



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VINICIUS MENDES EDUARDO

**PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE CDKN2a
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

VITÓRIA – ES
2018

VINICIUS MENDES EDUARDO

**PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE CDKN2a
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof^o. Dr^a Sandra Ventorin von Zeidler

VITÓRIA – ES

2018

VINICIUS MENDES EDUARDO

**PERFIL DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE CDKN2a
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 19 de março de 2018

Prof^a. Dr^a Sandra Vektorin von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador(a)

Prof. Dr^a. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Elismauro Francisco de
Mendonça
Universidade Federal de Goiás

Dedico este trabalho a todos os pacientes que lutam para vencer o câncer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e acima de qualquer outra coisa a minha família, principalmente minha mãe, meu irmão, minhas tias e minha avó, que não mediram esforços para a realização deste sonho.

Aos meus amigos Eduardo Machado e Guilherme Machado, por terem sido as mãos estendidas nas adversidades.

A todos os meus amigos, e colegas que em todo o momento acreditaram mais no meu potencial do que eu mesmo e me incentivaram a arriscar e seguir este caminho.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Molecular e Imunologia, que não me deixaram desistir, se transformaram em uma família, e ensinaram boa parte do que eu sei.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Espírito Santo.

A secretária do PPGBiotec Miriam Assis, pela grande competência e parceria.

À Prof^a Dr^a Sandra Ventorin von Zeidler, por todo ensinamento, dedicação e principalmente paciência.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares.

Aos Hospitais Santa Rita de Cássia e Cassiano Antônio de Moraes pela parceria.

[...] E... Assim é a vida! Por mais que estejamos injuriados, sem cor e impacientes, precisamos continuar regando nossas esperanças. Um dia, como outro qualquer, o sonho se realiza. A injúria passa, a cor aparece e a paciência chega.

(Victor Monteiro Zetum)

RESUMO

EDUARDO, V.M. **Perfil de metilação e expressão do gene CDKN2a em carcinoma epidermóide oral**. 2018. 56f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

Determinação e validação de biomarcadores tumorais são importantes para avaliar o prognóstico de pacientes com câncer. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de metilação e de expressão do gene CDKN2a como possível biomarcador de prognóstico em pacientes com carcinoma epidermóide oral (CEO). Foram selecionados 115 casos com diagnóstico conclusivo de CEO destes 70 apresentavam tecido tumoral congelado. Dados clínico-patológicos foram obtidos por meio de entrevista e análise de prontuários. Cinquenta e cinco amostras de DNA com qualidade obtidas foram submetidas a PCR específica para metilação, e os casos positivos foram submetidos ao sequenciamento de Sanger para avaliar os dinucleotídeos citosina-guanina hipermetilados. Expressão da proteína p16 foi avaliada por imunohistoquímica. As análises estatísticas relacionando os resultados foram feitas e as curvas de Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Doença foram elaboradas pelo método de Kaplan-Meier. A frequência de hipermetilação do CDKN2a na população estudada foi de 36,4%, sendo que a maior parte das citosinas localizadas em regiões CpG estavam hipermetiladas e citosinas fora da região CG também apresentaram metilação. A expressão de p16 foi predominantemente baixa (76,7%) nestas amostras. O perfil de metilação não mostrou associação com os indicadores de prognóstico, bem como não interferiu na Sobrevida Global e Livre de Doença. No entanto, os indicadores de prognóstico tamanho do tumor, estágio clínico, metástase linfonodal e modalidade de tratamento mostraram estar associados à Sobrevida Global. Concluímos que a hipermetilação do gene CDKN2a não se mostrou um bom biomarcador de prognóstico no grupo analisado neste estudo, mas parece desempenhar papel importante na carcinogênese do CEO.

Palavras-chave: Hipermetilação. P16. Epigenética. Cavidade bucal.

ABSTRACT

EDUARDO V.M. **Methylation and expression. Profile of CDKN2a gene in oral squamous cell carcinoma.** 2018. 56f. Dissertation (Master in Biotechnology – Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo, Brazil).

Determination and validation of tumor biomarkers are important to evaluate the prognosis of cancer patients. This study aimed to evaluate the methylation and expression profile of the CDKN2a gene as a possible prognostic biomarker in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). We selected 115 cases with conclusive diagnosis of OSCC of these 70 with frozen tumor tissue available. Clinical-pathological data were obtained by interview and analysis of medical records. Fifty-five quality DNA samples were obtained and submitted to methylation-specific PCR, and the positive cases were submitted to Sanger sequencing to evaluate hypermethylated cytosine-guanine dinucleotides. Expression of the p16 protein was assessed by immunohistochemistry. Statistical analyzes relating the results were made and the Global Survival and Disease-Free Survival curves were elaborated using the Kaplan-Meier method. The frequency of hypermethylation of CDKN2a in the study population was 36.4%, and most of the cytosines located in CpG regions were hypermethylated and cytosines outside the CG region also presented methylation. The expression of p16 was predominantly low (76.7%) in these samples. The methylation profile showed no association with the prognostic indicators, nor did it interfere with the Global and Disease-Free Survival. However, prognostic indicators of tumor size, clinical stage, lymph node metastasis and modality of treatment were shown to be associated with Global Survival. We conclude that the hypermethylation of the CDKN2a gene did not prove to be a good prognostic biomarker in the group analyzed in this study, but it seems to play an important role in the early stages of OSCC's carcinogenesis.

Keywords: Hypermethylation. P16. Epigenetics. Oral cavity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produtos do gene CDKN2a interferindo na progressão do ciclo celular....	18
Figura 2. Mecanismos relacionados à metilação.....	19
Figura 3. Organograma das etapas laboratoriais	29
Figura 4. Representação gráfica das ilhas CpG metiladas e não metiladas.	34
Figura 5. Presença de citosinas metiladas em outras regiões.....	36
Figura 6. Fotomicrografia representativa da expressão de p16.....	39
Figura 7. Sobrevida Global segundo perfil de hipermetilação.	42
Figura 8. Sobrevida Global segundo comprometimento linfonoda (A), estágio clínico (B), modalidade de tratamento (C) e tamanho do Tumor (D).....	43
Figura 9. Sobrevida Livre de Doença segundo perfil de hipermetilação.....	45
Figura 10. Sobrevida Livre de Doença segundo tamanho do tumor (A), estágio clínico (B), comprometimento linfonodal (C) e modalidade de tratamento (D).	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação TNM e Estádios Clínicos.....	16
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados.	24
Tabela 3. Características demográficas e clínicas da população com carcinoma epidermóide oral analisada (n = 55).	28
Tabela 4. Status de metilação do gene CDKN2a e variáveis clínico-patológicas (n = 55).	30
Tabela 5. Associação entre quantidade consumida, tempo de exposição aos fatores de risco tabaco e álcool e o perfil de metilação do gene CDKN2a.	33
Tabela 7. Associação entre a o perfil de metilação do gene CDKN2a e a expressão de p16 (n = 30).	38
Tabela 8. Resposta ao tratamento em relação com o perfil de metilação do gene CDKN2a (n = 51).	41
Tabela 9. Modelo de Regressão Multivariada de Cox para Sobrevida Global.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDK	Quinase dependente de ciclina (do inglês <i>Cyclin-dependent Kinase</i>)
CEO	Carcinoma epidermóide oral
CpA	Citosina precedendo adenina
CpC	Citosina precedendo citosina
CpG	Citosina precedendo guanina
CpT	Citosina precedendo timina
DAB	3,3-diaminobenzeno
DNMT	DNA metiltransferase (do inglês <i>DNA methyltransferase</i>)
HPV	Papiloma vírus humano
IHQ	Imuno-histoquímica
MSP	PCR específica para metilação (do inglês <i>Methylation specific polymerase chain reaction</i>)
Não-CG	Conteúdo fora dos dinucleotídeos CpG
pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pRb	Proteína do retinoblastoma
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TBS	Tampão tris salino (do inglês <i>Tris buffered saline</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 CÂNCER BUCAL E EPIDEMIOLOGIA	15
3.2 P16 NO CICLO CELULAR	17
3.3 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO DO DNA NO CONTEXTO DO CÂNCER.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	21
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	22
4.3 MODIFICAÇÃO DO DNA PELA TÉCNICA DO BISSULFITO DE SÓDIO.....	22
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ESPECÍFICA PARA METILAÇÃO (MSP)	23
4.5 SEQUENCIAMENTO	24
4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA DE p16	25
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE SOBREVIDA	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E STATUS DE HIPERMETILAÇÃO.....	28
5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOSINAS METILADAS.....	34
5.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p16.....	37
5.4 AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA.....	40
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	53

1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2016 cerca de 15.490 novos casos de neoplasias localizadas em cavidade oral para cada 100 mil habitantes no Brasil (INCA, 2015).

Embora novas tecnologias venham sendo desenvolvidas visando melhorar o tratamento dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço, a taxa de sobrevivência manteve-se entre 50-55% nas últimas décadas (SILVERMAN, 2001). Atualmente não existem biomarcadores que indiquem o comportamento tumoral agressivo, sendo o *status* linfonodal o fator prognóstico mais utilizado. Desta forma, é importante identificar marcadores que permitam uma avaliação mais precisa do prognóstico, visando auxiliar na conduta médica terapêutica (COOMBES *et al.*, 2003).

No entanto, esta busca não é fácil, sobretudo pelo câncer ser uma doença multifatorial que envolve diversas etapas de transformação celular induzidas por mudanças genéticas e epigenéticas (LOEB; HARRIS, 2008). Além disso, a progressão de muitos tumores está intimamente relacionada com alterações em genes responsáveis pelo controle do crescimento e diferenciação celular (VERMA; SRIVASTAVA, 2002).

É conhecido que fatores ambientais são capazes de produzir mutações genéticas, e que estas podem, em algum momento, levar ao desenvolvimento de algum tipo de câncer, por sua capacidade de ativar proto-oncogenes ou silenciar genes supressores de tumor. Da mesma forma, as alterações epigenéticas, também ocasionadas por fatores ambientais, apesar de não provocarem modificações na sequência de bases do DNA (OLIVEIRA, 2011), podem alterar sua capacidade de transcrição e interferir na expressão de genes importantes no controle do ciclo celular. Dentre os eventos epigenéticos relacionados ao desenvolvimento de tumores, os mecanismos relacionados aos processos de hipermetilação e hipometilação gênica são os mais estudados (RODENHISER; MANN, 2006).

A metilação consiste em uma adição covalente do grupo metil (CH₃) ao carbono 5' de uma citosina. Essa modificação ocorre geralmente em uma citosina adjacente a uma guanina (5' CG 3' ou ilha CpG) pela ação da enzima DNA metiltransferase (BIRD, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em células normais os dinucleotídeos CpGs presentes

nas regiões promotoras de genes ativos não estão metilados, porém, quando ocorre o acúmulo de radicais metil nestes dinucleotídeos, estas ilhas tornam-se hipermetiladas, o que impede os fatores de transcrição de ligarem-se aos sítios de reconhecimento da fita de DNA, interferindo na expressão gênica, podendo provocar o silenciamento gênico (SINGAL; GINDER, 1999). A hipermetilação de genes supressores de tumor desempenha função silenciadora nestes genes e pode contribuir para a tumorigênese (ROBERTSON, 2005).

O gene CDKN2a é um gene supressor tumoral responsável por codificar a proteína p16 que tem uma importante função na regulação do ciclo celular, atuando na fase G1 e impedindo sua progressão para a fase S (DON *et al.*, 2014). Assim, p16 atua como supressor tumoral impedindo que fatores de transcrição sejam liberados provocando uma parada no ciclo celular. Desta forma, o silenciamento do gene CDKN2a por mutação ou hipermetilação, pode levar à desregulação do ciclo celular permitindo que a célula progrida para uma via oncogênica (SHERR, 2000; COOMBES *et al.*, 2003).

Assim, a busca de biomarcadores de prognóstico em genes reguladores do ciclo celular que possam estar silenciados por mecanismos epigenéticos, como a hipermetilação, tem sido utilizada como ferramenta para o estudo de diferentes tipos de tumores, incluindo aqueles da cavidade oral. Desse modo, nossa hipótese é que o perfil de metilação do gene CDKN2a pode estar alterado e associado ao desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral (CEO), interferindo assim em sua expressão. Dessa forma, nosso estudo propõe-se a avaliar se a hipermetilação do gene CDKN2a pode estar envolvida na tumorigênese do CEO e ser utilizado como método auxiliar na avaliação do prognóstico em pacientes com estes tumores.

A hipótese do nosso estudo é que a hipermetilação do gene CDKN2a em CEO pode ter potencial para auxiliar no prognóstico, contribuindo para identificar a agressividade tumoral, e desta forma, direcionar a conduta médica para terapias mais individualizadas

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar o perfil de metilação da região promotora do gene CDKN2a em células tumorais de CEO e sua aplicação como biomarcador de prognóstico em pacientes acometidos por estes tumores

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de metilação do gene CDKN2a em amostras de CEO;
- Verificar o percentual de citosinas metiladas presentes nas amostras de CEO e citosinas presentes em ilhas CpG e em conteúdo não-CG;
- Avaliar a associação entre o perfil de metilação do gene CDKN2a com a exposição a fatores ambientais como o consumo de álcool e uso do tabaco, e dados clínico-patológicos de tamanho do tumor primário, metástase linfonodal e estágio clínico;
- Relacionar o perfil de metilação do gene CDKN2a com a expressão da proteína p16 no tecido, para avaliar este evento como silenciador da expressão proteica.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER BUCAL E EPIDEMIOLOGIA

Em 2012 o câncer atingiu cerca de 14.1 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por aproximadamente 8.2 milhões de óbitos. A alta incidência e mortalidade tornam o câncer um problema de saúde pública. Mais de 60% dos casos de câncer concentram-se na África, Ásia e nas Américas do Sul e Central. Juntos, esses continentes concentram cerca de 70% de todas as mortes por câncer no mundo (FERLAY *et al.*, 2015).

No Brasil, o câncer da cavidade bucal está entre os 10 tipos de tumores mais frequentes, com uma estimativa para o ano de 2016 de 11,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,21 novos casos para cada 100 mil mulheres, sendo o quinto tipo de câncer mais comum entre os homens e o nono entre as mulheres (INCA, 2015).

Na cavidade bucal, o câncer afeta mais comumente a língua e o assoalho de boca, mas também pode acometer diversos outros sítios como a mucosa jugal, gengiva, palato duro e área retromolar (INCA,2015). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma epidermóide oral (CEO), também conhecido como carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular. Este tipo de neoplasia tem origem no epitélio de revestimento e representa cerca de 95% de todos os tumores desta localidade (BRENER *et al.*, 2007). O diagnóstico é realizado por meio de exame físico e histopatológico e, em mais de 70% dos casos, acontece em estádios avançados da doença (SHRIDHAR *et al.*, 2016).

A etiologia do CEO é multifatorial, sendo o consumo de álcool, uso do tabaco fatores de risco já bem estabelecidos (DON *et al.*, 2014). O efeito destes agentes carcinogênicos sobre a célula favorece a iniciação, transformação e posterior acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, resultando no desenvolvimento tumoral e sua progressão. Por interferirem diretamente nos processos de proliferação celular e apoptose, promovem a desregulação do ciclo celular e podem permitir com que a célula adquira outras propriedades características da célula tumoral como a

autonomia de proliferação, autossuficiência em sinalização celular e angiogênese (ZHAO *et al.*, 2016).

A infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) subtipos 16 e 18 que possuem alto risco oncogênico também é incluído como importante fator de risco na carcinogênese bucal (LEE *et al.*, 2010). O vírus tem a capacidade de aumentar o acúmulo da proteína p16, ocasionando a perda do controle do ciclo celular. Este mecanismo é ativado pelas proteínas virais E6 e E7, causando a inativação da pRb ocasionando o descontrole da progressão do ciclo celular e consequentemente o acúmulo de p16 que é responsável por fazer a regulação desta fase (RYU *et al.*, 2017).

No tratamento do câncer, a conduta terapêutica é estabelecida considerando o tipo histológico do tumor, o sítio anatômico, a condição clínica do paciente e o estadiamento clínico. O sistema de estadiamento mais amplamente utilizado para estes tumores é o sistema TNM, estabelecido pela União Internacional Contra o Câncer. Este sistema de classificação de tumores malignos leva em consideração a extensão do tumor primário, o acometimento de estruturas anatômicas adjacentes e o acometimento de estruturas à distância. O estadiamento clínico é útil para auxiliar na avaliação do prognóstico e no direcionamento do tratamento adequado, levando em conta as o tamanho do tumor primário (T), o acometimento linfonodal (N) das cadeias de drenagem linfática do sítio anatômico em que o tumor se encontra, e na presença de metástases à distância (M). Os três parâmetros analisados de classificação recebem subclassificações numéricas (Tis a T4, N0 a N3, M0 a M1) e são agrupados em estádios clínicos como demonstrado na Tabela 1 (UICC, 2016).

Tabela 1. Classificação TNM e Estádios Clínicos

Estádio	Tamanho do Tumor	Metástase linfonodal	Metástase a Distância
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IVA	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
Estádio IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

A maior parte dos casos de CEO no Brasil é diagnosticado tardiamente nos estádios III e IV, o que implica na redução da sobrevida média dos pacientes, que nestes tumores é de 5 anos (SHRIDHAR *et al.*, 2016). No entanto, se a doença for identificada em uma fase inicial ou se um indicador de desenvolvimento tumoral precoce for identificado, as condições para o tratamento serão mais favoráveis, podendo o curso da doença ser menos agressivo, com menor custo e conseqüentemente, aumentar as chances de cura e sobrevida do paciente (WISSINGER *et al.*, 2014). Além de indicadores de prognóstico, biomarcadores em lesões pré-malignas como as displasias e hiperplasias podem identificar o potencial de malignidade desta lesão (SHRIDHAR *et al.*, 2016).

3.2 P16 NO CICLO CELULAR

Durante o processo de tumorigênese, genes e moléculas que interferem no ciclo celular atuam como reguladores positivos e negativos controlando a divisão celular (ALVES *et al.*, 2016). Durante a fase G1 do ciclo celular, ciclinas são responsáveis pelo controle da progressão do ciclo celular formando complexos proteicos com as quinases dependentes de ciclina (CDK). A ciclina D1 liga-se à CDK4/6 formando um complexo que é responsável por fosforilar a proteína do retinoblastoma (pRb), que no estado hiperfosforilado libera o fator de transcrição nuclear E2F o qual entra no núcleo onde ativará a expressão de genes responsáveis pela progressão do ciclo celular para a fase S (ZHAO *et al.*, 2016).

Um importante gene regulador da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular é o CDKN2a (Figura 1). Localizado no cromossomo 9, locus 9p21 (STERLACCI *et al.*, 2011), pertencente à família dos genes supressores de tumor e tem capacidade de expressar diversas proteínas, sendo as mais estudadas as proteínas p14 e p16, relacionadas ao câncer (AL-KAABI *et al.*, 2014).

Quando a proteína p16 está ativa, ela liga-se à CDK4/6 impedindo sua ligação com a ciclina D1, evitando a formação do complexo ciclina-CDK. Desta forma, a pRb

mantem-se no estado hipofosforilado, retendo o fator de transcrição E2F, e inibindo o ciclo celular de progredir para a fase S ocasionando assim, a parada do ciclo celular (LIGGETT; SIDRANSKY, 1998; PIERINI *et al.*, 2013).

Eventos capazes de silenciar o gene CDKN2a podem ocasionar uma proliferação descontrolada do ciclo celular contribuindo para o desenvolvimento tumoral (RUIZ *et al.*, 2006).

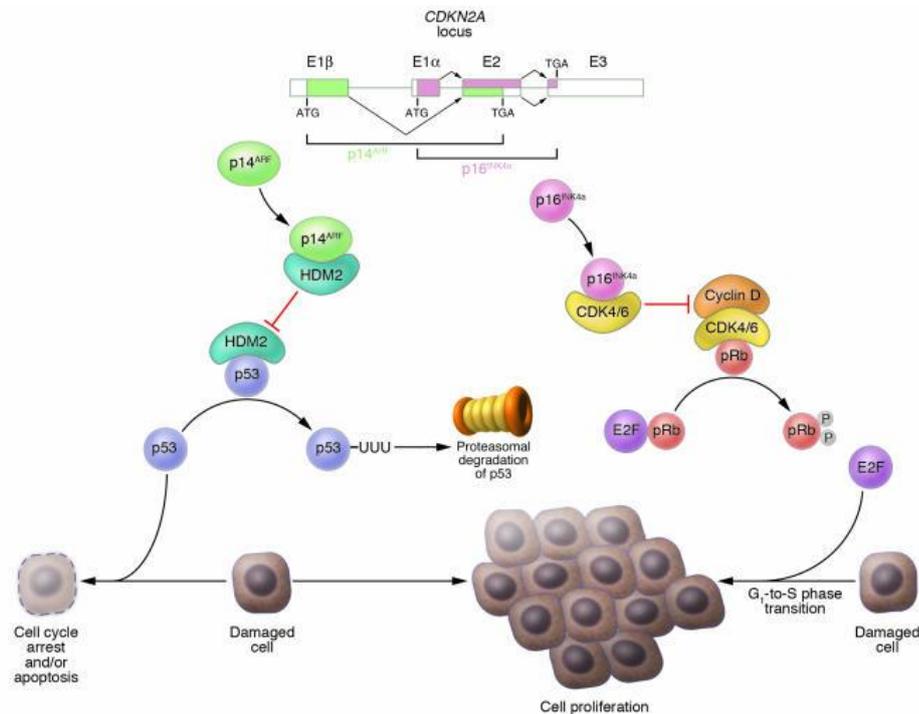


Figura 1. Produtos do gene CDKN2a interferindo na progressão do ciclo celular. (Fonte: Chudnovsky *et al.*, 2005)

3.3 EPIGENÉTICA E METILAÇÃO DO DNA NO CONTEXTO DO CÂNCER

Sabe-se que fatores ambientais são capazes de produzir mutações genéticas, e que estas podem, em algum momento, levar ao desenvolvimento do câncer, por sua capacidade de ativar ou silenciar certos genes. Além das mutações, os fatores ambientais são conhecidos também por produzirem modificações epigenéticas.

Eventos epigenéticos são alterações com caráter reversível que não provocam modificações na sequência do DNA, mas sim no fenótipo, exercendo assim, influência nos mecanismos de expressão gênica. A metilação é o evento epigenético mais frequente e trata-se de processo biológico extremamente importante, pois sua presença está relacionada ao silenciamento gênico. O estudo de hipermetilação fornece informações importantes para o entendimento da carcinogênese, assim como a avaliação do padrão de metilação pode ser utilizado como um biomarcador para diagnóstico, planejamento terapêutico e prognóstico de um indivíduo (COOMBES *et al.*, 2003; MA *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2016).

A metilação do DNA acontece pela adição do radical metil em citosinas, formando 5-metilcitosina (Figura 2). Apesar de poder ocorrer em qualquer posição do DNA, geralmente ocorre em citosinas precedidas de guanina (dinucleotídeos CpG ou ilhas CpG). Estas ilhas CpG são encontradas em abundância nas regiões promotoras dos genes (MCCABE *et al.*, 2009).

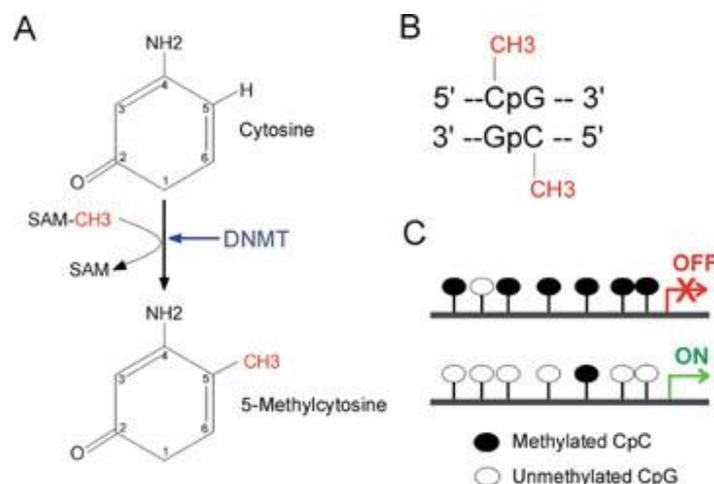


Figura 2. Mecanismos relacionados à metilação. Formação de 5-metilcitosina a partir da adição do radical metil pela DNMT que retira um radical metil da S-Adenosilmetionina (A); Representação dos radicais metil nas ilhas CpG (B); Hipermetilação de região promotora e silenciamento de genes (C) (Fonte: Collas *et al.*, 2007).

O grupamento metil é adicionado à citosina covalentemente pela família de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMT). Estas enzimas são divididas em duas categorias, de acordo com a sua função. A DNMT1 é uma metiltransferase de manutenção que garante a perpetuação de radicais metil previamente incorporados

no DNA durante o processo de replicação. Já as DNMT2, DNMT3A e DNMT3B são enzimas responsáveis pela metilação *de novo* que ocorre em citosinas que não apresentavam metilação prévia (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Uma alta taxa de citosinas metiladas, localizadas em ilhas CpG, é denominada de hipermetilação e, quando presentes nas regiões promotoras, podem levar ao silenciamento de genes importantes para a manutenção celular (KAGOHARA *et al.*, 2015). De forma geral, todos os tumores apresentam alguma forma de metilação, seja em genes supressores de tumor ou outros genes responsáveis pelo controle do ciclo celular. A hipermetilação destes genes então, é um mecanismo de extrema importância nos estudos de tumorigênese (KANETO *et al.*, 2001).

Assim, a investigação de biomarcadores epigenéticos como recursos para o estudo de dos tumores também se aplica ao câncer de boca, sendo importante instrumento auxiliar no diagnóstico e prognóstico (AL-KAABI *et al.*, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde (Processo 036/2010). Foram selecionados 115 pacientes atendidos nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC) e HUCAM, no período de 2010 a 2016 em Vitória, Espírito Santo. Foram incluídos neste estudo 55 participantes com diagnóstico conclusivo de CEO localizados na cavidade bucal de ambos os gêneros, de todos os grupos étnicos e faixa etária. Foram excluídos os participantes com outros tipos de tumor ou que já haviam iniciado tratamento anterior

O recrutamento foi realizado durante consulta médica no ato do diagnóstico, onde os participantes passaram concordaram com a pesquisa através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e passaram pela avaliação da equipe médica e entrevista. Dados clínicos sobre a localização da lesão primária (língua, gengiva, assoalho de boca, palato e área retromolar); tamanho da lesão primária e presença de metástase em linfonodos regionais, foram obtidos durante avaliação médica. Através da entrevista foram coletados dados do paciente referentes a idade, sexo, hábitos de consumo em quantidades e tempo de consumo de álcool e tabaco.

Após os três meses do término do tratamento de primeira linha os participantes foram acompanhados por um período mínimo de 24 meses. Uma nova entrevista foi realizada entre 6 e 18 meses desde a primeira consulta, caracterizando o seguimento 1 (F1); o segundo seguimento (F2) foi realizado 6 meses após F1, e o terceiro seguimento realizado 30 meses após a data do diagnóstico. Durante estes seguimentos, foram coletados dados referentes à progressão da doença, remissão, recidivas regionais e à distância e óbito a partir de novas avaliações médias e análises de prontuários.

As análises laboratoriais foram realizadas a partir de fragmentos de tumores primários obtidos durante a biópsia ou ressecção cirúrgica, realizadas com finalidade

diagnóstica ou terapêutica, respectivamente, e armazenados a -80°C no Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração de DNA do tecido tumoral congelado ($n = 70$) foi realizada utilizando a técnica de digestão com proteinase K e posterior extração com fenol/clorofórmio. O tecido tumoral foi fragmentado mecanicamente e posteriormente digerido pela adição de proteinase K 5mg/mL em banho-maria a 60°C por dois dias. O conteúdo intracelular foi separado por diferença de densidade utilizando centrifugações sucessivas a 14.000 rpm, até que todo o DNA fosse isolado das demais frações celulares. Após este processo, o DNA foi precipitado com acetato de amônia 10M e etanol absoluto, sendo formado um precipitado sólido que foi lavado com etanol 70%. O precipitado foi então ressuspensionado em tampão TrisEDTA 1X estéril. A qualidade e pureza do DNA foram verificadas por espectrofotometria em NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), sendo somente utilizadas aquelas amostras que apresentaram razão 260/280 entre 1,6 e 1,9. Para analisar a integridade do DNA obtido foi realizada eletroforese do DNA genômico e amplificação do gene da β -globina humana pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 2.

4.3 MODIFICAÇÃO DO DNA PELA TÉCNICA DO BISSULFITO DE SÓDIO

Um total de 55 mostras que apresentaram DNA íntegro e de boa qualidade foram submetidos à modificação pela técnica do bissulfito de sódio, utilizando o sistema de conversão Imprint DNA Modification Kit (SigmaAldrich, Saint Louis, MO, USA) , conforme instruções do fabricante, utilizando na reação uma quantidade de DNA de

500 ng. Durante o processo de modificação, as citosinas não-metiladas foram convertidas em uracilas, enquanto as citosinas com adição de radical metil não sofreram alterações.

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE ESPECÍFICA PARA METILAÇÃO (MSP)

O DNA modificado pela técnica do bissulfito de sódio foi amplificado através da técnica de MSP (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*), utilizando dois diferentes pares de oligonucleotídeos. O princípio do uso de dois diferentes pares de oligonucleotídeos nesta técnica é a amplificação distinta das sequências metiladas e não-metiladas com alta especificidade, de acordo com as características adquiridas pelos nucleotídeos após a modificação pelo bissulfito de sódio, pois as sequências metiladas mantêm as citosinas intactas, enquanto as não-metiladas convertem citosinas para uracilas. Os oligonucleotídeos foram desenhados e validados para o estudo da metilação da região promotora do gene CDKN2a conforme descrito por Herman *et al.* (1996) e estão representados na Tabela 2. O Fragmento gerado está na entrada a posição -80 e +70 na sequência de entrada no GenBank XM_011517676.2.

Como controle positivo da reação foram utilizadas amostras de DNA extraídos de sangue periférico para as sequências não-metiladas (U) e DNA obtido de tecido tumoral e posteriormente metilado enzimaticamente pela CpG Methyltransferase (M.Sssl) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para as amostras metiladas (M). Como controle negativo foi usada água ultrapura.

Para os oligonucleotídeos específicos para regiões metiladas foram usadas as seguintes condições: ativação da Taq DNA polimerase a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos com o DNA a 65°C por 30 segundos, extensão da dupla fita a 72°C por 30 segundos, e por fim, uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Para os oligonucleotídeos específicos para regiões não-metiladas, foram usadas as seguintes condições: ativação da polimerase a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos

com o DNA a 60°C por 30 segundos, extensão da dupla fita a 72°C por 30 segundos, e por fim, uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos gerados por essas duas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed® e posteriormente visualizados em fotodocumentador L-Pix (Loccus Biotecnologia, SP, Brasil).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados.

Técnica	Oligo	Sequência	Tamanho do fragmento
PCR beta-globina	<i>Forward</i>	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	509 pb
	<i>Reverse</i>	GAA AAC ATC AAG GGT CCC AT	
MSP e sequenciamento	<i>M forward</i>	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC	150 pb
	<i>M reverse</i>	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA	
	<i>U forward</i>	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT	151 pb
	<i>U reverse</i>	CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A	

M: Metilado, U: Não-metilado

4.5 SEQUENCIAMENTO

Para validar os resultados obtidos na MSP, os produtos de PCR das 20 amostras que apresentaram metilação no gene CDKN2A foram purificados utilizando ExoSAP-IT 28 PCR Clean-up Kit (GE Healthcare Life Sciences, Upsala, Sweden) e sequenciados em sequenciador automático utilizando BigDyer Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram submetidas à eletroforese capilar no ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todo o processo de sequenciamento foi realizado no Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

Para as análises foi utilizada a sequência de referência com entrada no GenBank XM_011517676.2. As amostras metiladas apresentaram no eletroferograma maior parte das citosinas intactas em comparação com a sequência de referência, enquanto

as não-metiladas apresentam timina (análogo de uracila) no lugar de citosinas. As análises das sequências geradas foram feitas utilizando o software MethTools 2.0 (Grunau *et al.*, 2001).

4.6 IMUNOHISTOQUÍMICA DE p16

Dos 55 pacientes selecionados para o estudo, foram obtidas 30 amostras de tecido tumoral incluído em parafina as quais foram utilizadas para a análise de expressão de p16 por imunohistoquímica (IHQ). Amostras de tecido tumoral fixado em formalina a 10% e posteriormente incluídos em parafina foram seccionadas com espessura de 3 µm. A secção contendo tecido tumoral foi colocada em lâmina previamente silanizada. Os espécimes foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol absoluto, 95% e 70%, e posteriormente lavadas em água destilada. Para recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em tampão citrato de sódio pH 6,0 sob pressão, à temperatura de 121°C por 3 minutos e em seguida resfriadas à temperatura ambiente. Após lavagem em água deionizada, procedeu-se à neutralização da peroxidase endógena, incubando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos. A seguir os espécimes foram lavados com tampão Tris-SDS (TBS) por 5 minutos e seguiu-se com o bloqueio de proteínas, por 5 minutos. Após lavagem com TBS por 5 minutos, as lâminas foram então incubadas a 4°C *overnight* com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-p16 humano (clone E6H4, CINtec p16INK4a Histology Kit, Ventana Medical Systems, USA) diluição 1:5. Após o período de incubação as lâminas foram lavadas com TBS, incubadas com o anticorpo secundário (Post Primary, Novolink™ – Novocastra™) por 30 minutos e lavadas novamente por 5 minutos. Aplicou-se em seguida o polímero Novolink (Leica, Wetzlar, Germany) e as lâminas foram incubadas novamente por 30 minutos, lavando-se com TBS por 5 minutos após esta etapa. Aplicação de reagente cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) foi realizada por 5 minutos. Por fim, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris (EasyPath®) e recobertas com lamínula e montadas utilizando-se meio de montagem (Entelan® - Merck Millipore). Controles

negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário. Amostras de carcinoma de células escamosas de orofaringe conhecidamente positivas para expressão de p16 foram utilizadas como controle positivo. Todas as amostras foram classificadas independentemente por dois patologistas e em caso de discordância, as lâminas foram revisadas e um consenso para a classificação foi obtido. O percentual de células marcadas foi determinado utilizando-se o H-Score (JORDAN et al., 2012). O H-score consiste em uma análise semi-quantitativa obtida pelo produto da intensidade de marcação (avaliadas em uma escala de 0 a 3) e a porcentagem de células tumorais coradas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Portanto, os valores para o H-Score variam de 0 a 300. Os valores com média abaixo de 60 foram considerados com baixa expressão da proteína, e valores maiores que este, alta expressão.

Cálculo utilizado para o H-Score:

$$HScore = [1 \times (\% \text{ células intensidade 1}) + 2 \times (\% \text{ células intensidade 2}) + 3 \times (\% \text{ células intensidade 3})]$$

Onde:

0 = ausência de imunomarcação

1 = imunomarcação de fraca intensidade

2 = imunomarcação de intensidade moderada

3 = imunomarcação de intensidade forte

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE SOBREVIDA

Um banco de dados foi criado para organizar todas as informações clínico-patológicas bem como os resultados obtidos nas análises laboratoriais. A análise estatística destes dados foi processada utilizando o software IBM SPSS v.23.0.

Associações entre as variáveis foi feita utilizando o teste U de Mann-Whitney e teste do qui-quadrado ou exato de Fisher, considerando significativo valor de $p \leq 0,05$.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank foi realizado para comparar as curvas geradas. Para análise da sobrevida global (SG) foram consideradas as datas do óbito e a duração da sobrevida total. Para avaliação da sobrevida livre de doença (SLD) foram consideradas a data da recorrência e a duração do período onde o paciente apresentou-se livre de doença.

Foram considerados “não censurados” para os cálculos da SG e SLD todos os casos em que ocorreu o evento de interesse, óbito ou recidiva, respectivamente. Os casos em que os eventos não ocorreram até a data da última informação obtida do acompanhamento foram classificados como “censurados”. As variáveis significativas obtidas pelo teste do Log-Rank foram inseridas no Modelo de Regressão de Cox para determinar a contribuição individual das covariáveis em relação à sobrevida. Foi utilizado o método stepwise backward Wald, o que permitiu detectar as variáveis mais associadas à sobrevida.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA E STATUS DE HIPERMETILAÇÃO

Tabela 3. Características demográficas e clínicas da população com carcinoma epidermóide oral analisada (n = 55).

Características	Frequência (n)	%
Sexo		
Masculino	41	74,5
Feminino	14	25,5
Idade		
≥ 60	27	49,1
< 60	28	50,9
Tabagismo^a		
Sim	43	82,7
Não	9	17,3
Consumo de álcool^a		
Sim	41	78,9
Não	11	21,2
Tamanho do Tumor		
T1/T2	31	56,4
T3/T4	24	43,6
Sítio anatômico		
Língua	30	54,5
Gengiva	4	7,3
Assoalho	15	27,3
Palato	5	9,1
Área Retromolar	1	1,8
Metástase Linfonodal		
N0	39	70,9
N+	16	29,1
Metástase à Distância		
M0	54	98,2
M1	1	1,8
Estádio clínico		
I/II	27	50,9
III/IV	26	49,1

^a 3 participantes sem informações sobre o hábito de consumo;

N0: Sem comprometimento linfonodal, N+: Comprometimento linfonodal positivo;

M0: Sem metástases a distância, M1: Metástase a distância positiva.

As características populacionais, assim como as informações sobre o consumo de tabaco e álcool e as características clínicas analisadas estão representadas na Tabela 3.

Na população analisada houve um predomínio de participantes do sexo masculino (74,5%). A idade média da população foi de 59,3 anos. A maioria dos participantes relataram o consumo de tabaco (82,7%) e de álcool (78,7%) durante a entrevista de recrutamento. A maior parte dos participantes foi diagnosticada com tumores de tamanho T1/T2 (56,4%), sem comprometimento linfonodal (70,9%) e apenas um indivíduo foi diagnosticado com metástase à distância. Entretanto, a distribuição dos casos de acordo com o estadiamento clínico inicial ou avançado foi homogênea.

Um total de 115 participantes que atenderam os critérios de inclusão e 70 apresentaram amostras de tecido tumoral congelado foram selecionados para o estudo.

Todas as 55 amostras de DNA mostraram boa qualidade e foram submetidas a MSP, sendo que 20 amostras (36,4%) apresentaram hipermetilação na região promotora do gene CDKN2a. Todas as amostras hipermetiladas foram submetidas ao sequenciamento direto. Um total de 30 amostras de tecido tumoral incluídas em parafina foram submetidas à imuno-histoquímica para avaliar a expressão de p16. A sequência dos experimentos está ilustrada na Figura 3.

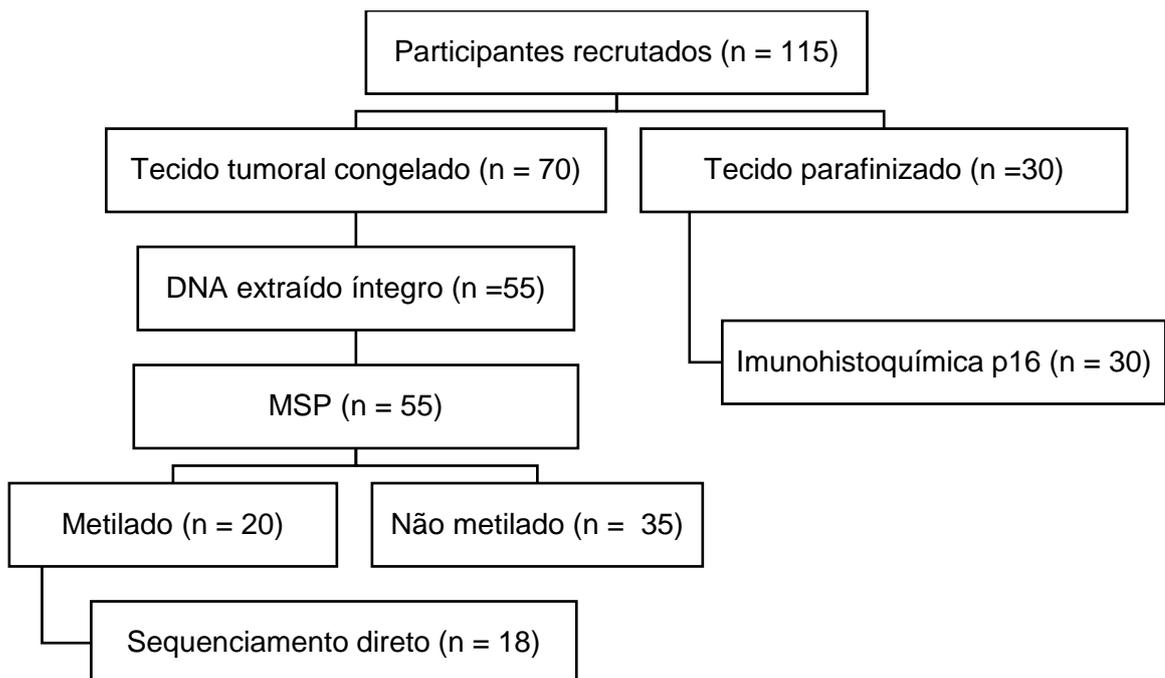


Figura 3. Organograma das etapas laboratoriais

O *status* de metilação da região promotora do gene CDKN2a (Tabela 4), que codifica a proteína p16, foi avaliado pela MSP e confirmado pelo sequenciamento direto de Sanger das amostras hipermetiladas identificadas pela MSP.

Tabela 4. *Status* de metilação do gene CDKN2a e variáveis clínico-patológicas (n = 55).

Variáveis	Hipermetilado n (%)	Não-Metilado n (%)	Valor de p
Sexo			
Masculino	11 (26,8%)	30 (73,2%)	0,015*
Feminino	9 (64,3%)	5 (35,7%)	
Idade			
≥ 60	8 (29,6%)	19 (70,4%)	0,230
< 60	12 (42,9%)	16 (57,1%)	
Idade			
≥ 45	5 (83,3%)	1 (16,7%)	0,020*
< 45	15 (30,6%)	34 (69,4%)	
Consumo de álcool			
Sim	11 (26,8%)	30 (73,2%)	0,029*
Não	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
Consumo de tabaco			
Sim	11 (25,6%)	32 (74,4%)	0,005*
Não	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
Consumo de álcool e tabaco			
Sim	10 (25,0%)	30 (75,0%)	0,011*
Não	8 (66,7%)	4 (33,3%)	
Tamanho do Tumor			
T1/T2	13 (41,9%)	18 (58,1%)	0,245
T3/T4	7 (29,2%)	17 (70,3%)	
Metástase Linfonodal			
Positivo	3 (18,8%)	13 (81,3%)	0,074
Negativo	17 (43,6%)	22 (56,4%)	
Estádio			
I/II	12 (44,4%)	15 (55,6%)	0,088
III/IV	6 (23,1%)	20 (76,9%)	

* Teste Exato de Fisher ($p < 0,05$)

A idade é um fator importante em estudos de epigenética pois faixas etárias mais avançadas podem apresentar maior frequência de metilação em genes reguladores do ciclo celular, como é o caso do CDKN2a, em decorrência da exposição ambiental ao longo da vida (RODENHISER; MANN, 2006). No entanto, não foi observada diferença significativa entre a hipermetilação do gene e a idade da população analisada utilizando grupos considerando a média de idade. Este fato pode estar relacionado à homogeneidade de faixa etária observada na população, que possui idade variando entre 36 a 84 anos, entretanto a maioria dos casos está em idade em média 59,3 anos. Segundo Dugue *et al.* (2017) o acúmulo de fatores de risco e a influência do ambiente podem estar relacionados com o desenvolvimento da doença em idade mais avançada e o aumento da metilação gênica com o passar do anos. Pela média de idade da população deste estudo ter sido de 59,3 anos, uma idade ainda não tão avançadas, poderia explicar a falta de relação direta com determinado fator de risco. No estudo de Ogi *et al.* (2002) participantes com grupos de idades com quantidades iguais mostrou que idades menores possuem relação significativa com a hipermetilação do CDKN2a, que pode ser explicado pelo fato de que em idades mais baixas o índice de hipermetilação global tende a ser menor em condições sadias, tendo maior participação na carcinogênese de indivíduos mais novos.

Participantes do sexo feminino apresentaram maior frequência de hipermetilação na região promotora do gene CDKN2a ($p = 0,015$), fato este que não é comumente relatado em CEO na literatura. Contudo a prevalência da hipermetilação do gene pode ser variável no sexo de acordo com a população assim como a quantidade de mulheres acometidas pela doença pode ser variável (DON *et al.*, 2014).

A exposição aos fatores de risco mostrou ser um evento relacionado à hipermetilação do gene CDKN2a, tanto de forma independente para o uso do tabaco ($p = 0,005$) e consumo do álcool ($p = 0,029$), quanto para o uso concomitante destes dois agentes ($p = 0,011$). Entretanto, o número de participantes expostos aos fatores de riscos é consideravelmente maior do que o número de não expostos, desta maneira, análises com o objetivo de elucidar o perfil de participantes expostos aos fatores ambientais de risco foram feitas adiante.

Sabe-se que o consumo de álcool e tabaco são potenciais fatores de risco para o desenvolvimento dos cânceres de cabeça e pescoço e pulmão. Acredita-se que a hipermetilação de genes reguladores do ciclo celular poderia desempenhar papel

importante neste processo (Al *et al.*, 2003). Contudo, nossos resultados não nos permitiram estabelecer associações claras entre o tabagismo, etilismo e o perfil de metilação do gene CDKN2a.

Outros estudos também não encontraram evidências de que o álcool e o tabaco possuem papel determinante no perfil de metilação e nem de que forma isso ocorreria (Al *et al.*, 2003; MISAWA *et al.*, 2008; AL-KAABI *et al.*, 2014). Apesar de observarmos uma prevalência de 38% de hipermetilação no nosso grupo amostral, o número de participantes fumantes e alcoolistas foi baixo neste grupo, sugerindo que outros mecanismos poderiam estar envolvidos no silenciamento deste gene por hipermetilação, bem como diferentes agentes causais. Além disso, por bloquear a progressão do ciclo celular na transição entre as fases G1/S, aparentemente o silenciamento deste gene ocorre nos estágios iniciais da doença (WIJETUNGA *et al.*, 2016)

Com o intuito de esclarecer um pouco mais o papel do tabaco e do álcool na carcinogênese do CEO por meio do mecanismo de hipermetilação do gene CDKN2a, foram analisadas a duração e a quantidade de tabaco e de álcool ingeridos pela população estudada (Tabela 5). Os valores para a quantidade de álcool ingerida foram baseados nas informações da *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA).

Considerando o tabagismo, foram analisados o tempo em anos do consumo de tabaco e a quantidade de cigarros por dia consumidos pelo indivíduo. O tempo médio de exposição da população ao tabagismo foi de 39,3 anos com média de consumo de 17,16 cigarros por dia. Apesar de serem valores altos, nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos analisados.

Tabela 5. Associação entre quantidade consumida, tempo de exposição aos fatores de risco tabaco e álcool e o perfil de metilação do gene CDKN2a.

Variáveis	Média	Hipermetilado	Não-Metilado	p valor
Tempo de tabagismo (anos)	39,30	18,45	23,22	0,288
Quantidade de cigarros (cigarros/dia)	17,16	22,36	18,85	0,46
Tempo de ingestão de álcool (anos)	36,46	19,27	21,63	0,591
Quantidade de álcool ingerida (g/semana)	381,7	21,28	31,84	0,017*

* Teste U de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Quanto ao consumo do álcool, foi considerado o tempo em anos de ingestão de álcool e a quantidade em gramas ingeridas de álcool por semana. O tempo médio de consumo de bebida alcoólica foi de 36,46 anos, e a quantidade média ingerida de álcool semanalmente pela população foi de 381,78 gramas. Nossos resultados mostraram que participantes que consumiram maior quantidade de álcool apresentaram maior frequência de hipermetilação ($p = 0,017$).

Segundo (PIERINI *et al.*, 2013), os estudos relacionados com os fatores de risco tabaco e álcool apresentaram associação somente com a quantidade de cigarros consumida, e não houve associação significativa com tempo de tabagismo ou quantidade de álcool ingerida. No entanto, estes dados são ainda escassos na literatura.

Em nosso estudo, observamos que 36,4% das amostras apresentavam hipermetilação no gene CDKN2a. Frequências de metilação semelhantes em cânceres de cabeça e pescoço já foram relatados em outros estudos variando entre 26,4% e 44% (Al *et al.*, 2003; MISAWA *et al.*, 2008; MIELCAREK-KUCHTA *et al.*, 2014). Entretanto, alguns estudos apresentaram frequência maior deste evento epigenético no gene CDKN2a, entre 63% em cavidade oral e 78% de metilação em cavidade oral e outros sítios de cabeça e pescoço (CALMON *et al.*, 2007; KHOR *et al.*, 2013). Em uma metanálise feita por Don *et al.* (2014) sobre metilação do CDKN2a e outros genes que participam da carcinogênese, demonstrou que a prevalência da metilação de CDKN2a é muito variável em diversos estudos. Essa variação pode ser explicada pela diferença metodológica aplicada as quais podem ter diferentes sensibilidades, causadas por exemplo, pela diferença dos sítios de ligação dos

oligonucleotídeos adotados em cada estudo (PIERINI *et al.*, 2013). A discrepância de resultados pode ainda ser devido ao tamanho da população amostral, desenho do estudo, e o local onde os participantes foram recrutados (FERLAZZO *et al.*, 2017).

Em tecidos normais, o perfil de metilação é bem estabelecido e a taxa de hipermetilação é nula (DE FREITAS CORDEIRO-SILVA *et al.*, 2011; DON *et al.*, 2014; SUSHMA *et al.*, 2016; FERLAZZO *et al.*, 2017). Nossos resultados mostraram frequência elevada de hipermetilação em tumores, mas não foi observada diferença significativa entre o perfil de metilação do gene CDKN2a e o tamanho do tumor ou estágio da doença, mesmo com alta frequência de ilhas CpG hipermetiladas em tumores menores (T1/T2) e em estádios iniciais da doença (I/II).

5.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOSINAS METILADAS

As amostras dos participantes que apresentaram hipermetilação do gene CDKN2a na MSP, foram submetidas ao sequenciamento direto do produto de PCR para confirmação do status de metilação (Figura 4). Através do sequenciamento direto, é possível identificar a posição das ilhas CpG metiladas.

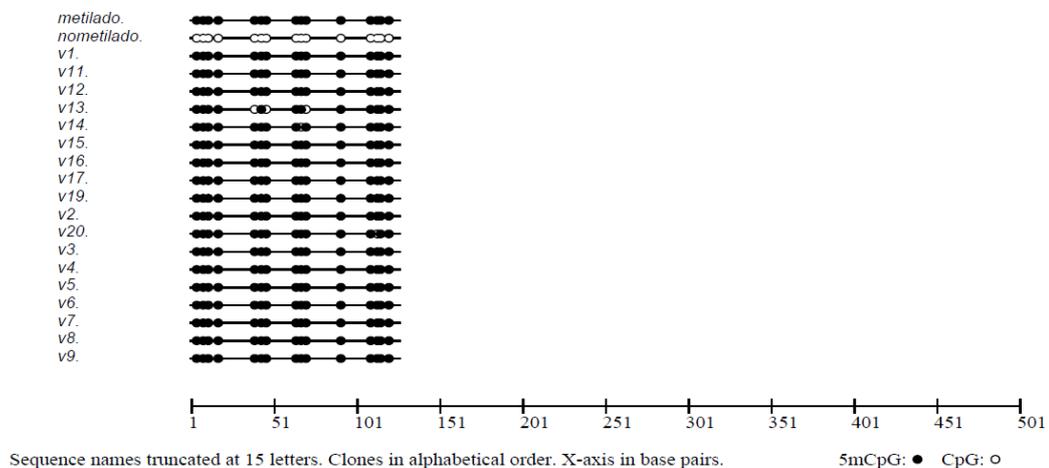


Figura 4. Representação gráfica das ilhas CpG hipermetiladas e não metiladas. Amostras denominadas v1 a v20.

Das 20 amostras que apresentaram fragmentos hipermetilados, 18 produziram sequências de qualidade para serem submetidas às análises de metilação com o software MethTools 2.0. Foram sequenciados também controles de reação que apresentavam 100% e 0% de citosinas metiladas.

Na Figura 4, estão representadas graficamente as ilhas CpG, em preto, com presença de 5-metilcitosina e, em branco, a presença de citosinas intactas. O controle positivo “hipermetilado” produziu uma sequência com 100% de metilação dos dinucleotídeos CpG, enquanto o controle não-metilado apresentou 0% de citosinas metiladas. As amostras foram denominadas por v1 a v20. Todas as amostras analisadas mostraram grande parte das ilhas CpG metiladas, confirmando assim, o resultado obtido na MSP.

Tabela 6. Distribuição de citosinas e metilcitosinas nas ilhas CpG

Sequência	5mC	C	5mCpG	CpG	% 5mCpG
Metilado	17	16	15	0	100
Não metilado	0	33	0	15	0
v1.	17	16	15	0	100
v11.	16	17	15	0	100
v12.	16	17	15	0	100
v13.	13	20	12	3	80
v14.	15	19	14	1	93,3
v15.	17	16	15	0	100
v16.	17	16	15	0	100
v17.	19	14	15	0	100
v19.	19	14	15	0	100
v2.	17	16	15	0	100
v20.	16	17	14	1	93,3
v3.	17	16	15	0	100
v4.	18	15	15	0	100
v5.	18	15	15	0	100
v6.	16	17	15	0	100
v7.	16	17	15	0	100
v8.	16	17	15	0	100
v9.	16	17	15	0	100

encontrado em células tronco embrionárias, e desaparecem a partir da diferenciação desta célula. Supõe-se que a presença de metilação de conteúdo não-CG de genes relacionados a diferenciação e proliferação celular pode induzir a célula a um estado de pluripotência (Lister *et al.*, 2009), o qual pode ser determinante para aumentar a proliferação e a manutenção do estado indiferenciado das células tumorais (COLLAS *et al.*, 2007).

A revisão de literatura de Patil *et al.* (2014) mostra que pesquisas com *whole genome bisulphite sequencing* tem demonstrado hipermetilação de conteúdo não-CG em quantidades significantes em diversos tecidos e células, sobretudo em tecido nervoso, muscular, e gametas.

Apesar de não ser bem elucidado, autores concordam que o metilação fora das ilhas CpG pode ter papel fundamental na tumorigênese (HAN *et al.*, 2011; TRUONG *et al.*, 2013; PATIL *et al.*, 2014; HE; ECKER, 2015), assim como desempenha papel em outras doenças já previamente estudadas como diabetes e obesidade, e também no desenvolvimento cerebral (HE; ECKER, 2015).

Excetuando um único estudo de câncer de próstata, onde não foi encontrada correlação do conteúdo não-CG com a doença (TRUONG *et al.*, 2013) não foi reportado na literatura estudos que buscam verifica a influência deste evento no desenvolvimento do CEO, bem como outros tipos de tumores.

5.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p16

Análise da expressão da proteína p16 utilizando o método de imunohistoquímica foi realizada em amostras de tecido tumoral parafinizado (n = 30), com apenas 23,33% (n = 7) apresentando alta expressão da proteína. Na figura 6 pode ser observado o resultado ilustrativo da expressão de p16. No estudo de Gonzales-Moles *et al.* (2002) 32% dos casos apresentaram ausência da expressão de p16, enquanto 47% apresentaram baixa expressão. Isso corrobora com nossos resultados que mostram um grande número de casos de CEO com baixa expressão da proteína p16.

Além disso, neste estudo não observamos correlação entre a expressão da proteína e sobrevida dos pacientes.

Destes, a maior parte das amostras, tanto metiladas quanto não metiladas, apresentaram baixa expressão da proteína p16, (Tabela 7).

Os resultados da associação entre a expressão de p16 e o perfil de metilação do gene CDKN2a estão descritos na Tabela 7.

Tabela 6. Associação entre a o perfil de metilação do gene CDKN2a e a expressão de p16 (n = 30).

Expressão de p16	Hipermetilado n (%)	Não metilado n (%)	Valor de p
Alta	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,297
Baixa	8 (34,8%)	15 (65,2%)	

Teste exato de Fisher (p<0,05)

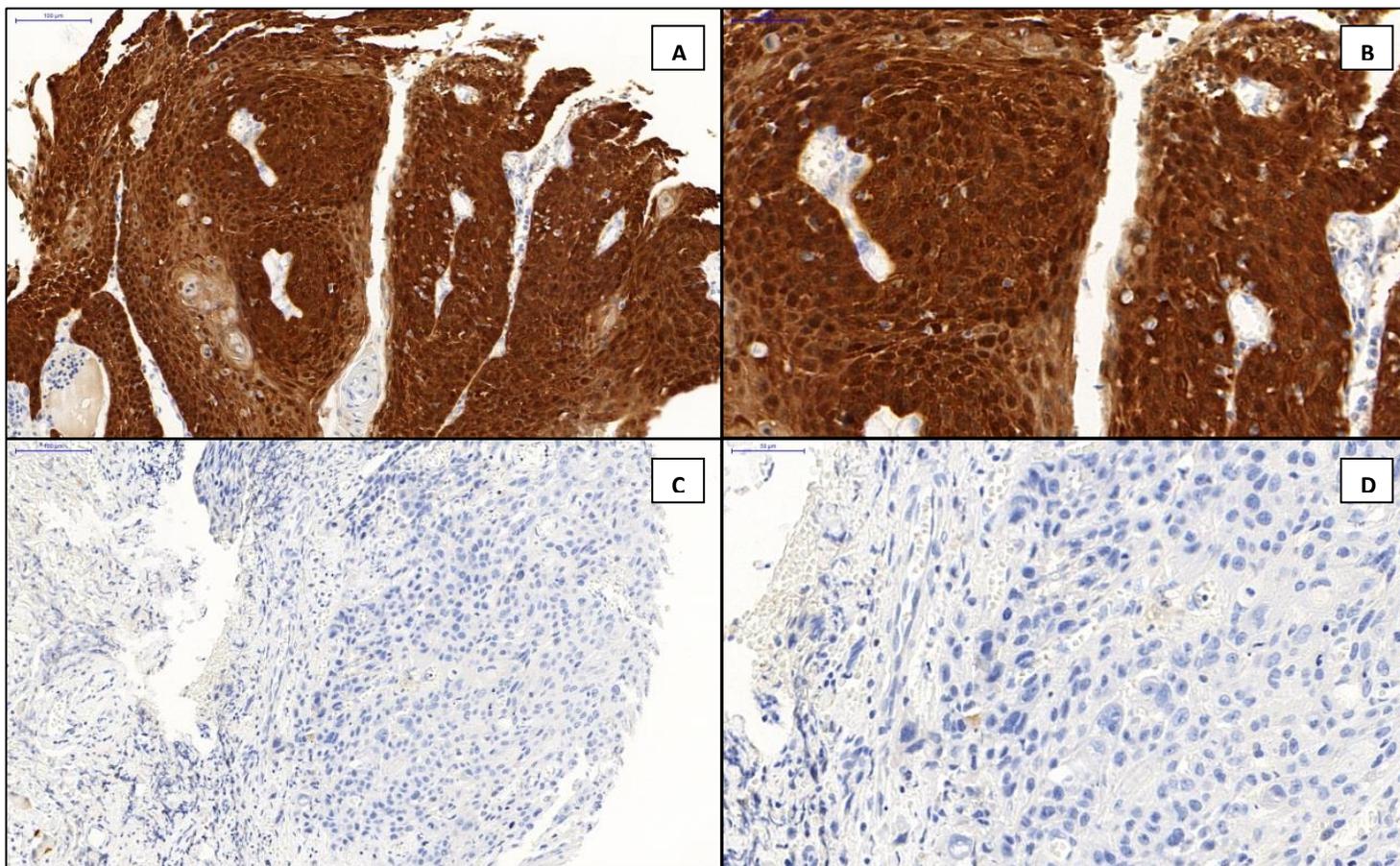


Figura 6. Fotomicrografia representativa da expressão de p16 por imunohistoquímica. **(A, B)** CEO com intensa expressão de p16; **(C, D)** CEO com ausência de expressão de p16. Aumento de x200 (A, C) e x400 (B, D).

Das 30 amostras analisadas para a expressão da proteína p16, um total de 7 (23,33%) participantes apresentaram alta expressão, enquanto 23 (76,33%) participantes apresentaram baixa expressão da proteína. Destes, a maior parte das amostras, tanto metiladas quanto não metiladas, apresentaram baixa expressão da proteína p16, (Tabela 7). Não foram encontradas neste estudo e também em outros estudos publicados evidências de associação entre o status de metilação do CDKN2a e a expressão da proteína p16 (Al *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2016). Além disso, Zhao *et al.* (2016) sugere que a hipermetilação pode estar associada a outros eventos genéticos como a mutação, desta forma haveriam outros mecanismos os quais a hipermetilação participaria do silenciamento de genes.

No estudo de Gonzales-Moles *et al.* (2002) 32% dos casos apresentaram ausência da expressão de p16, enquanto 47% apresentaram baixa expressão. Isso corrobora com nossos resultados mostrando que a maior parte dos casos de carcinoma epidermóide oral apresentam baixa expressão de p16. Além disso, este estudo não encontrou correlação entre a expressão da proteína, os dados clínico-patológicos analisados e a sobrevida dos pacientes.

No entanto, o trabalho de Liu *et al.* (2015) mostrou valores significativos entre a metilação e a expressão de p16 em lesões displásicas sugerindo assim que a hipermetilação de CDKN2a e a expressão de p16 podem ter um potencial preditivo maior que potencial prognóstico, sobretudo por estar envolvido nas etapas iniciais da tumorigênese e regulação do ciclo celular. O estudo de Alves *et al.* (2016) com indução da carcinogênese em ratos sustenta esse argumento, onde houve baixa positividade da expressão de p16, e sugere que a inativação do gene pode ocorrer em estádios iniciais da carcinogênese oral.

5.4 AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA

Os dados referentes a resposta do tratamento estão descritos na Tabela 8. Dentre os pacientes selecionados para o estudo, 51 tinham informações referente a estratégia de tratamento adotada.

Para avaliar o potencial prognóstico do *status* de metilação do gene CDKN2a, os dados obtidos foram correlacionados com a resposta ao tratamento, utilizando como

parâmetros os dados de remissão, recidiva e óbito dos pacientes, bem como considerando a modalidade terapêutica instituída (Tabela 8). As modalidades terapêuticas foram agrupadas em 3 grupos: cirurgia exclusiva; cirurgia e radioterapia adjuvante; radioquimioterapia ou radioterapia exclusiva.

Tabela 7. Resposta ao tratamento em relação com o perfil de metilação do gene CDKN2a (n = 51)

Modalidade terapêutica	Hipermetilado			Valor de p
	Óbito	Recidiva	Resposta completa	
Cirurgia exclusiva	3	2	7	0,253
Cirurgia e radioterapia adjuvante	0	0	2	
Radioterapia exclusiva ou radioquimioterapia	2	1	0	
	Não-metilado			Valor de p
	Óbito	Recidiva	Resposta completa	
Cirurgia exclusiva	5	2	10	0,010*
Cirurgia e radioterapia adjuvante	4	1	2	
Radioterapia exclusiva ou Radioquimioterapia	10	0	0	

*Teste do qui-quadrado ($p < 0,05$)

Analisando o grupo de apresentou hipermetilação, não foi observada diferença significativa entre as modalidades terapêuticas instituídas e o desfecho, em relação ao perfil de metilação do gene CDKN2a para o grupo hipermetilado. Contudo, o grupo de amostras não metiladas obteve maior número de resposta completa quando os participantes foram submetidos à cirurgia exclusiva, enquanto os pacientes que foram submetidos à radioquimioterapia tiveram maior número de evolução para o óbito. Sendo que a resposta completa em pacientes submetidos a cirurgia já é um fato esperado pois o tratamento de escolha para tumores menores e estádios iniciais é a cirurgia (NANDAKUMAR, 2016).

Avaliando os dados de sobrevida dos participantes em um tempo médio de 24 meses (Figuras 7 e 8), foi identificado que as variáveis de prognóstico: tamanho de tumor (T3/T4), presença de metástase linfonodal e estágio mais avançado da doença (III/IV) apresentam menor sobrevida global. A modalidade terapêutica também influenciou a taxa de sobrevida, sendo que a radioterapia exclusiva e a radioquimioterapia mostraram maior associação com o óbito. Já o perfil de metilação do gene CDKN2a não se mostrou ser um marcador de sobrevida na população analisada neste estudo. A associação do perfil de metilação com as variáveis clínicas avaliadas também não se mostrou útil para a análise de prognóstico desta população.

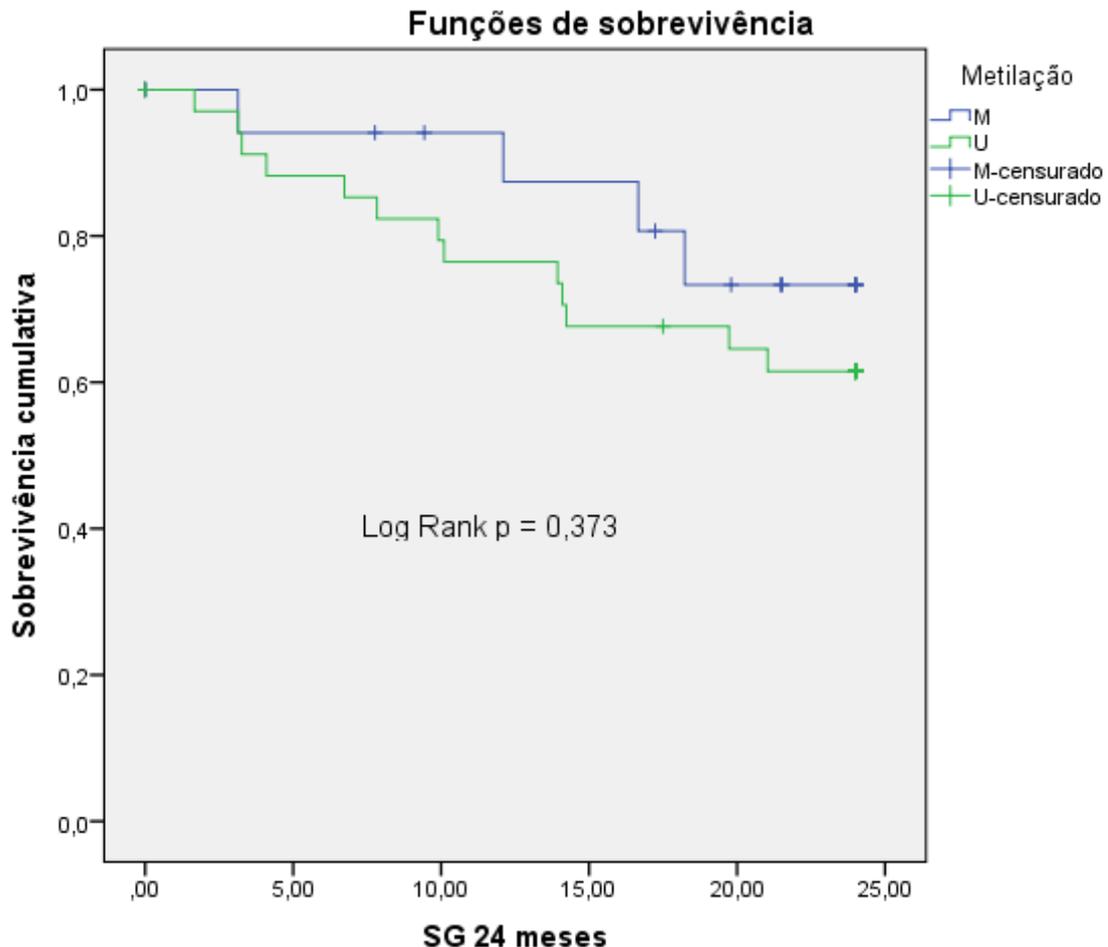


Figura 7. Sobrevida Global segundo perfil de hipermetilação. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam os dados censurados.

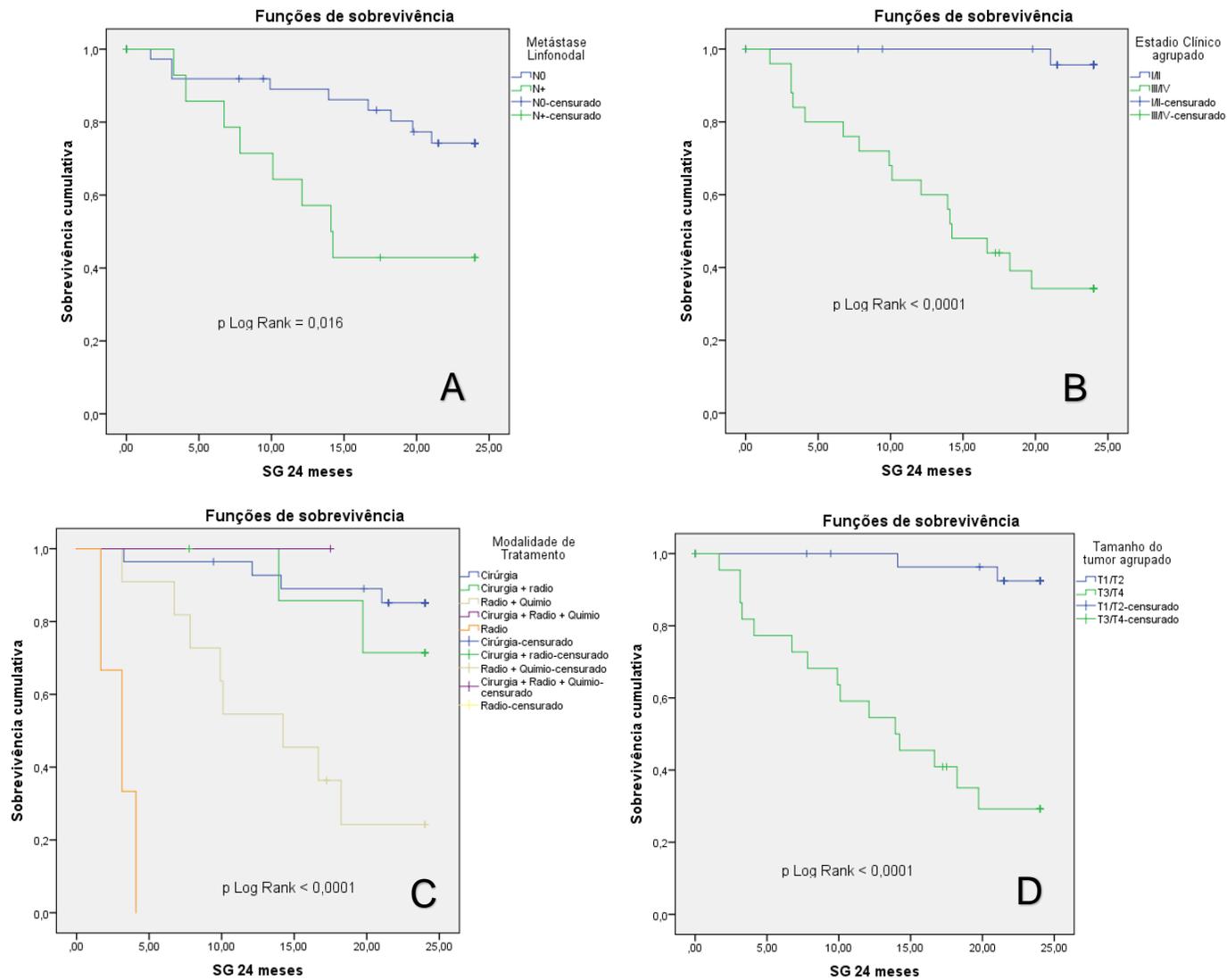


Figura 8 -Sobrevida Global segundo comprometimento linfonoda (A), estágio clínico (B), modalidade de tratamento (C) e tamanho do Tumor (D). Probabilidade de sobrevivida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam os dados censurado.

Para analisar a influência das covariáveis nas curvas de sobrevida, foi utilizada a Regressão Multivariada de Cox. Apesar de as variáveis tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, estadiamento clínico e modalidade terapêutica apresentarem valor prognóstico nos gráficos de sobrevida individualmente, não foi observada diferença estatística entre as covariáveis estudadas (Tabela 9).

Tabela 8. Modelo de Regressão Multivariada de Cox para Sobrevida Global

Covariáveis	Risco Relativo	IC (95%)	Valor de p
Tamanho do Tumor	2,323	0,284 – 19,004	0,432
Metástase Linfonodal	0,748	0,273 – 2,055	0,574
Estadiamento	7,991	0,570 – 112,005	0,123
Modalidade terapêutica	1,669	0,905 – 3,079	0,101

A sobrevida livre de doença (SLD) foi analisada utilizando o tempo médio de 24 meses (Figuras 9 e 10). Não foram observadas diferenças significantes entre as variáveis tamanho do tumor, acometimento linfonodal, estágio clínico e modalidade de tratamento analisadas e a SLD. O perfil de metilação, do gene CDKN2a também não mostrou associação significativa com a SLD.

Nos resultados obtidos neste estudo somente as variáveis isoladas, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, estadiamento clínico, obtiveram valores estatisticamente significantes no modelo de sobrevivência de Kaplan-Meier, para a sobrevida global. Nas análises de sobrevida livre de doença, nenhuma das variáveis analisadas foram estatisticamente significantes.

Segundo Nandakumar (2016), pacientes com tumores iniciais (T1/T2) submetidos à cirurgia exclusiva apresentaram melhor sobrevida global, seguidos daqueles submetidos à radioterapia com ou sem quimioterapia associada.

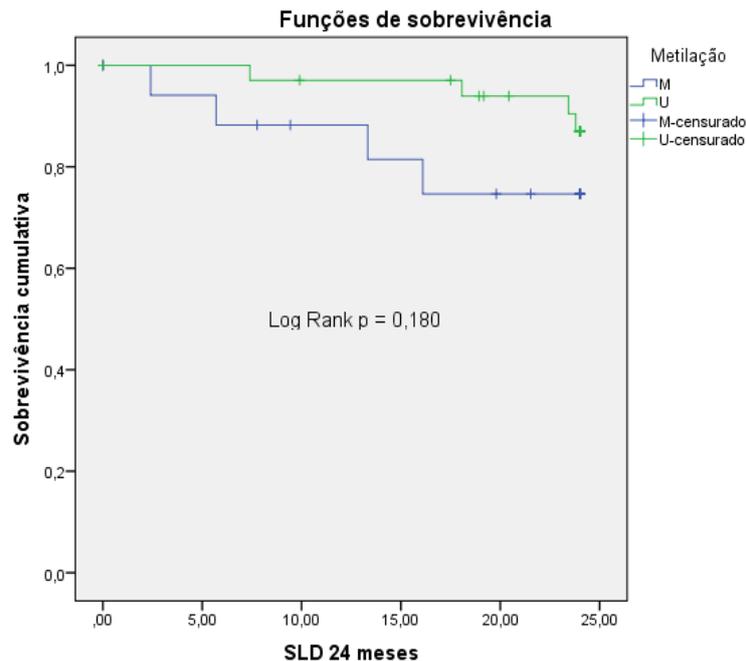


Figura 9. Sobrevida Livre de Doença segundo perfil de hipermetilação. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam os dados censurados.

Em nosso estudo, o perfil de metilação do gene CDKN2a não mostrou ser um bom marcador de prognóstico, quando analisamos sobrevida global e sobrevida livre de doença. Os trabalhos de Mielcarek-Kuchta *et al.* (2014) e Misawa *et al.* (2016) também mostraram não haver correlação entre estas variáveis e o perfil de metilação do gene CDKN2a. No entanto, os participantes cujas amostras apresentaram hipermetilação no gene que codifica a proteína p16, tiveram uma sobrevida melhor do que os não-metilados.

Alguns estudos sugerem que a melhor sobrevida relacionada à hipermetilação do CDKN2a pode estar ligada com mutações no gene TP53, que pode causar um efeito protetor. Os mecanismos envolvidos nesse efeito e a relação entre a hipermetilação do gene CDKN2a e mutações no TP53 ainda não são claramente elucidados (ROH *et al.*, 2013; MIELCAREK-KUCHTA *et al.*, 2014), sugerindo que mais estudos buscando explicar o mecanismo que relaciona a hipermetilação do CDKN2a e o TP53 podem ser úteis para melhor compreender estes eventos.

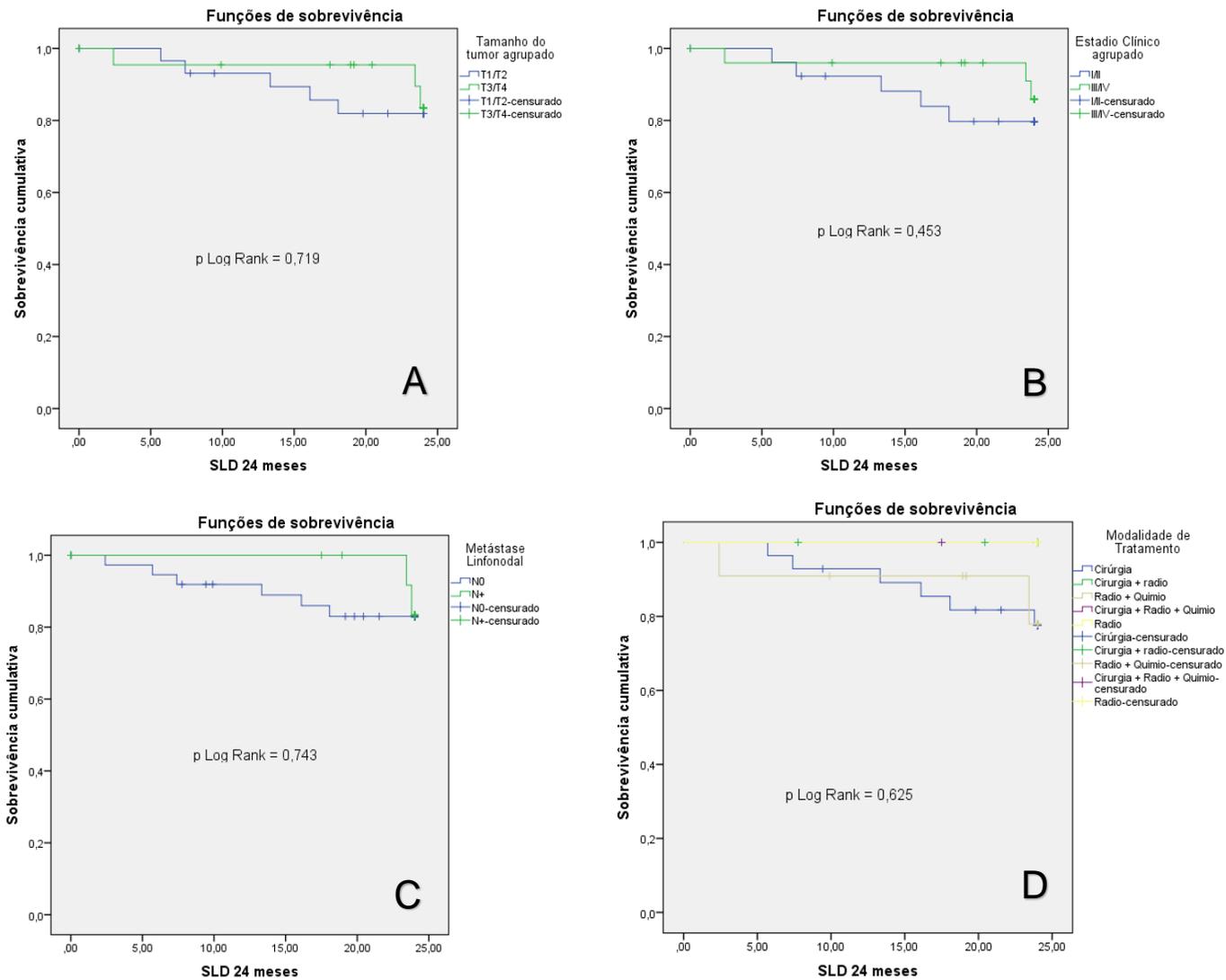


Figura 10 - Sobrevida Livre de Doença segundo tamanho do tumor (A), estágio clínico (B), comprometimento linfonodal (C) e modalidade de tratamento (D). Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam os dados censurados.

6 CONCLUSÃO

A frequência de hipermetilação do gene CDKN2a, que codifica a proteína p16, se manteve dentro do esperado em relação aos resultados de outros estudos, e foi alta neste estudo em relação a tecidos normais encontrados na literatura, evidenciando o papel deste evento epigenético no silenciamento gênico.

Adicionalmente, as amostras de CEO que apresentaram hipermetilação do gene CDKN2a, apresentaram no sequenciamento alto índice de citosinas metiladas, aproximando-se de 100%, e alto padrão de metilação em conteúdo não-CG. Estes dados, em associação com a alta frequência de metilação observada, sugerem que a importância deste evento nas fases iniciais da carcinogênese do CEO, indicando que a hipermetilação pode ter um maior potencial preditivo do que um como biomarcador de prognóstico.

O perfil de metilação do gene CDKN2a não mostrou associação significativa com as características clínico-patológicas, exposição aos fatores de risco e indicadores de prognóstico analisados, sugerindo que a hipermetilação do gene CDKN2a não é um bom indicador de prognóstico.

Não houve associação significativa entre a hipermetilação do gene CDKN2a e a expressão da proteína p16, sugerindo que outros mecanismos de silenciamento gênico possam estar envolvidos na baixa expressão proteica observada.

REFERÊNCIAS

Al, L.*et al.* The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. **Mod Pathol**, v. 16, n. 9, p. 944-50, Sep 2003.

AL-KAABI, A.*et al.* p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. **Dis Markers**, v. 2014, p. 260549, 2014.

ALVES, A. V.*et al.* Expression of Ki-67 and P16 INK4a in chemically-induced perioral squamous cell carcinomas in mice. **Rev Col Bras Cir**, v. 43, n. 2, p. 72-9, Mar-Apr 2016.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396-8, May 24 2007.

BRENER, Sylvie*et al.* Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.

CALMON, M. F.*et al.* Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 173, n. 1, p. 31-7, Feb 2007.

CHUDNOVSKY, Yakov; KHAVARI, Paul A.; ADAMS, Amy E. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 4, p. 813-824, 2005.

CODY, D. T.*et al.* Differential DNA methylation of the p16 INK4A/CDKN2A promoter in human oral cancer cells and normal human oral keratinocytes. **Oral Oncology**, v. 35, n. 5, p. 516-522, 1999.

COLLAS, P.; NOER, A.; TIMOSKAINEN, S. Programming the genome in embryonic and somatic stem cells. **J Cell Mol Med**, v. 11, n. 4, p. 602-20, Jul-Aug 2007.

COOMBES, M. M.*et al.* Resetting the histone code at CDKN2A in HNSCC by inhibition of DNA methylation. **Oncogene**, v. 22, n. 55, p. 8902-11, Dec 04 2003.

DE FREITAS CORDEIRO-SILVA, M.*et al.* Methylation analysis of cancer-related genes in non-neoplastic cells from patients with oral squamous cell carcinoma. **Mol Biol Rep**, v. 38, n. 8, p. 5435-41, Nov 2011.

DON, K. R.*et al.* Promoter hypermethylation patterns of P16, DAPK and MGMT in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 6, p. 797-805, Nov-Dec 2014.

DUGUE, P. A.*et al.* Association of DNA Methylation-Based Biological Age with Health Risk Factors, and Overall and Cause-Specific Mortality. **Am J Epidemiol**, Aug 17 2017.

FERLAY, J.*et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 1 2015.

FERLAZZO, N.*et al.* Influence of MTHFR Genetic Background on p16 and MGMT Methylation in Oral Squamous Cell Cancer. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 4, Mar 29 2017.

GONZALES-MOLES, M. A.*et al.* p16 Expression in squamous carcinomas of the tongue. **Onkologie**, v. 25, n. 5, p. 433-6, Oct 2002.

GRUNAU, C.; CLARK2, S.J.; ROSENTHAL, A. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 13, 2001.

HAN, H.*et al.* DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 22, p. 4299-310, Nov 15 2011.

HE, Y.; ECKER, J. R. Non-CG Methylation in the Human Genome. **Annu Rev Genomics Hum Genet**, v. 16, p. 55-77, 2015.

HERMAN, James G.*et al.* Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**: Ministério da Saúde: 122 p. 2015.

KAGOHARA, L. T.*et al.* Global and gene-specific DNA methylation pattern discriminates cholecystitis from gallbladder cancer patients in Chile. **Future Oncol**, v. 11, n. 2, p. 233-49, 2015.

KANETO, H.*et al.* Detection of hypermethylation of the p16(INK4A) gene promoter in chronic hepatitis and cirrhosis associated with hepatitis B or C virus. **Gut**, v. 48, n. 3, p. 372-7, Mar 2001.

KHOR, Goot Heahet *et al.* DNA Methylation Profiling Revealed Promoter Hypermethylation-induced Silencing of p16, DDAH2 and DUSP1 in Primary Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, n. 12, p. 1727-1739, 2013.

LEE, S. Y.*et al.* Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n. 7, p. 678-83, Jul 2010.

LI, R. N.*et al.* Promoter methylation status of the tumor suppressor genes p16 and cadherin 1 in cervical intraepithelial neoplasia. **Oncol Lett**, v. 13, n. 6, p. 4397-4401, Jun 2017.

LIGGETT, William H.; SIDRANSKY, David. Role of the p16 Tumor Suppressor Gene in Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 3, p. 1197-1206, 1998.

LISTER, Ryan *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315-322, 2009.

LIU, H.*et al.* P16 Methylation as an Early Predictor for Cancer Development From Oral Epithelial Dysplasia: A Double-blind Multicentre Prospective Study. **EBioMedicine**, v. 2, n. 5, p. 432-7, May 2015.

LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer Res**, v. 68, n. 17, p. 6863-72, Sep 01 2008.

MA, Y.; WANG, X.; JIN, H. Methylated DNA and microRNA in body fluids as biomarkers for cancer detection. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 5, p. 10307-31, May 16 2013.

MCCABE, M. T.; BRANDES, J. C.; VERTINO, P. M. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 12, p. 3927-37, Jun 15 2009.

MIELCAREK-KUCHTA, D.*et al.* Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. **Tumour Biol**, v. 35, n. 8, p. 7441-9, Aug 2014.

MISAWA, K.*et al.* Epigenetic inactivation of galanin receptor 1 in head and neck cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 23, p. 7604-13, Dec 01 2008.

MISAWA, Kiyoshiet *al.* Prognostic value of aberrant promoter hypermethylation of tumor-related genes in early-stage head and neck cancer. **Oncotarget**, n. 1-12, 2016.

NANDAKUMAR, Ambakumar. Survival in Head and Neck Cancers - Results of A Multi-Institution Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 4, p. 1745-1754, 2016.

OGI, Kazuhiro *et al.* Aberrant Methylation of Multiple Genes and Clinicopathological Features in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 10, p. 3164-3171, 2002.

OLIVEIRA, Naila Fracis Paulo de. Alterações no Epigenoma e o Hábito de Fumar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 101-106, 2011.

OLIVEIRA, Naila Francis Paulo de *et al.* Metilação de DNA e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologi**, v. 56, n. 4, p. 493-499, 2010.

PATIL, V.; WARD, R. L.; HESSON, L. B. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 823-8, Jun 2014.

PIERINI, Stefano *et al.* Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. **Head & Neck**, v. 36, n. 8, p. 1103-1108, 2013.

ROBERTSON, K. D. DNA methylation and human disease. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 8, p. 597-610, Aug 2005.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, v. 174, n. 3, p. 341-8, Jan 31 2006.

ROH, J. L. *et al.* Clinical correlates of promoter hypermethylation of four target genes in head and neck cancer: a cooperative group correlative study. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 9, p. 2528-40, May 1 2013.

RUIZ, Mariangela T. *et al.* Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. **Arq Ciênc Saúde**, v. 13, n. 1, p. 34-38, 2006.

RYU, H. J. *et al.* Architectural patterns of p16 immunohistochemical expression associated with cancer immunity and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. **APMIS**, v. 125, n. 11, p. 974-984, Nov 2017.

SHERR, Charles J. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. **Cancer research**, v. 60, p. 3689–3695, 2000.

SHRIDHAR, K. *et al.* DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. **Oral Oncol**, v. 53, p. 1-9, Feb 2016.

SILVERMAN, S. O. L. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. **The Journal of the American Dental Association**, v. 132, p. 7S-11S, 2001.

SINGAL, Rakesh; GINDER, Gordon D. DNA Methylation. **Blood**, v. 93, n. 12, p. 4059-4070, 1999.

STERLACCI, W.*et al.* A comprehensive analysis of p16 expression, gene status, and promoter hypermethylation in surgically resected non-small cell lung carcinomas. **J Thorac Oncol**, v. 6, n. 10, p. 1649-57, Oct 2011.

SUSHMA, P. S.*et al.* PTEN and p16 genes as epigenetic biomarkers in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on south Indian population. **Tumour Biol**, v. 37, n. 6, p. 7625-32, Jun 2016.

TRUONG, M.*et al.* Analysis of promoter non-CG methylation in prostate cancer. **Epigenomics**, v. 5, n. 1, p. 65-71, Feb 2013.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol**, v. 3, n. 12, p. 755-63, Dec 2002.

WIJETUNGA, N. A.*et al.* Novel epigenetic changes in CDKN2A are associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol Oncol**, v. 142, n. 3, p. 566-73, Sep 2016.

WISSINGER, E.*et al.* The economic burden of head and neck cancer: a systematic literature review. **Pharmacoeconomics**, v. 32, n. 9, p. 865-82, Sep 2014.

ZHAO, R.*et al.* Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer. **EBioMedicine**, v. 8, p. 30-39, Jun 2016.

ZHOU, J.*et al.* A 115-bp MethyLight assay for detection of p16 (CDKN2A) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues. **BMC Med Genet**, v. 12, p. 67, May 13 2011.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 29 de abril de 2010.

Da: Profa. Dr^a. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Iuri Drumond Louro
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Alterações epigenéticas e detecção de HPV em carcinoma epidermóide da cavidade bucal"**.

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. 036/10 intitulado: **"Alterações epigenéticas e detecção de HPV em carcinoma epidermóide da cavidade bucal"** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 28 de abril de 2010.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,


Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/UFES

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA OS CASOS

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas. O estudo está sendo conduzido pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás e pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer. Seu médico nos forneceu seu nome e nos concedeu autorização para convidá-lo a participar deste estudo. Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento, sem que isso afete de forma alguma o tratamento médico que você está recebendo. Por favor, leia cuidadosamente este formulário de consentimento e esclareça com o coordenador da pesquisa no hospital quaisquer dúvidas que você possa ter sobre o estudo antes de assinar este termo.

EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se você concordar em participar deste estudo, será solicitado que você participe de uma entrevista e forneça amostras de sangue e de tecido (tumor). Além disso, nós pediremos sua permissão para coletar informações relevantes do seu prontuário médico. Se você decidir não responder, seja a uma questão específica ou a todas as informações, não sofrerá nenhuma penalidade. Você pode participar da entrevista, mas se recusar a fornecer as amostras biológicas (sangue e tumor), que serão coletadas e armazenadas para finalidades de pesquisa.

Questionário:

Um entrevistador virá aplicar o questionário enquanto você estiver no hospital. A entrevista tem a duração de aproximadamente uma hora e consiste de questões relacionadas a hábitos, estilo de vida, ambiente e saúde.

Coleta de sangue e amostras biológicas:

Será solicitado que você doe uma única amostra de sangue enquanto estiver no hospital. Uma enfermeira treinada retirará aproximadamente 10 ml de sangue de uma veia do seu braço, da maneira habitual. Se disponível, nós solicitaremos ao Departamento de Patologia do hospital uma pequena amostra do seu tumor.

ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O sangue e as amostras de tumor serão enviados a laboratórios para análise. Essas amostras serão testadas para as características genéticas e celulares que podem estar relacionadas ao desenvolvimento da doença. Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo. Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, você concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo. Nenhuma destas amostras será testada para detectar o uso de drogas ilegais. Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento será aprovado por um comitê de ética.

NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO

As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde. Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para você. Não haverá nenhum custo financeiro para você

participar neste estudo e não há nenhuma compensação ou pagamento pelo preenchimento do questionário e fornecimento das amostras biológicas.

DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS

Durante a coleta do sangue, você pode sentir um pouco de dor ou apresentar um hematoma (mancha roxa) no braço, no local onde for inserida a agulha. É possível, mas não provável, que você apresente inchaço ou sangramento no local da punção. Pode também ocorrer um mal-estar relacionado a agulhas. É improvável que ocorram danos físicos a partir da coleta de sangue. Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Não haverá benefícios diretos para você que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica.

GARANTIA DA CONFIDENCIALIDADE

As informações relativas à sua participação no estudo serão mantidas confidenciais e serão usadas apenas para fins científicos, em conformidade com a legislação aplicável do Brasil. Ninguém, exceto os membros da equipe de pesquisa terão acesso às suas respostas e aos resultados de testes. Seu empregador (patrão) não terá acesso a quaisquer resultados ou informações que você nos fornece. As amostras biológicas não serão etiquetadas com o seu nome. Seu nome não será usado em nenhum relatório e nem divulgado de forma alguma.

DIREITO A SE RETIRAR DO ESTUDO

A sua participação nesta pesquisa é voluntária e você pode se recusar a participar e/ou retirar o seu consentimento e interromper a participação a qualquer momento, sem nenhuma penalização ou perda de algum benefício que tenha recebido anteriormente. Se você inicialmente decidir dar seu consentimento para o armazenamento das amostras biológicas para pesquisas futuras, mas depois mudar de idéia e enviar notificação por escrito para o coordenador da pesquisa Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, todos os remanescentes das suas amostras biológicas serão então destruídos. A sua decisão sobre esse assunto não afetará o seu tratamento médico ou seu emprego.

CERTIFICAÇÃO

Eu li a explicação sobre o estudo e tive a oportunidade de discutir e esclarecer minhas dúvidas. Ao concordar em participar deste estudo, eu não renuncio a nenhum direito que possa ser relativo ao acesso e divulgação dos meus dados. Eu concordo em participar das partes do estudo onde está assinalado "sim" e recuso-me a participar das partes do estudo onde está assinalado "não". Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento.

SIM NÃO Parte do estudo

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Entrevista
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coleta e teste do sangue
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coleta de amostras de tumor e testes relacionados
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Acesso aos prontuários médicos

Assinatura do participante

Data

Assinatura da testemunha

Data

Nome

Nome da testemunha

Nós agradecemos a sua colaboração nesse importante projeto de pesquisa. Se você tiver dúvidas sobre este estudo, você pode telefonar para o Dr. José Carlos de Oliveira; chefe do Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, no telefone (0xx62)3243-7157 ou você pode escrever-lhe, no seguinte endereço: Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge cito a Rua 236, n.181 Setor Leste Universitário, CEP: 74605-070, Goiânia – Goiás, Brasil.