo Fisher Scientific (<https://www.oncomine.org>), que disponibiliza dados de experimentos de alto rendimento, junto a ferramentas de bioinformática para as análises de informações, como dados de expressão gênica em tumores e seus respectivos tecidos normais.

Foi aplicado o filtro de busca: genes *EHMT1* e *EHMT2*; análise diferencial - câncer versus tecido normal; tipo de câncer: carcinoma de células escamosas orais; e valor de $p \leq 0,05$. Esta plataforma, diferentes de várias outras, permite uma busca de forma restrita ao câncer oral e não apenas para o heterogêneo grupo de câncer de cabeça e pescoço.

5. RESULTADOS

5.1 Expressão dos genes *EHMT1* e *EHMT2* em amostras tumorais e normais

Seguindo critérios de elegibilidade, foram excluídas da pesquisa 31 das 40 amostras normais, devido expressão significativamente baixa do gene endógeno β -Actina, por causa de degradação.

A expressão gênica de *EHMT1* e *EHMT2* foi realizada utilizando o campo amostral de 42 amostras tumorais e 9 amostras normais como grupo controle. Os resultados obtidos com a quantificação relativa, mostrou expressão gênica diminuída de *EHMT1* ($p=0.0407$) e *EHMT2* ($p=0.0560$) (gráfico 1) nas amostras tumorais em relação ao grupo controle.

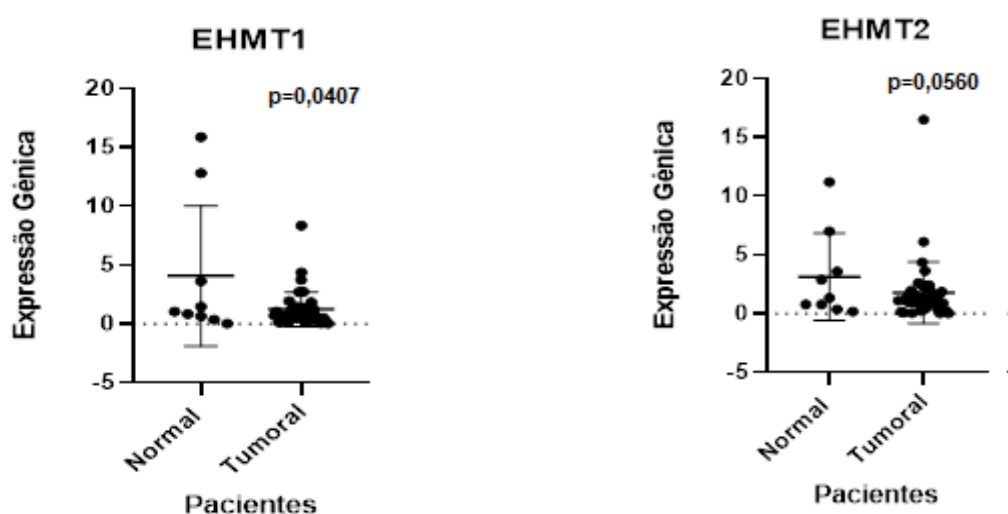


Gráfico 1. Expressão de *EHMT1* e *EHMT2* em amostras normais e tumorais de câncer oral. (Teste estatístico de Mann-Whitney)

5.2 Dados clínicos dos pacientes com câncer de oral

Dos 42 pacientes com câncer oral do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), 38 são do sexo masculino e 04 são do sexo feminino, tabela 5.

Em relação a idade, 31 pacientes estão abaixo dos 60 anos de vida, distribuídos nas seguintes faixas etárias (entre 31 e 40 anos – 03 pacientes, entre 41 e 50 anos – 10 pacientes, entre 51 e 60 anos – 18 pacientes). Acima dos 60 anos de vida, há 11 pacientes, distribuídos nas seguintes faixas etárias (entre 61 e 70 anos – 07 pacientes, entre 71 e 80 anos – 03 pacientes e entre 81 e 90 anos – 01 paciente), tabela 5.

Quanto ao sítio anatômico, nota-se que as regiões de língua e assoalho da cavidade oral são as mais frequentes para o câncer oral, representando 86% de todos os casos, tabela 5.

A avaliação dos pacientes quanto ao sistema TNM, recidiva e óbitos resultou em:

- **05 pacientes apresentaram T1:** Desses, 03 pacientes apresentaram recidiva, 02 pacientes evoluíram para metástase e 02 pacientes foram a óbito.
- **11 pacientes apresentaram T2:** Desses, 04 pacientes apresentaram recidiva, 02 pacientes evoluíram para metástase e 04 pacientes foram a óbito.
- **02 pacientes apresentaram T3:** Os 02 pacientes apresentaram recidiva e metástase e 01 paciente foi a óbito.
- **10 pacientes apresentaram T4:** Desses, 06 pacientes apresentaram recidiva, 04 pacientes foram a óbito.

O tratamento do câncer oral pode ser feito por cirurgia, quimioterapia, radioterapia e, em muitos casos, com combinação de mais de uma modalidade. Neste estudo, os dados relativos ao tratamento mostraram: 15 casos tratados por cirurgia apenas; 18 casos por associação de cirurgia e radioterapia; e 09 casos por associação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia, o que culminou em 05, 09 e 05 óbitos respectivamente, após os tratamentos aplicados, tabela 5.

Em relação ao reaparecimento da doença, após certo período de remissão, dos 42 pacientes, 19 apresentaram recidiva. E para os casos de formação de uma lesão tumoral em local distante do câncer primário em cavidade oral, foram constatados 05 casos de metástase, tabela 5.

Tabela 5. Características clínico-patológicas dos pacientes com CCE oral.

Características		Frequência	
		Absoluta	Percentual
Sexo	Masculino	38	90,5%
	Feminino	04	9,5%
Idade	≥ 60 anos	11	26,1%
	<60 anos	31	73,9%
Localização	Língua	17	40,5%
	Assoalho	18	42,8%
	Gengiva	03	07%
	Outros	04	9,5%
Estadiamento Patológico	T1	05	11,9%
	T2	11	26,2%
	T3	02	4,8%
	T4	10	23,8%
	SEM DADOS	14	33,3%
Tratamento	Apenas Cirurgia	15	35,7%
	Cirurgia e Radioterapia	18	42,9%
	Cirurgia, Radioterapia e Quimioterapia	09	21,4%
Recidiva	Sim	19	45,2%
	Não	10	23,9%
	SEM DADOS	13	30,9%
Metástase	Sim	05	11,9%
	Não	04	9,5%
	SEM DADOS	33	78,6%

5.3 Associação dos dados clínicos com a expressão de *EHMT1* e *EHMT2*

Os dados clínicos colhidos em anamnese são importantes para associação destas características com a expressão gênica de *EHMT1* e *EHMT2*, podendo contribuir para a compreensão da carcinogênese oral. Foi realizada análise de comparação de expressão para cada variável clínica estratificada em dois grupos: idade, estadiamento, recidiva e metástase utilizando o teste de Mann Whitney. Não houve significância estatística em nenhuma análise.

5.4 Análise de contingência

Para a análise de contingência, as amostras foram estratificadas de acordo com o nível de expressão em relação à mediana do grupo tumoral, em amostras com alta ou baixa expressão.

Utilizando o teste de Fischer, avaliou-se se as proporções observadas diferem das hipotetizadas para amostras de alta e baixa expressão e as variáveis clínicas: idade, TNM, recidiva e metástase. Não foi obtida significância estatística para estas análises, contudo a análise descritiva dos dados brutos (expressão de *EHMT1* em relação à idade e estadiamento; e expressão de *EHMT2* em relação à metástase, recidiva e estadiamento) sugere uma associação do comportamento de expressão destes genes com dados clínicos que estão de acordo com a literatura, resultados estes que necessitam de mais estudos para confirmação (tabela 6).

Tabela 6. Análise de contingência dos dados clínicos para as amostras com alta e baixa expressão dos genes *EHMT1* e *EHMT2*

		Variáveis clínicas	Baixa expressão	Alta expressão	Valor de <i>p</i>
EHMT1	Idade	Abaixo de 60	17	13	0.305
		Acima 60	04	08	
	TNM	Abaixo de T3	09	07	0.264
		Igual ou Acima de T3	03	09	
	Recidiva e Metástase	Sim	10	10	0.725
		Não	07	05	
		Variáveis clínicas	Baixa expressão	Alta expressão	Valor de <i>p</i>
EHMT2	Idade	Abaixo de 60	14	11	0.764
		Acima 60	11	07	
	TNM	Abaixo de T3	09	07	0.276
		Igual ou Acima de T3	04	08	
	Recidiva e Metástase	Sim	04	16	0.052
		Não	07	05	

Dados não disponíveis foram excluídos para o teste estatístico.

5.5 Análise *in silico*

Com o intuito de explorar dados de repositórios *online*, oriundos de experimentos como microarranjo de cDNA, em amostras de câncer de cavidade oral e respectivos tecidos normais, foi acessada a plataforma OncoMine, com o filtro de busca já descrito em métodos, onde foram encontrados dois estudos para *EHMT1* e *EHMT2*.

O primeiro dos estudos avalia o nível de expressão de *EHMT1* e *EHMT2* em 22 amostras normais e 57 amostras tumorais em carcinoma de células escamosas em cavidade oral, gráfico 2. Com os dados deste estudo, o resultado encontrado para *EHMT1* foi uma hiperexpressão nas amostras tumorais. Já para *EHMT2* as amostras tumorais apresentaram hipoexpressão do gene, em relação ao grupo controle. (42)

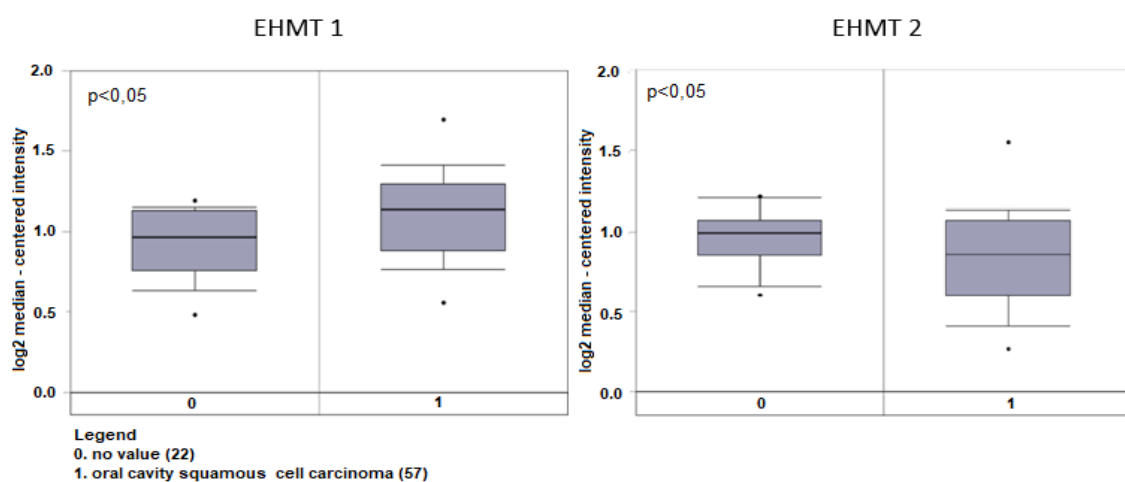


Gráfico 2. Expressão de *EHMT1* e *EHMT2* em CCE oral. (N= 22, T= 57).(42)

Na análise com dados do segundo estudo, a avaliação do nível de expressão de *EHMT1* e *EHMT2* foi realizada em 4 amostras normais e 16 amostras tumorais - carcinoma de células escamosas em cavidade oral, gráfico 3. O resultado encontrado para *EHMT1* e *EHMT2* foi de expressão significativamente maior nas amostras tumorais. (43)

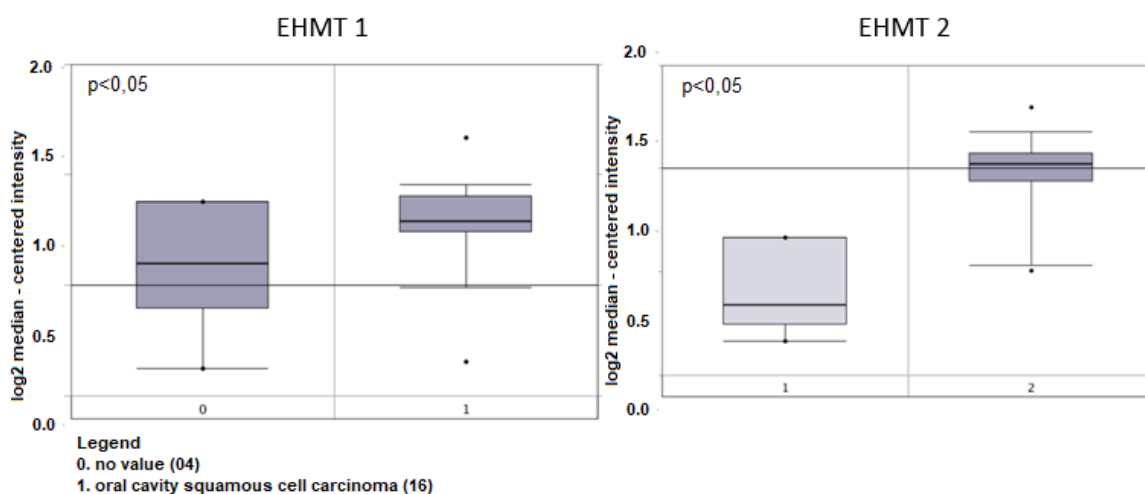


Gráfico 3. Expressão de *EHMT1* e *EHMT2* em CCE oral. (N= 4, T= 16). (43)

6. DISCUSSÃO

Um entendimento bem estabelecido é de que as metiltransferases *EHMT1* e *EHMT2* hiperexpressas reprimem a expressão de supressores tumorais, e dessa forma a alta expressão de *EHMT1* e *EHMT2* no câncer pode levar a desregulação do ciclo celular com proliferação e invasão de células tumorais, além de prognósticos desfavoráveis caracterizados por recidivas, metástases e baixa sobrevida dos pacientes. Portanto, dentre as várias rotas de regulação da oncogênese, *EHMT1* e *EHMT2* parecem ser reguladores epigenéticos indispensáveis. Apesar da família *EHMT* estar bem caracterizada e predominantemente hiperexpressa em diversos cânceres, inclusive no grupo de câncer de cabeça e pescoço, no câncer oral quase não há estudos definindo os seus mecanismos de ação e regulação. (36)(37)(38)(39)(41)

Para *EHMT1* não foram detectados estudos em câncer oral, já para *EHMT2*, Ren A. et al. descreve que a inibição de *G9a* ou *EHMT2* reduz o crescimento e proliferação celular, além de induzir células de carcinoma espinocelular oral a apoptose e autofagia. Este estudo de Ren A. et al. foi realizado em linhagens de células (Tca8113 e KB) de carcinoma espinocelular oral, portanto há uma limitação e necessidade de estudos com amostras clínicas de câncer oral.(40)

Esta pesquisa, contou com 42 espécimes de carcinoma de células escamosas exclusivos da cavidade oral, sendo 90,5% das amostras representadas pelo gênero masculino. O estadiamento no momento do diagnóstico mostrou 11,9% dos pacientes classificados em estágio patológico T1, 26,2% em estágio T2, 4,8% em estágio T3 e 23,8% em estágio T4. Além disso, 33% dos pacientes não apresentaram dados disponíveis, fator limitante para uma compreensão mais exata dessa distribuição. Esses achados confirmam os dados epidemiológicos e clínicos já descrito pela literatura, inclusive pelo Ministério da Saúde e por NEVILLE 2016.(1)(2)

Interessantemente, o nível de expressão gênica de *EHMT1* nas 42 amostras tumorais deste estudo, apresentou-se diminuída nas amostras tumorais, em relação ao grupo controle.

Essa hipoexpressão gênica de *EHMT1* nas amostras clínicas tumorais resultou em dados conflitantes com os achados na literatura, pois algumas pesquisas identificaram hiperexpressão de *EHMT1* e *EHMT2*, associada à inibição de supressores tumorais, no câncer oral e de cabeça e pescoço. Contudo, a análise *in silico* também apresentou resultados discrepantes aos encontrados na literatura, para *EHMT2*, que revelou hipoexpressão nas amostras tumorais, demonstrando possível heterogeneidade dessas enzimas metiltransferases no câncer oral, assim como já foi demonstrado em outros cânceres. (36)(42)(43)(44)

Na análise *in silico*, realizada para câncer de cabeça e pescoço com 148 amostras tumorais e 55 amostras normais (dados não apresentados), *EHMT1* não apresentou diferença significativa entre as amostras tumorais e as do grupo controle, corroborando com o entendimento de que há de fato um perfil de heterogeneidade dessas enzimas metiltransferases (44). Além disso, ao se avaliar a curva de sobrevida *in silico*, usando-se o nível de expressão de *EHMT1* ou *EHMT2* com a probabilidade de sobrevivência dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, não houve significância estatística para ambos os genes. Dessa forma, embora mais estudos sejam necessários, esses genes não parecem, por si só, exercer um papel decisivo na carcinogênese oral e de cabeça e pescoço.(45)

Liu S. et al. define em seu trabalho que o aumento de expressão de *EHMT2* é essencial para que ocorra metástase em linfonodos e recorrência local mediada por transição epitelial mesenquimal (TEM) e repressão transcricional de Snail e de E-caderina em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. No mesmo estudo, Liu S. et al. enfatiza que TEM é necessário para desenvolvimento embrionário, remodelação tecidual e cicatrização. Dessa forma, *EHMT2* parece seguir papéis específicos a depender do sítio anatômico e contexto celular, participando tanto de atividades fisiológicas como de patológicas, como é o caso do câncer. (37)

No estudo de Li KC. et al. é descrito que a inibição de *EHMT2* induz a morte celular autofágica em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, porém no câncer de próstata e pâncreas a inibição causa a indução de fenótipo senescente, resultados estes que corroboram com o fato dessas enzimas metiltransferases possuírem heterogeneidade a depender do contexto e tecido analisados.(41)

Em nosso estudo, não encontramos associação estatisticamente significativa entre o nível de expressão das duas *EHMT* e o prognóstico (grau de disseminação, metástase, recidiva) dos pacientes com câncer oral. Para a análise de contingência, não foi obtida significância estatística, contudo a análise descritiva dos dados brutos (expressão de *EHMT1* em relação à idade e estadiamento; e expressão de *EHMT2* em relação à metástase, recidiva e estadiamento) sugere uma associação do perfil de expressão destes genes com dados clínicos apontados e que estão de acordo com a literatura, resultados estes que necessitam de mais estudos para confirmação, portanto o significado clínico-patológico da expressão de *EHMT1* e *EHMT2* neste tipo de câncer ainda precisa ser melhor esclarecido.

Desta forma, para determinar a função de *EHMT1* e *EHMT2* no câncer oral, esclarecendo a heterogeneidade explicitada pelos resultados do presente estudo, são necessários estudos complementares com um maior número amostral, em grupos populacionais distintos, com associação entre os fatores de risco (físicos, químicos, biológicos, nutricionais, sócio-demográficos e socioeconômicos) e associação com outras metiltransferases envolvidas nos processos oncogênicos, para que se possa entender melhor a variabilidade genética e epigenética que ocorre de forma dinâmica e concomitante e que pode afetar a maneira como estes genes agem no câncer oral.

7. CONCLUSÃO

A expressão aberrante, e elevada na maioria dos casos, de *EHMT1* e *EHMT2* está associada à promoção de fenótipo maligno em cânceres de mama, próstata, pulmão, fígado e câncer de cabeça e pescoço, havendo poucas pesquisas focadas na expressão de *EHMT1* e *EHMT2* no câncer oral.

Uma verificação muito importante em relação a expressão das enzimas metiltransferases *EHMT1* e *EHMT2*, após confrontar dados da pesquisa, literatura e achados *in silico*, foi de que as enzimas parecem obedecer a padrões distintos a depender do tecido analisado, contexto celular, etnia dos pacientes, estágio individual do câncer, mostrando heterogeneidade na expressão gênica.

No nosso estudo, a expressão de *EHMT1* apresentou-se diminuída no câncer oral, achados contrários aos da nossa análise *in silico* e aos desfechos de outras pesquisas, inclusive de trabalhos com espécimes tumorais de cabeça e pescoço. Além disso, na análise *in silico*, *EHMT2* se mostrou hipoexpresso no câncer oral. Estes resultados conflitantes dão indícios de que *EHMT1* e *EHMT2*, com seus múltiplos papéis, tanto na normalidade (ciclo celular, replicação, reparo e regulação do material genético) quanto na doença (proliferação celular descontrolada, transição epitelial-mesenquimal, plasticidade celular, resistência à terapia, angiogênese), podem ter níveis de expressão variados, a depender de tecidos, idade, gênero, etnia, estágio individual do câncer, grau do tumor, metástase e contextos celulares, o que precisa ser melhor investigado e esclarecido.

As limitações desta pesquisa envolvem um número reduzido de pacientes, degradação de amostras do grupo controle, que foram excluídas do estudo, e ausência de prontuários com descrição completa dos dados e da evolução clínica dos enfermos. A principal contribuição deste trabalho foi evidenciar, pela metodologia proposta, a expressão diminuída de *EHMT1* nas amostras de câncer de cavidade oral em relação ao grupo controle.

Para determinar a função de *EHMT1* e *EHMT2* no câncer oral, são necessários estudos complementares com um maior número amostral, em grupos populacionais distintos, com associação dos fatores de risco, gerando informações que aprimorem o prognóstico, a tomada de decisão clínica e deliberação de tratamentos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NEVILLE B. Patologia Oral & Maxilofacial. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
2. Brasil, Ministério da Saúde. Tipos de câncer [Internet]. Estimativa de Câncer no Brasil. 2021 [cited 2021 Jun 20]. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>
3. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. Buscar dados pelo DOI <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
4. Silva PGB, et al. Histórico de Consumo de Álcool como Fator Preditivo de Sobrevida em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Boca e Orofaringe: Follow-up de 15 Anos, Revista Brasileira de Cancerologia, 2020; 66(1): e-02573.
5. ROBBINS & COTRAN. Capítulo 8: Neoplasias. In: Bases Patológicas das Doenças. 10ª Edição. Editora Elsevier, 2018. 281-286.
6. Petito G, Carneiro M, Santos S, Silva A, Alencar R, Gontijo A, et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. Braz J Otorhinolaryngol. 2017;83(1):38-44.
7. Piemonte ED, Lazos JP, Belardinelli P, et al. Efecto de la acumulación de factores de riesgo en el riesgo de carcinoma de células escamosas bucal [Effect of the accumulation of risk factors on the risk of oral squamous cell carcinoma]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2021;78(2):158-165. Published 2021 Jun 28. doi:10.31053/1853.0605.v78.n2.31247
8. Schiff BA MD, Montefiore Medical Center, The University Hospital of Albert Einstein College of Medicine. [cited 10 Julho 2021] Available from: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/SearchResults?query=carcinoma+oral>.
9. Gomes R. Doenças da cavidade bucal, Carcinoma de células escamosas. Acessado em 5 de julho de 2021, Disponível em: <https://patologiabucal.com.br/portfolio-item/carcinoma-de-celulas-escamosas-de-boca/>
10. PATOLOGIA E ESTOMATOLOGIA UFRGS, NEOPLASIAS, Acessado em 10 de julho 2021. Disponível em: http://patoestomatoufrgs.com.br/patologia-bucal/2_neoplasias.php
11. El-Naggar A. K. (Hg.). WHO classification of head and neck tumours: International Agency for Research on Cancer. (2017).
12. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. Curr Treat Options Oncol. 2017 Jul;18(7):40. doi: 10.1007/s11864-017-0484-y. PMID: 28555375.
13. FONTES D, SIMOES G, TOSTES O, SILVA S, Paulo S. Clinical and microscopic characteristics of lip squamous cell carcinomas in an oral diagnostic service Rev. Estomatol. Herediana vol.27 no.2 Lima abr. 2017.
14. Padma R, Kalaivani A, Sundaresan S, Sathish P. The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Pathol. 2017 Sep-Dec;21(3):461. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_241_16. PMID: 2.
15. Lin NC, Hsu JT, Tsai KY. Survival and clinicopathological characteristics of different histological grades of oral cavity squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study. PLoS One. 2020 Aug 25;15(8):e0238103. doi: 10.1371/journal.pone.0238103.

16. Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017;117(6):856-866. doi:10.1038/bjc.2017.244.
17. Amaya Arbeláez MI, de Paula E Silva ACA, Navegante G, Valente V, Barbugli PA, Vergani CE. Proto-Oncogenes and Cell Cycle Gene Expression in Normal and Neoplastic Oral Epithelial Cells Stimulated With Soluble Factors From Single and Dual Biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 25;11:627043. doi: 10.3389/fcimb.2021.627043. PMID: 33718274; PMCID: PMC7947338.
18. Mao L, Lee JS, Fan YH, Ro JY, Batsakis JG, Lippman S, Hittelman W, Hong WK. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med*. 1996 Jun;2(6):682-5.
19. Barem Rabenhorst SH, Lima Verde Osterne R, Weege Nonaka CF, Montezuma Sales Rodrigues A, Luiz Maia Nogueira R, Mário Rodriguez Burbano R, Barroso Cavalcante R. Detection of deletions in 1q25, 1p36 and 1pTEL and chromosome 17 aneuploidy in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Oral Oncol*. 2021 May;116:105221. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105221. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33610067.
20. Ilango S, Paital B, Jayachandran P, Padma PR, Nirmaladevi R. Epigenetic alterations in cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020 Mar 1;25(6):1058-1109. doi: 10.2741/4847. PMID: 32114424.
21. Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *Am J Pathol*. 2016 Jul;186(7):1724-35. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.02.023. PMID: 27338107; PMCID: PMC4929396.
22. Šupić G, Kozomara R, Branković-Magić, Jović N, Magić Z. Gene hyper-methylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology*. Dezembro de 2009;45(12):1051–7.
23. Shiah S-G, Chang L-C, Tai K-Y. The involvement of promoter methylation and DNA methyltransferase-1 in the regulation of EpCAM expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. Janeiro 2009;45(1): e1–8.
24. Ahuja N, Sharma AR, Baylin SB. Epigenetic Therapeutics: A New Weapon in the War Against Cancer. *Annu Rev Med*. 2016; 67: 73-89. doi: 10.1146 / annurev-med-111314-035900.
25. Tollervey JR, Lunyak VV. Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 2012 Aug;7(8):823-40.
26. JORGENSEN, STINE, GUNNAR S, SORENSEN SC. "Histone H4 Lysine 20 Methylation: Key Player in Epigenetic Regulation of Genomic Integrity." *Nucleic Acids Research* 41.5 (2013): 2797–2806.
27. Venkatesh S, Workman JL. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015 Mar;16(3):178-89. doi: 10.1038/nrm3941. Epub 2015 Feb 4. PMID: 25650798.
28. FAZARY, A. E.; JU, Y. H.; ABD-RABBOH, H. S. M. How does chromatin package DNA within nucleus and regulate gene expression? *Int J Biol Macromol*, v. 101, p. 862-881, Aug 2017.
29. OU, H. D. et al. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science*, v. 357, n. 6349, Jul 28 2017.

30. Jan S, Dar MI, Wani R, Sandey J, Mushtaq I, Lateef S, Syed SH. Targeting EHMT2/ G9a for cancer therapy: Progress and perspective. *Eur J Pharmacol.* 2021 Feb 15;893:173827. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173827. Epub 2020 Dec 19. PMID: 33347828.
31. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001;15:2343–2360.
32. Greer E, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):343-57.
33. PIERCE B.A., *Genética - Um Enfoque Conceitual.* 5 ed. Guanabara Koogan, 2016. ISBN-10 8527729059.
34. BANNISTER AJ, KOUZARIDES T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, v. 21, n. 3, p. 381–395, mar. 2011.
35. Herz HM, Garruss A, Shilatifard A. SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends Biochem Sci.* 2013 Dec;38(12):621-39. doi: 10.1016/j.tibs.2013.09.004. Epub 2013 Oct 20. PMID: 24148750; PMCID: PMC39.
36. Saha, Nirmalya, and Andrew G Muntean. "Insight into the multi-faceted role of the SUV family of H3K9 methyltransferases in carcinogenesis and cancer progression." *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer vol. 1875,1 (2021): 188498.* doi:10.1016/j.b.
37. Liu S, Ye D, Guo W, Yu W, He Y, Hu J, et al. G9a is essential for EMT-mediated metastasis and maintenance of cancer stem cell-like characters in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6:6887–6901.
38. Guan X, Zhong X, Men W, Gong S, Zhang L, Han Y. Analysis of EHMT1 expression and its correlations with clinical significance in esophageal squamous cell cancer. *Mol Clin Oncol.* 2014 Jan;2(1):76-80. doi: 10.3892/mco.2013.207. Epub 2013 Oct 24. PMID: 246493.
39. Liu C-W, Hua K-T, Li K-C, Kao H-F, Hong R-L, Ko J-Y, et al. Histone Methyltransferase G9a Drives Chemotherapy Resistance by Regulating the Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Ther.* 2017;16:1421.
40. Ren A, Qiu Y, Cui H, Fu G. Inhibition of H3K9 methyltransferase G9a induces autophagy and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;459:10–17.
41. Li KC, Hua KT, Lin YS, Su CY, Ko JY, Hsiao M, Kuo ML, Tan CT. Inhibition of G9a induces DUSP4-dependent autophagic cell death in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer.* 2014 Jul 15;13:172. doi: 10.1186/1476-4598-13-172. PMID: 25027955; PMCID: P.
42. Peng CH, Liao CT, Peng SC, Chen YJ, Cheng AJ, Juang JL et al. A Novel Molecular Signature Identified by Systems Genetics Approach Predicts Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Plos One.* 2011;6(8) e23452.
43. Toruner GA, Ulger C, Alkan M, Galante AT, Rinaggio J, Wilk R, et al. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;154:27-35.
44. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: Um Banco de Dados de Microarrays de Câncer e Plataforma Integrada de Mineração de Dados. *Neoplasia.* 2004 Jan;6(1):1–6.
45. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Rodriguez IP, Chakravarthi BVSK and Varambally S. UALCAN: A portal for facilitating tumor subgroup gene expression and survival analyses. *Neoplasia.* 2017 Aug;19(8):649-658. doi: 10.1016/j.neo.2.