



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

KEILA CRISTINA MIRANDA

**ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DE
GENES SUPRESSORES DE TUMOR NO CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

2020

KEILA CRISTINA MIRANDA

**ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DE GENES
SUPRESSORES DE TUMOR NO CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS BUCAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Profa. Tit. Janete Dias Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Albuquerque Marchi

São José dos Campos

2020

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Miranda, Keila Cristina

ANÁLISE DE METILAÇÃO EM DIFERENTES REGIÕES DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL / Keila Cristina Miranda. - São José dos Campos : [s.n.], 2020.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2020.

Orientador: Janete Dias Almeida

Coorientador: Fabio Albuquerque Marchi

1. Metilação do DNA. 2. Epigenética. 3. Ilhas CpG. 4. Câncer bucal. I. Almeida, Janete Dias , orient. II. Marchi, Fabio Albuquerque, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Janete Dias Almeida (Orientador)

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Assoc. Ana Lia Anbinder

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Fernanda Viviane Mariano Brum Corrêa

Universidade Estadual de Campinas - Unicamp
Faculdade de Ciências Médicas
Campus de Campinas

São José dos Campos, 04 de Maio de 2020.

AGRADECIMENTOS

Ao término desta jornada, expresso profunda gratidão por tudo o que aconteceu ao longo dos últimos dois anos. Houve momentos de alegria, tristeza, euforia, incertezas, pequenos surtos e, muitas vezes, sentimento de incapacidade. No entanto, Deus me presenteou com anjos que tornaram essa missão muito mais branda e possível de ser realizada. Por este motivo, primeiramente, agradeço a Ele por ter me guiado até aqui e posto pessoas insubstituíveis em meu caminho;

Agradeço também à minha família por entender os momentos que eu precisei estar ausente e por apoiar todas as aventuras que eu escolho me envolver. Principalmente, aos meus pais, Salvador e Vitória, pelo apoio e amor;

À minha irmã Josi, minhas sobrinhas Raíssa e Maria Vitória e meu cunhado Geraldo por acreditarem nos meus sonhos e estarem presentes nos momentos mais importantes para mim;

À minha orientadora, Professora Janete, agradeço pelos momentos de sabedoria, pela positividade, pelos conselhos, pelos repetidos “Respira!” e, principalmente, por ter me dado este desafio e a oportunidade de conhecer todas essas pessoas incríveis. Sei que Deus agiu em minha vida por meio de você;

Ao meu co-orientador, Dr. Fabio Marchi, muito obrigada por sua prestatividade, apoio e ensinamentos. Todas as dificuldades encontradas foram muito mais leves de serem superadas com seu suporte, você foi nosso principal anjo nesse projeto;

Aos colaboradores do AC Camargo Cancer Center pela parceria, agradeço principalmente à professora Dra. Sílvia Regina Rogatto, Dr. Luiz Paulo Kowalski e Msc. Caroline Beltrami, pelo material, suporte técnico e

disponibilidade em desenvolver este estudo;

Aos colaboradores do Hospital de Amor de Barretos que foram muito receptivos e prestativos, principalmente ao Dr. Rui Manoel Reis, Dra. Lidia Rebolho e Msc. André Lengert;

A Msc. Bruna Sorroche, também do Hospital de Amor, agradeço por sua prestatividade, pelo sorriso que não sai do seu rosto, por sua disponibilidade em me ensinar todos os experimentos e por tirar todas as minhas dúvidas. Muita gratidão por toda sua ajuda;

Às minhas amigas Cecília, Mayane e Verônica por me apoiarem em minhas decisões, me aconselharem e sempre estarem comigo nessa caminhada. Gratidão pela amizade de vocês;

À minha colega de profissão, agora uma irmã, Hanna, por me ajudar a manter o foco, enxergar as coisas por um lado positivo, por me incentivar a não desistir dos nossos sonhos e por me inspirar a cada dia;

Às minhas irmãs de mestrado, Nayara e Bruna, por compartilharem os medos, problemas e soluções, por deixarem meus dias mais leves, por me fazerem rir e por me ensinarem a ser melhor;

À minha outra irmã de mestrado, que foi um presente na minha vida, minha querida Mariana, obrigada por compartilhar seus sonhos comigo, seus medos, suas dúvidas. Obrigada por ser luz e ter um coração tão puro, você será sempre minha inspiração de profissional e ser humano;

Ao meu amigo de créditos e preparo de aulas, Anderson, muito obrigada por sua calma, paciência e parceria ao longos destes dois anos;

Aos meus amigos da salinha da pós-graduação Jaqueline, Noala, Renata, Cheyenne, Suelen e Juliane, muito obrigada pelos momentos e ensinamentos compartilhados;

Aos meus queridos professores da Histologia, Prof. Miguel, Profa. Marianne e Profa. Luana, muito obrigada por terem me ensinado tanto no

período de estágio docência e terem me dado a oportunidade de dar a primeira aula para uma turma de graduação. Especialmente ao Prof. Miguel, também agradeço pelas aulas de Genética, pelas conversas e principalmente pelo apoio ao longo dessa jornada;

À Profa. Regina El Dib meu agradecimento por ter sido um exemplo de ternura e profissional ao longo da disciplina de Bioquímica, obrigada por exalar humildade e paixão pelo que faz;

Aos professores da disciplina de Patologia Geral, Profa. Ana Lia Anbinder, Prof. Luiz Eduardo Blummer e Profa. Mônica Fernandes Gomes agradeço por todo o carinho e empenho em me ensinar e me tornar uma profissional melhor;

Meu agradecimento aos meus alunos do Prevest (2019) que me deram a oportunidade de evoluir em vários aspectos profissionais e pessoais, me ensinaram a ser professora e plantaram no meu coração o amor por essa profissão tão linda;

A todas as pessoas que conheci ao longo destes dois anos, aos amigos do laboratório de Microbiologia e Imunologia, do Lana, do Lapp e aos demais discentes e docentes, obrigada por tudo que me ensinaram;

Agradeço grandemente aos pacientes que colaboraram com suas amostras para este estudo e a todos os profissionais envolvidos direta e indiretamente;

Agradeço à Capes pela bolsa ao longo dos 24 meses e à Fapesp pelo financiamento da pesquisa;

Aos funcionários da pós-graduação, Carol, Bruno e Sandra, sempre muito prestativos, meu muito obrigada; estendo meu agradecimento também ao Sr. Carlos Guedes pela ajuda com todos os trâmites do Comitê de Ética em Pesquisa e relatórios da Fapesp;

Agradeço aos membros da banca do exame de qualificação e defesa

pelas contribuições, vocês foram escolhidos com muito carinho;

Por fim agradeço ao Programa de Biopatologia Bucal e ao ICT-SJC/Unesp pela oportunidade e pela evolução pessoal e profissional ao longo destes dois anos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 PROPOSIÇÃO	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Aspectos éticos	24
3.2 Histórico do projeto	24
3.3 Análise <i>in silico</i> a partir de pacientes obtidos em colaboração com o ACCCC.....	26
3.4 Validação dos alvos	28
3.4.1 Análise <i>in silico</i> a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)	28
3.4.2 Análise experimental dos genes alvos selecionados.....	28
3.4.2.1 Casuística	28
3.4.2.2 Desenho dos <i>primers</i>	30
3.4.2.3 Conversão do DNA por bissulfito de sódio	32
3.4.2.4 Amplificação do DNA por PCR e eletroforese	34
3.4.2.5 Pirosequenciamento	34
3.5 Processamento de dados e análise estatística.....	38
4 RESULTADO	40
4.1 Rastreamento global <i>in silico</i>	40

4.1.1 Casuística	40
4.1.2 Análise do perfil de metilação dos 24 genes alvo no CCEB e tecido adjacente.....	41
4.1.2.1 Validação <i>in silico</i> do perfil de metilação dos 24 genes alvo no CCEB a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)	45
4.1.3 Comparação entre o perfil de metilação de tumores de pacientes fumantes e não-fumantes	48
4.1.4 Comparação entre o perfil de metilação do tecido tumoral e adjacente.....	49
4.1.4.1 Validação <i>in silico</i> dos sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB comparado ao tecido adjacente a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq).....	54
4.2 Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente selecionados para validação experimental.....	56
4.3 Validação experimental por pirosequenciamento.....	58
4.3.1 Casuística	58
4.3.2 Análise geral do perfil de metilação dos sítios CpGs	59
4.3.3 Correlação entre as PDMs e os dados clínico-patológicos dos pacientes	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO.....	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação das regiões <i>upstream</i> , sítio de início da transcrição e <i>downstream</i> de um gene	19
Figura 2 - Localização do sítio CpG em relação à ilha CpG	20
Figura 3 - Fluxograma de todas as etapas executadas no presente estudo e o número de amostras utilizadas	25
Figura 4 - Coluna <i>Zymo-Spin</i> TM IC e tubo contendo DNA eluído.....	33
Figura 5 – Purificação das amostras de DNA obtidas da reação de PCR.....	35
Figura 6 – <i>Workstation</i> utilizada para lavagens das amostras e transferência para placa de sequenciamento	36
Figura 7 – Pirosequenciador utilizado para quantificar os níveis de metilação..	37
Figura 8 - Cartucho contendo enzimas, substratos e dNTPs utilizados no pirosequenciamento.....	38
Figura 9 - Média dos valores β obtidos na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon no CCEB e no tecido adjacente	43
Figura 10 - Média dos valores β obtidos no corpo gênico e/ou 3'UTR no CCEB e no tecido adjacente	44

Figura 11 - Médias de valores β obtidas no estudo interno (HM540K) e externo (TCGA) para os genes que apresentaram pelo menos três sítios CpGs hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon	46
Figura 12 - Médias de valores β obtidas para os genes que apresentaram no mínimo três sítios hipermetilados em região 5'UTR, 1º éxon e 3'UTR	47
Figura 13 - PDMs distribuídas por gene e <i>status</i> de metilação nos tecidos tumorais e adjacentes.....	51
Figura 14 - Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente, conforme região gênica e localização em relação à ilha CpG.....	52
Figura 15 - Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente, conforme região gênica e localização em relação à ilha CpG.....	53
Figura 16 - Eletroforese mostrando o resultado dos testes efetuados como os <i>primers</i> para as regiões dos genes <i>APC</i> , <i>BRCA1</i> , <i>FHIT</i> , <i>HOXA1</i> e <i>WIF1</i>	57
Figura 17 - Pirogramas obtidos na investigação do nível de metilação dos sítios CpGs dos genes <i>BRCA1</i> , <i>HOXA1</i> e <i>FHIT</i>	61
Figura 18 - Dendograma representando o padrão de metilação obtido para cada sítio CpG nas amostras de CCEB e tecido adjacente na análise por pirosequenciamento.....	63
Figura 19 - Comparação entre os níveis de metilação obtidos para os pacientes que apresentaram recidiva locorregional em um período de cinco anos	66

Figura 20 - Análise de poder do teste para o nível de metilação do sítio CpG do gene <i>HOXA1</i> entre o tecido tumoral e o tecido adjacente.....	67
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados clínico-patológicos dos pacientes participantes do estudo de metilação global utilizando a plataforma HM450K.....	41
Tabela 2 - Comparação entre os níveis de metilação entre tumores de pacientes tabagistas e não-tabagistas	49
Tabela 3 - Comparação entre os dados internos de metilação e os dados externos de metilação e expressão disponíveis no TCGA.....	55
Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos na validação experimental	59
Tabela 5 - Comparação entre os níveis de metilação obtidos no estudo interno, no TCGA e no pirosequenciamento para os três sítios CpGs diferencialmente metilados nas análises exploratórias	62
Tabela 6 - Porcentagem de metilação obtida no pirosequenciamento por sítio CpG de acordo com o gene e o tecido investigado	64
Tabela 7 - Diferenças de metilação entre o CCEB e o tecido adjacente obtidas nos estudos interno, TCGA e pirosequenciamento	65

Miranda KC. Análise da metilação em diferentes regiões de genes supressores de tumor no carcinoma de células escamosas bucal [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2020.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) apresenta alterações epigenéticas, como a metilação de DNA, na região promotora de genes supressores de tumor (GST), mas pouco se sabe em relação a outras regiões gênicas. Este estudo teve como objetivo investigar o perfil de metilação de diferentes regiões de um grupo de GSTs, validar dados significativos por meio de análises *in silico* e experimental, e correlacionar estes achados aos dados clínico-patológicos dos pacientes. Na plataforma HumanMethylation450 Beadchip, foram utilizadas 53 amostras de CCEB e 53 de tecidos não-neoplásicos adjacentes ao tumor (TA). O nível de metilação destes tecidos foram comparados considerando $\Delta\beta \leq -0,10$ ou $\geq 0,10$, $p < 0,01$ e $FDR < 0,01$. Os resultados obtidos foram validados no TCGA e por pirosequenciamento utilizando 15 amostras independentes de CCEB e 15 TA. Os genes *BRCA1*, *FHIT*, *MGMT*, *RASSF1* e *RUNX3* apresentaram sítios hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon, enquanto *CDH13*, *DAPK1*, *HOXA1*, *PDLIM4*, *RARB*, *TIMP3*, *TP73* e *VHL* mostraram hipermetilação no corpo gênico e/ou 3'UTR. Foram identificados sítios diferencialmente metilados entre o CCEB e TA para os genes *BRCA1*, *FHIT* e *HOXA1*. Na validação experimental, apenas o sítio CpG na região 3'UTR do gene *HOXA1* mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) entre o CCEB e TA, 55,5% e 36,9% respectivamente, estando sua metilação e maior expressão ($FC = 10,58$) positivamente correlacionada à carga tabágica ($p = 0,04$) e recidiva ($p = 0,03$). A análise *in silico* utilizada mostrou-se efetiva na identificação dos alvos e comparação entre os grupos. A metilação de diferentes regiões de genes supressores de tumor é um evento frequente no CCEB, entretanto pouca diferença é encontrada entre o perfil de metilação tumoral e as margens da lesão. A metilação do sítio CpG na região 3'UTR do *HOXA1* em CCEB está correlacionada a expressão aberrante deste gene e maiores episódios de recorrência.

Palavras-chave: Metilação do DNA. Epigenética. Ilhas CpG. Câncer bucal.

Miranda KC. Oral squamous cell carcinoma methylation analysis in different regions of tumor suppressor genes [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2020.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) presents epigenetic changes, such as DNA methylation, in tumor suppressor genes (GST) promoter regions, but little is known about other gene regions. This study aimed to investigate the methylation profile of different regions of a group of GSTs, to validate significant data through *in silico* and experimental analyzes, and to correlate these findings with the patients' clinical-pathological data. In the HumanMethylation450 Beadchip platform, 53 samples of CCEB and 53 of non-neoplastic tissues adjacent to the tumor (AT) were used. The methylation level of these tissues was compared considering $\Delta\beta \leq -0.10$ or ≥ 0.10 , $p < 0.01$ and $FDR < 0.01$. The results obtained were validated at TCGA and by pyrosequencing using 15 independent samples of CCEB and 15 TA. The BRCA1, FHIT, MGMT, RASSF1 and RUNX3 genes showed hypermethylated sites in the promoter region, 5'UTR and / or 1st exon, while CDH13, DAPK1, HOXA1, PDLIM4, RARB, TIMP3, TP73 and VHL showed hypermethylation in the gene body and / or 3'UTR. Differently methylated sites were identified between the OSCC and AT for the BRCA1, FHIT and HOXA1 genes. In experimental validation, only the CpG site in the 3'UTR region of the HOXA1 gene showed a significant difference ($p < 0.01$) between OSCC and AT, 55.5% and 36.9% respectively, with its methylation and greater expression (FC = 10.58) positively correlated with smoking burden ($p = 0.04$) and recurrence ($p = 0.03$). The *in silico* analysis used was effective in identifying the targets and comparing the groups. Methylation of different regions of GST is a frequent event in the OSCC, however little difference is found between the tumor methylation profile and the lesion margins. Methylation of the CpG site in the 3'UTR region of HOXA1 in CCEB is correlated with the aberrant expression of this gene and with greater recurrence episodes.

Keywords: DNA methylation. Epigenetic. CpG islands. Oral cancer.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é mais comum entre homens do que em mulheres, principalmente a partir da quinta década de vida (World Health Organization - WHO, 2020). No Brasil, este é o quinto tipo de câncer mais incidente entre os homens e o décimo-terceiro entre as mulheres. A região sudeste, principalmente os estados de São Paulo e Paraná, tem a maior incidência de câncer bucal do país, onde é o quarto tumor mais frequente no sexo masculino (Instituto Nacional do Câncer - INCA, 2020).

O câncer de boca refere-se a um conjunto de tumores epiteliais que acometem os lábios e outros sítios da região intrabucal (INCA, 2020). Os tumores epiteliais malignos classificados histopatologicamente como carcinoma de células escamosas (CCE) representam cerca de 90% dos cânceres de boca (van der Waal et al., 2011).

O CCE labial está relacionado à exposição à radiação solar; já o carcinoma de células escamosas bucal (CCEB), isto é, que acometem a língua, gengiva, assoalho, mucosa jugal e palato duro, geralmente, estão relacionados ao consumo excessivo de tabaco e álcool (WHO, 2020). Hashibe et al. (2009) afirmaram que o tabagismo triplica o risco de desenvolvimento do câncer bucal e quando associado ao consumo de álcool, eleva o risco em 15 vezes.

Além do cigarro tradicional, outros produtos derivados do tabaco também estão relacionados ao câncer de boca, tais como cigarro de palha, de Bali, de cravo ou *kreteks*, fumo de rolo, tabaco mascado, charutos, cachimbos e narguilé. Quanto maior o consumo de cigarros fumados, maior o risco de câncer (INCA, 2020).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o excesso de gordura corporal, baixo consumo de frutas e vegetais, exposição ao amianto, poeira de

madeira, couro e cimento, formaldeído, sílica, fuligem, solventes orgânicos e agrotóxicos também configuram fatores de risco para o câncer bucal.

Atualmente, o papel do vírus do Papiloma Humano (HPV) no desenvolvimento do câncer intrabucal é controverso e pouco elucidado, entretanto sugere-se que a mucosa bucal represente apenas um reservatório de infecção, não havendo envolvimento primário do vírus no processo de desenvolvimento do CCEB (Candotto et al., 2017).

Apesar do fácil acesso à região bucal, grande parte dos pacientes são diagnosticados em estágios avançados da doença (III e IV) e, assim, cerca de 60% deles vão a óbito nos cinco anos pós-diagnóstico. Entretanto, se diagnosticado em estágio inicial, o tratamento, apesar de invasivo, pode apresentar grande efetividade (WHO, 2020).

O tratamento dos pacientes com CCEB ainda é baseado na localização do tumor, classificação TNM (Tumor, Linfonodo, Metástase) e no estadiamento clínico (EC), o que muitas vezes não traz informações precisas sobre o prognóstico do paciente (Baj et al., 2019; Majumdar et al., 2017). Além disso, devido à localização do tumor, o tratamento, mesmo que cirúrgico, leva à significativa perda de estrutura e função, principalmente no que se refere à mastigação e fala (Shaw et al., 2007).

A alta mortalidade do CCEB está relacionada principalmente às taxas de recidivas locorregionais, em alguns casos, mesmo com o tecido adjacente ao tumor se apresentando histologicamente negativo para células tumorais. No entanto, não existem diretrizes amplamente estabelecidas para identificação das margens cirúrgicas removidas durante a excisão do tumor (Baj et al., 2019).

O processo de transformação das células normais do epitélio escamoso estratificado da mucosa bucal em lesões pré-malignas e, posteriormente, em lesões malignas, ainda é pouco elucidado. Todavia, sabe-se que este processo é multifatorial e abrange um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas,

hereditárias ou adquiridas, que levam a um desequilíbrio na função de oncogenes e genes supressores de tumor (Thomson, 2012).

As células cancerosas são capazes de induzir e sustentar sinais estimuladores de crescimento por meio de oncogenes, além de contornar mecanismos que regulam negativamente a proliferação celular, que, muitas vezes, dependem ativamente da ação de genes supressores de tumor (Hanahan, Weinberg, 2011).

Os fatores epigenéticos que também podem levar à carcinogênese são alterações hereditárias que ocorrem na expressão gênica e não são codificadas na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA) (De Oliveira et al., 2015; Supic et al., 2009). Sabe-se que marcadores epigenéticos são altamente específicos de acordo com o tipo celular e podem ainda sofrer alterações ao longo do tempo (Barrero et al., 2010).

A metilação de DNA é um mecanismo epigenético que modula a expressão gênica, responsável, portanto, pela diferenciação celular, desenvolvimento e, até mesmo, a carcinogênese (Flanagan et al., 2009; Supic et al., 2009; Zhang et al., 2015).

Esse processo é realizado por um grupo de enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMTs), sendo as principais divididas em três tipos: DNMT1, encarregada de manter os padrões de metilação de DNA após a divisão celular, e DNMT3a e DNMT3b, que atuam na regulação das *de novo* metiltransferases (Jones, 2012).

Segundo Jones (2012), essas três enzimas são essenciais na manutenção dos padrões de metilação, principalmente, durante o desenvolvimento. Uma célula totalmente diferenciada tem um padrão específico de metilação e, portanto, expressa genes específicos (De Oliveira et al., 2015; Teodoridis et al., 2005).

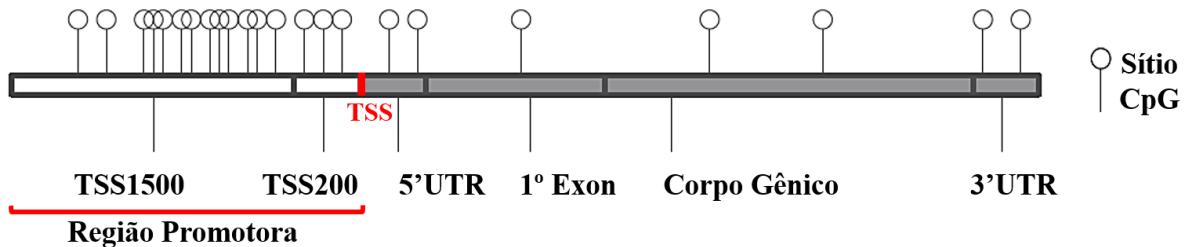
A metilação de DNA consiste na adição de um grupo metil (CH_3), proveniente da proteína S-adenosilmetionina, em um nucleotídeo, geralmente à

citossina adjacente a uma guanina (5'- CG - 3'), chamado de sítio CpG. Este processo ocorre por meio do giro da citossina a 180° para fora da fita de DNA, agregação de CH₃ e retorno ao seu lugar na fita, formando então uma 5-hidroximetilcitossina (5 mC) (De Oliveira et al., 2015). Essa alteração permite que proteínas sejam agregadas à fita de DNA e impeçam o acoplamento de fatores de transcrição, inibindo o processo de formação do ácido ribonucleico (RNA) (Rasmussen, Helin, 2016).

Embora a maior parte dos sítios CpGs estejam metilados em mamíferos, existem regiões chamadas de ilhas CpGs que se encontram desmetiladas (Chen et al., 2007). Essas regiões correspondem a uma porção do DNA com mais de 50% de sítios CpGs no mesmo filamento e geralmente são encontradas próximas aos sítios de início de transcrição (TSS - *Transcription Start Site*) dos genes (Towle, Garnis, 2012).

Nos últimos anos, a maioria dos estudos focou apenas na metilação em ilhas CpGs localizadas em regiões promotoras (Zhang et al., 2015). Entretanto, o avanço nas técnicas de estudos de metilomas tem demonstrado que a posição onde ocorre a adição do grupo metil apresenta diferentes funções biológicas (Jones, 2012). Por exemplo, a metilação na região promotora de ilhas CpG bloqueia o início da transcrição. De outro modo, sugere-se que a metilação no corpo gênico não tenha essa capacidade, podendo até mesmo estimular o processo de transcrição (Jones, 2012). Estas regiões gênicas podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 - Representação das regiões *upstream*, sítio de início da transcrição e *downstream* de um gene



Legenda: TSS1500: 200 - 1500 bases à montante (*upstream*) do TSS (*Transcription Start Site* - TSS); TSS200: 0 - 200 bases à montante (*upstream*) do sítio de início da transcrição; 5'UTR: dentro da região 5' não traduzida, entre o TSS e o códon de iniciação da tradução ATG; Corpo gênico: entre ATG e o códon de parada; independentemente da presença de íntrons, éxons, TSS ou promotores; 3'UTR: entre o códon de parada e a Cauda Poli-A.

Fonte: Adaptado de Illumina®, 2012.

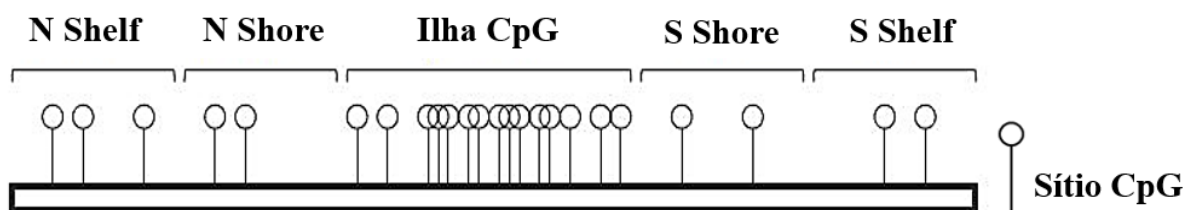
As ilhas CpG correspondem de 1 a 2% do genoma e frequentemente estão localizadas na região promotora (Sandoval et al., 2011) e exônica no corpo gênico (Law, Jacobsen, 2010).

As regiões periféricas que flanqueiam as ilhas CpGs, à aproximadamente 2 kb (kilobases), são chamadas de *shore*; 2 a 4 kb são conhecidas como *shelf* e, outras mais distantes, *open sea* (Irizarry et al., 2009).

Existem evidências de que a metilação nas regiões flanqueando as ilhas CpGs também influenciam a expressão gênica, mas ainda é um mecanismo pouco elucidado e mais dinâmico (Irizarry et al., 2009). Segundo Doi et al. (2014), *shores* também possuem um perfil de metilação específico de acordo com o tecido e no câncer está associado à repressão gênica.

Essas regiões, em relação à ilha CpG, podem ser vistas na Figura 2.

Figura 2 - Localização do sítio CpG em relação à ilha CpG



Legenda: N: montante (*north*) (5') da ilha CpG; *Shelf*: 2 - 4 kb da ilha CpG; *Shore*: 0 - 2 kb da ilha CpG; S: jusante (*south*) (3') da ilha CpG. Essa imagem mostra como, geralmente, são localizadas as ilhas CpGs em um gene e como são chamadas as regiões que flanqueiam a ilha.

Fonte: Adaptado de Illumina®, 2012.

As enzimas *ten-eleven translocation* (TET) são capazes de converter a 5-hidroximetilcitosina em citosina, por meio de diversas vias. A TET desempenha uma função de extrema importância na regulação dos padrões de metilação juntamente às DNMTs (Rasmussen, Helin, 2016).

Existem cerca de 28 milhões de sítios CpGs no genoma humano. Analisar a metilação de cada um desses sítios pode fornecer informações sobre o papel da metilação na manutenção da saúde e desenvolvimento de doenças (Stirzaker et al., 2014).

Os padrões de metilação e desmetilação estão hermeticamente regulados em células dentro da normalidade. Entretanto, em neoplasias, esses padrões se alteram. Sabe-se que fatores ambientais externos causam alterações epigenéticas levando ao desenvolvimento de malignidades (Wang et al., 2017).

Em algumas neoplasias malignas, há hipermetilação das ilhas CpG em regiões promotoras e isso impede o acoplamento de fatores de transcrição, o que resulta no impedimento da transcrição de genes, incluindo os supressores de tumor (Basu et al., 2017).

Segundo Rideout et al. (1990), a metilação no corpo gênico também possui um papel fundamental na carcinogênese, estando relacionado ao desenvolvimento

do câncer em células somáticas e contribuindo para mutações em células germinativas.

Atualmente, há diversos indícios de que o padrão de metilação de DNA pode ser utilizado como um biomarcador para diferenciar células cancerosas de células normais (Jin, Liu, 2018). Hayashi et al. (2015) propuseram que a análise molecular oferece várias vantagens sobre a microscopia óptica para a detecção de células cancerosas no tecido adjacente ao tumor, visto que alterações moleculares específicas podem ser mais sensíveis do que a detecção de alterações morfológicas celulares.

O perfil de metilação de genes supressores de tumor responsáveis pelo ciclo e adesão celular, apoptose, dano, reparo de DNA e transcrição gênica tem sido amplamente estudado em CCEB (Basu et al., 2017; Gao, Teschendorff, 2017; Towle et al., 2013) e no tecido adjacente ao tumor (Lin et al., 2015; Sinha et al. 2009; Strzelczyk et al., 2014). Entretanto, o efeito da metilação em diferentes regiões gênicas permanece incerta ou controversa neste tipo de carcinogênese.

Diversas tecnologias foram desenvolvidas a fim de analisar a metilação de DNA em escala genômica, principalmente em regiões ricas em sítios CpGs (Stirzaker et al., 2014). Dentre essas tecnologias, existe a plataforma Infinium® HumanMethylation450 Bechips (HM450K). Segundo Stirzaker et al. (2014), esta plataforma apresenta um bom custo benefício, não depende de enzimas de restrição e pode ser utilizada para analisar uma variedade de tipos celulares, em tecidos frescos ou parafinados.

Assim, este estudo propôs identificar o perfil de metilação de um grupo de genes supressores tumorais em CCEB por meio de estratégia de rastreamento computacional e molecular com plataforma de alto desempenho, e validar experimentalmente os alvos diferencialmente metilados entre o tecido tumoral e o tecido adjacente de pacientes tabagistas e não-tabagistas.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Investigação do perfil de metilação em diferentes regiões de genes supressores de tumor como fator prognóstico de CCEB de pacientes tabagistas e não-tabagistas.

2.2 Objetivos específicos

- a) investigar o perfil de metilação dos 24 genes descritos abaixo em pacientes com CCEB utilizando dados obtidos com a plataforma HumanMethylation450:
- *APC, BRCA1, CDH1, CDH13, CDKN2A, DAPK1, ESR1, FHIT, GSTP1, HOXA1, IGF2, MGMT, MLH1, NEUROG1, PDLIM4, PTEN, RARB, RASSF1, RUNX3, SOCS1, TIMP3, TP73, VHL* e *WIF1*.
- b) confirmar os valores diferenciais de metilação dos genes alvo entre as amostras de CCEB de pacientes tabagistas e não-tabagistas;
- c) identificar valores diferenciais de metilação dos genes alvo entre as amostras de CCEB e o tecido adjacente ao tumor com histologia negativa para células tumorais (TA);
- d) selecionar os melhores alvos para validação experimental por meio de abordagem comparativa aos dados obtidos no TCGA;
- e) correlacionar os valores de metilação obtidos experimentalmente aos

datos clinicopatológicos dos pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Este é um estudo observacional transversal que analisou amostras e dados retrospectivos. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC) como parte do estudo intitulado “Estudo genético dos principais fatores de risco no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade bucal” (ANEXO A), CAAE: 42387315.0.3001.5432, parecer: 3.295.277.

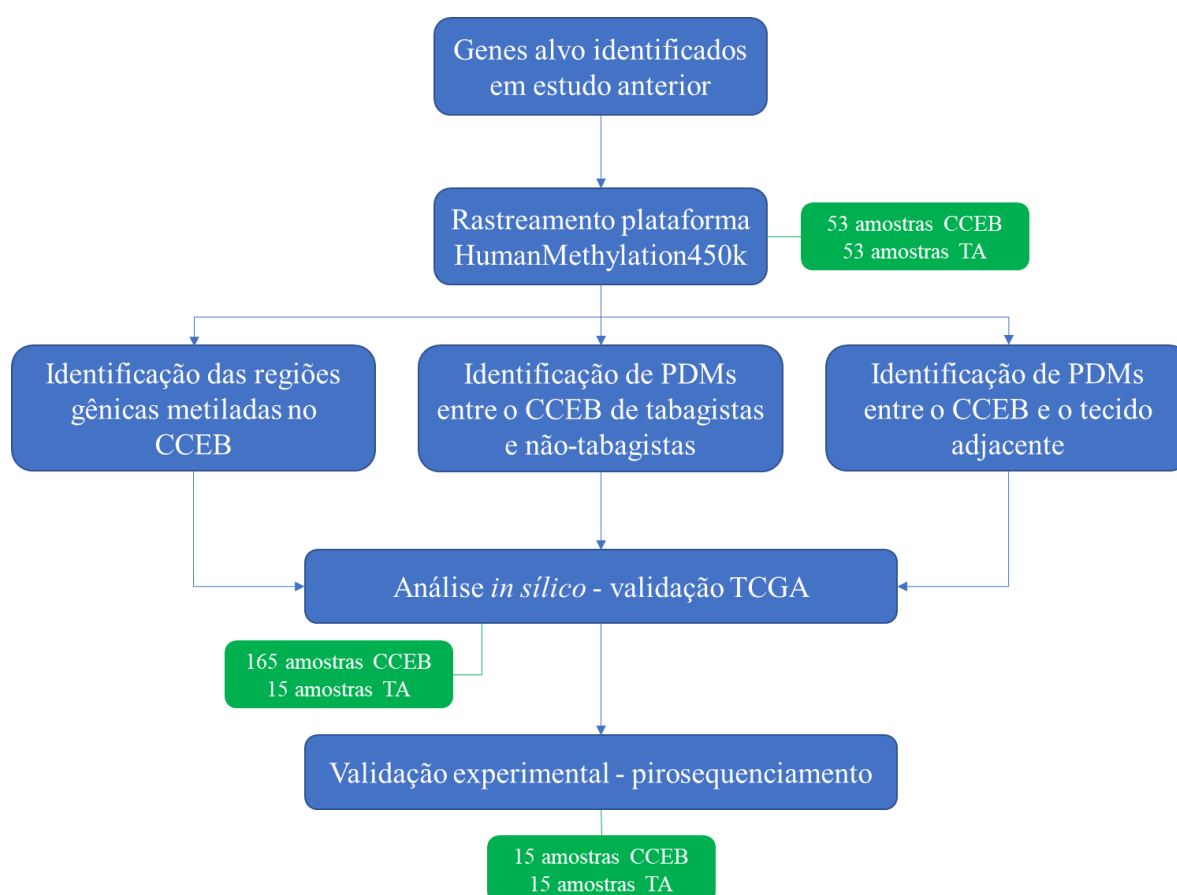
3.2 Histórico do projeto

Os genes alvos deste estudo foram identificados em projeto anterior contemplado com auxílio Fapesp (2016/08633-0), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICT/Unesp, parecer nº. 1.033.312/2015.

Este estudo é fruto de parceria estabelecida entre o grupo de pesquisa do ICT/Unesp, na cidade de São José dos Campos, o Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center (ACCCC), São Paulo, com a colaboração do Dr. Luiz Paulo Kowalski (Diretor do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do ACCCC), da Dra. Silvia Regina Rogatto (Professora no Departamento de Genética Clínica, Hospital Vejle, Instituto Regional de Pesquisa em Saúde, Universidade do Sul da Dinamarca), da

doutoranda Caroline Beltrami (no ACCCC), do Dr. Fabio Albuquerque Marchi (Pesquisador no Centro Internacional de Pesquisa – ACCCC); e o Hospital de Amor de Barretos, com colaboração dos seguintes pesquisadores: Dr. Rui Manuel Vieira Reis, Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes e Msc. Bruna Pereira Sorroche. A Figura 3 representa um fluxograma das etapas de execução deste estudo.

Figura 3 - Fluxograma de todas as etapas executadas no presente estudo e o número de amostras utilizadas



Legenda: CCEB: carcinoma de células escamosas bucal; TA: tecido adjacente; PDMs: posições diferencialmente metiladas; TCGA: *The Cancer Genome Atlas*.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Análise *in silico* a partir de pacientes obtidos em colaboração com o ACCCC

A análise global de metilação foi realizada por meio da plataforma Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (HM450K) (Illumina®, San Diego, CA, USA) a fim de investigar o perfil global de metilação no CCEB. Foram utilizadas 53 amostras de DNA de CCEB e 53 amostras de tecido adjacente ao tumor provenientes do Biobanco do ACCCC.

A HM450K interroga 485.764 sítios de metilação por amostra com a resolução de um único nucleotídeo, com uma cobertura de 96% das ilhas CpGs descritas no genoma e 98,9% dos RefGenes, além de ilhas CpGs estendidas (0 a 4 kb flanqueando as ilhas CpGs).

A plataforma utiliza os ensaios Infinium I e Infinium II. No ensaio Infinium I, duas sondas são utilizadas para interrogar o *locus* CpG, uma sonda para CpG metilado e uma para CpG não-metilado. Nesse modelo, a região 3' da sonda é desenhada para parear com a base citosina “protegida” (*design* metilado) ou parear com a base timina resultado da conversão por bissulfito e amplificação (*design* não-metilado).

No ensaio Infinium II, apenas uma sonda por *locus* CpG é utilizada, sendo a região 3' desta complementar a base anterior ao sítio de interesse (C pareado a G) e a extensão resulta na adição de uma guanina ou adenina marcada complementar à citosina (*design* metilado) ou timina (*design* não metilado) (Bibikova et al., 2011).

O controle de qualidade dos dados obtidos a partir da leitura dos *arrays* foi avaliado pelo pacote *WateRmelon* (Schalkwyk et al., 2013), disponível para o programa R versão 3.6 (R Core Team, 2019). O primeiro passo das análises incluiu a filtragem das sondas mapeadas em regiões contendo SNPs (*Minor Allele*

Frequency > 5% para todas as populações de acordo com o banco de dados 1000 Genomas¹), nos cromossomos X e Y e sondas que co-hibridam em sequências alternativas homólogas (≥ 49 pares de base) (Chen et al., 2013). Também foram removidas sondas de acordo com detecção de $p > 0,05$ e contagem de *beads* < 3 em 5% das amostras. A checagem do controle de qualidade foi realizada por meio da distribuição dos sinais obtidos para sondas metiladas e não-metiladas e do uso da análise multivariada MDS (*Multidimensional Scaling*).

Em seguida foi feito o ajuste do viés da cor por meio da normalização entre as amostras pelo método *quantile* e entre sondas pelo método BMIQ (*Beta-Mixture Quantile Normalization*). Nessa etapa, o algoritmo normaliza a distribuição das sondas do tipo 2 (Infinium II) de acordo com as características de distribuição dos valores de beta das sondas tipo 1 (Infinium I), além de eliminar o enriquecimento desse tipo de sonda, causado pela baixa dinâmica das sondas tipo 2 (Teschendorff et al., 2013).

Para corrigir os possíveis *batch effects* nos dados, foi utilizado o pacote *sva* (Leek et al., 2012), disponível no Bioconductor, que por meio de uma regressão linear extrai os coeficientes de acordo com os tipos de tecidos analisados.

Dentre as 485.764 sondas que investigaram os sítios CpGs na HM450K, foram realizados filtros na busca por dados de metilação referentes às sondas que investigaram os seguintes genes: *APC*, *BRCA1*, *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A*, *DAPK1*, *ESR1*, *FHIT*, *GSTP1*, *HOXA1*, *IGF2*, *MGMT*, *MLH1*, *NEUROG1*, *PDLIM4*, *PTEN*, *RARB*, *RASSF1*, *RUNX3*, *SOCS1*, *TIMP3*, *TP73*, *VHL* e *WIF1*.

O pacote *limma* (Ritchie et al., 2015) foi utilizado para identificar o perfil diferencial de metilação entre os grupos tumorais e tecidos adjacentes ao tumor, considerando significativas as sondas que apresentavam p valor corrigido por Bonferroni < 0,01 e $\Delta\beta \leq -0.10$ ou ≥ 0.10 . O método de Bonferroni foi

¹ The International Genome Sample Resource [internet]. Providing ongoing support for the 1000 Genomes Project data. [acesso em 2019]. Disponível em: www.1000genomes.org/

utilizado para ajustar os valores de p para múltiplas comparações.

3.4 Validação dos alvos

3.4.1 Análise *in silico* a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)

Foram obtidas 165 amostras de boca e 15 tecidos adjacentes, rastreados pelas plataformas HumanMethylation450 e RNA-seq, disponíveis pelo TCGA (obtidas no banco de dados UCSC Xena) para comparar os sítios CpGs diferencialmente metilados e o perfil de expressão dos genes, contribuindo com a escolha dos sítios CpGs diferencialmente metilados para validação por pirosequenciamento. Os critérios estatísticos utilizados para seleção de sondas diferencialmente metiladas foram os mesmos descritos anteriormente.

3.4.2 Análise experimental dos genes alvos selecionados

3.4.2.1 Casuística

Foram utilizadas 30 amostras de tecido congelado provenientes do Biobanco de tumores do ACCCC, divididas em dois grupos:

- Grupo 1: 15 amostras de CCEB;

- Grupo 2: 15 amostras de tecido adjacente ao tumor.

Foram incluídas amostras de tecido congelado de pacientes submetidos à cirurgia como tratamento ao CCEB primário, com lesão em língua, assoalho, região retromolar ou gengiva. Também foram consideradas amostras de pacientes com *follow up* de 05 anos que apresentassem os seguintes dados clínicos: idade, sexo, TNM, estágio clínico, dados de consumo tabaco e álcool, informações sobre sobrevida, recidiva e metástase.

Não foram incluídas amostras de pacientes previamente submetidos a quaisquer outros tipos de tratamento oncológico, como radioterapia ou quimioterapia; tumores secundários ou primários localizados em base de língua ou orofaringe.

Foram excluídas as amostras com porcentagem de tumor confirmado por laudo histopatológico $< 70\%$ e com necrose $> 20\%$; e amostras de pacientes sem acompanhamento médico ou prontuário com informações insuficientes.

A extração do DNA e o teste para HPV foram realizados pela equipe técnica do Biobanco de Tumores. A extração foi feita de forma automatizada no equipamento *QIAasympphony* (Qiagen, CA, EUA), utilizando o protocolo BC400-V7 do *QIAasympphony DNA Mini kit* (Qiagen, CA, EUA). Neste protocolo foi feito um tratamento adicional do DNA com a enzima RNase A (7.000 U/mL) (Qiagen, CA, EUA). O teste de positividade para HPV foi realizado por meio de imunohistoquímica para a proteína p16 ou com *LINEAR ARRAY® HPV Genotyping Test* (Roche, Canada).

A etapa de validação experimental foi realizada no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Amor, em Barretos, São Paulo.

3.4.2.2 Desenho dos *primers*

Foram utilizados *primers* adquiridos da *Exxtend* para os diferentes CpGs de interesse de acordo com os resultados obtidos da HM450K e TCGA.

Para desenho dos *primers*, foi feito acesso ao arquivo disponibilizado pela Illumina® (fabricante da HM450K), o qual dispõe a sequência *forward* (122pb) das sondas que investigaram cada sítio CpG. Estas sequências foram então importadas para o site *Human Blat Search* a fim de identificar essas regiões no genoma humano.

Com esta ferramenta, foi possível identificar a sequência com 100% de correspondência à região do sítio CpG investigado e assim obter uma sequência maior, em torno de 900 pb para desenho dos *primers*.

As regiões correspondentes à ilha CpG, SNPs e regiões repetitivas foram marcadas em cores de fácil distinção na sequência.

Esse trecho do DNA foi então transferido para arquivo Word (2016), onde foi destacado o CpG de interesse investigado pela sonda da HM450K.

Para simular a conversão por bissulfito foram realizadas as seguintes etapas: substituição de “CG” por “XY”, substituição de “C” por “T” e, por fim, substituição de “XY” por “CG”.

Assim, foram desenhados três *primers*: um de sequenciamento (S), um *forward* (F) e um *reverse* (R). Os *primers* foram desenhados de acordo com os seguintes critérios: tamanho de 18 a 28 pb; não conter “CG”, regiões repetitivas ou SNPs. O *primer* F não poderia ter 3 C’s ou G’s dentre os cinco primeiros nucleotídeos; e o *primer* R não poderia ter 3 C’s ou G’s dentre os cinco últimos nucleotídeos. Os *primers* F e R deveriam ter a mesma quantidade de C ou G e pelo menos 50% destas bases em sua composição; temperatura de anelamento acima de 50 °C; fragmento amplificado (*amplicon*) menor que 400 pb. O *primer*

S deveria seguir as mesmas regras devendo estar há pelo menos 12 pb antes do CpG de interesse.

Para maior efetividade da reação de PCR, foi utilizada a ferramenta *OligoAnalyZer* (2019) disponibilizado em plataforma online pela *Integrated DNA Technologies* (IDT) para checagem das características dos *primers*: conteúdo CG, temperatura de anelamento, sequência complementar, *hairpin* (evidencia a possibilidade da estrutura do *primer* anelando sobre ele mesmo), *self-dimer* (*forward* anela-se a outro *forward*) e *hetero-dimer* (*forward* anela-se a um *primer reverse*).

As sequências *forward*, *reverse* e de sequenciamento podem ser vistas no Quadro 1.

Quadro 1- *Primers* desenhados utilizados na PCR e pirosequenciamento

Gene	Primer	Sequência
APC	F	5' TGGTTTAGTTAGTGGAGTG 3'
	R	5' TTACTTCCCCAAAATCCA 3'
	Seq	5' TTGTAATATAAT 3'
BRCA1	F	5' TTGGAGAAGTTTAAGGGA 3'
	R	5' CCACAACTCTCCAACCTCT 3'
	Seq	5' ATTTTTTTTCGTGTTTT 3'
FHIT	F	5' AGGTTGAGAGATTGGGG 3'
	R	5' CCCAAAAACCCTCTCACA 3'
	Seq	5' GAAGTAAGTATA 3'
HOXA1	F	5' TAGTGGGAGGTAGTTAGAGTG 3'
	R	5' CCAACTTCACTACCAAACAAC 3'
	Seq	5' TTTTGTTTTATT 3'
WIF1	F	5' GTGGAGAGAGGAGGATATAG 3'
	R	5' CAAACTCCTTAACACCCAAAC 3'
	Seq	5' GGAAAATTTTT 3'

Legenda: F: *forward*; R: *reverse*; Seq: sequenciamento.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.2.3 Conversão do DNA por bissulfito de sódio

Este processo é fundamental para a análise de metilação, haja vista que as citosinas metiladas permanecem como citosinas, enquanto citosinas não-metiladas são convertidas em uracilas, que após amplificação por PCR, são convertidas em timina. O método é considerado padrão ouro para análises de metilação e consiste nas seguintes etapas: denaturação, sulfonação, deaminação, purificação, dessulfonação e eluição das amostras. As amostras foram convertidas por meio do *EZ DNA Methylation-Lightning™ kit* (Zymo Research, Irvine, EUA).

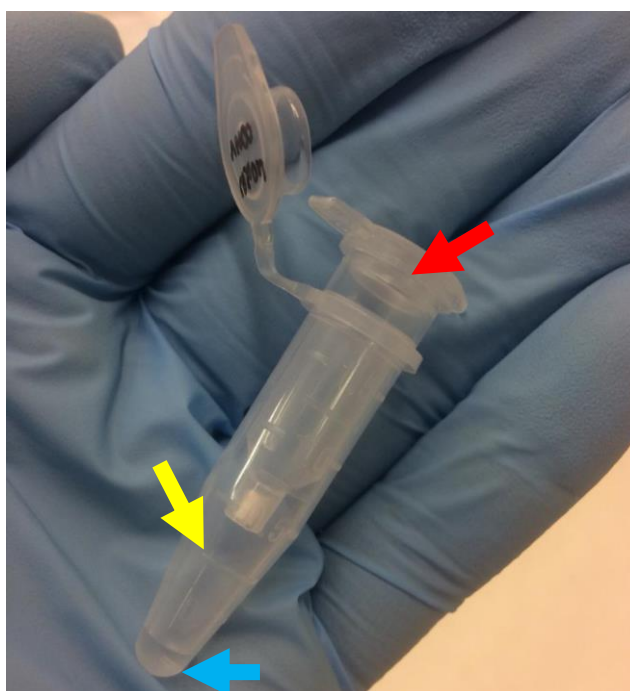
Foi utilizado 1 µg de DNA em um volume total de 20 µL em tubos de 0,2 µL. Para a etapa de denaturação, sulfonação e deaminação foi adicionado 130 µL de *Lightning Conversion Reagent* (Zymo Research) e misturado em vórtex. Os tubos foram postos em um termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, EUA) a 98 °C durante 8 min e 54 °C por 60 min e, por fim, estocado a 4 °C por até 20 horas.

Na segunda etapa de purificação e dessulfonação alcalina, foi adicionado 600 µL de solução tampão *M-Binding Buffer* (Zymo Research) dentro de uma coluna *Zymo-Spin™ IC* (Zymo Research) e esta coluna foi posta em um tubo coletor. Então foi adicionado a amostra de DNA da etapa anterior, foram misturados manualmente por inversão e então colocados em centrífuga durante 30 s em velocidade máxima (14.000 rpm). O sobrenadante foi descartado. Foi então adicionado 100 µL de *M-Wash Buffer* (Zymo Research) e centrifugado por 30 s a 14.000 rpm. Foi adicionado 200 µL de *L-Desulphonation Buffer* (Zymo Research), incubado em temperatura ambiente (25 °C) durante 20 min e depois centrifugado a 14.000 rpm por 30 s. Foi adicionado 200 µL de *M-Wash Buffer* (Zymo Research) e centrifugado por 2 min a 14.000 rpm, essa etapa de lavagem

foi realizada duas vezes.

A coluna foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e foram adicionados 40 μ L de água ultrapura a sua matriz. O tubo foi deixado em temperatura ambiente por 3 min e então foi centrifugado a 14.000 rpm durante 30 s para eluir o DNA (Figura 4). O material seguiu então para amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) ou foi estocado a -20 °C.

Figura 4 - Coluna *Zymo-Spin*TM IC e tubo contendo DNA eluído



Legenda: Observa-se a Coluna *Zymo-Spin*TM IC (seta vermelha) onde ocorre a etapa de dessulfonação alcalina da uracila sulfonada, proveniente da etapa anterior de conversão realizada no termociclador. A seta amarela aponta para o cubo coletor e a seta azul mostra o DNA eluído e convertido.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.4.2.4 Amplificação do DNA por PCR e eletroforese

Após o tratamento com bissulfito de sódio, cada amostra de DNA foi amplificada utilizando o Kit *HotStarTaq DNA Polymerase* (Qiagen) com um *primer reverse* marcado com biotina.

Foi feito um Mix contendo: 17,05 µL de H₂O, 2,5 µL do *Buffer* 10X, 0,5 µL de desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs) (100 mM), 0,5 µL de *primer forward* (10 µM), 0,5 µL de *primer reverse* (10 µM) e 0,2 µL de Taq DNA polimerase (2,5 U/µL). Foi transferido 22 µL deste mix para tubos de PCR, adicionando também 3 µL do DNA convertido. Os tubos foram transferidos para o termociclador *Veriti* (Applied Biosystems, Foster City, EUA), onde à princípio passaram por um ciclo de 15 min a 95 °C para ativação da *HotStarTaq* DNA polimerase, seguido por 45 ciclos sucessivos, envolvendo as seguintes etapas: denaturação: 30 s a 94 °C; anelamento: 30 s a 57 °C (*primers BRCA1, HOXA1 e WIF1*) e 59 °C (*FHIT*); extensão: 30 s a 72 °C.

Para avaliar a efetividade da reação de PCR, 3 µL do produto foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5% com corante *GelRed™* (Biotium). Foi utilizado um marcador molecular de 1kb (Invitrogen) para checagem do tamanho do *amplicon* e integridade das amostras.

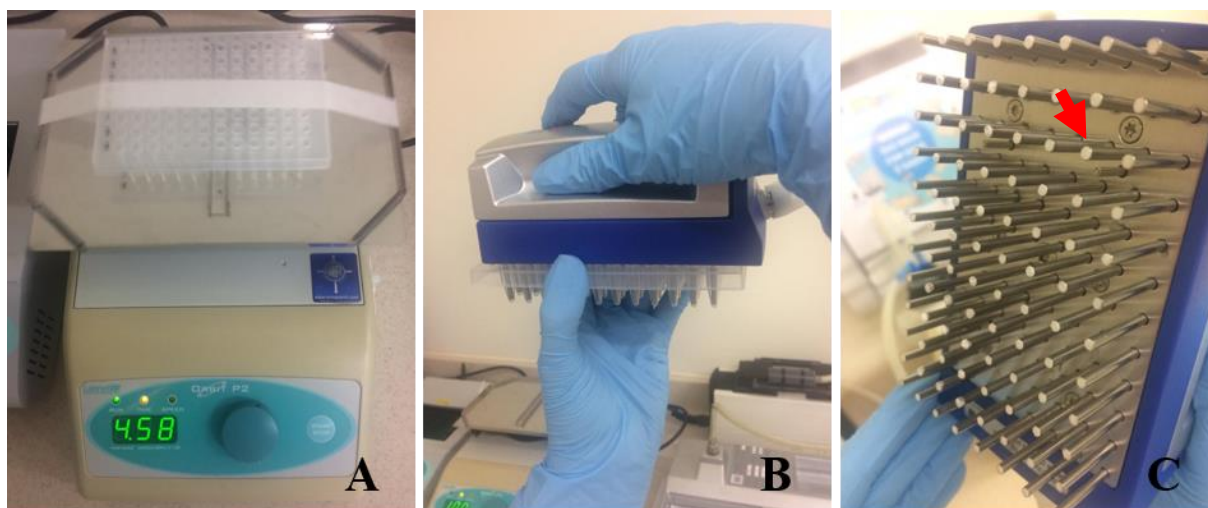
3.4.2.5 Pirosequenciamento

Foi adicionado 60 µL do mix contendo 3 µL de estreptavidina (*Streptavidin Sepharose GE*, Healthcare), 40 µL de tampão de ligação (*Binding Buffer*, Qiagen) e 17 µL de H₂O MilliQ em cada poço de uma placa de PCR e em seguida foi

adicionado 20 μ L de cada amostra (produto da PCR). Essa placa foi agitada por 10 min a 1400 rpm para ligação da biotina as *beads* presentes na streptavidina e posteriormente submetida a bomba vácuo (*PrepStation*).

A bomba foi encaixada na placa de PCR e o vácuo ligado para drenagem do líquido e captura do DNA pelas *beads* (Figura 5).

Figura 5 – Purificação das amostras de DNA obtidas da reação de PCR



Legenda: A: Agitador no qual a placa de PCR contendo as amostras foi colocada a 1400 rpm por 10 min. B: Ferramenta *PrepStation* sugando o conteúdo dos poços. C: DNA ligado a estreptavidina, onde cada ponta (seta vermelha) corresponde à amostra de um poço.

Fonte: Elaborado pela autora.

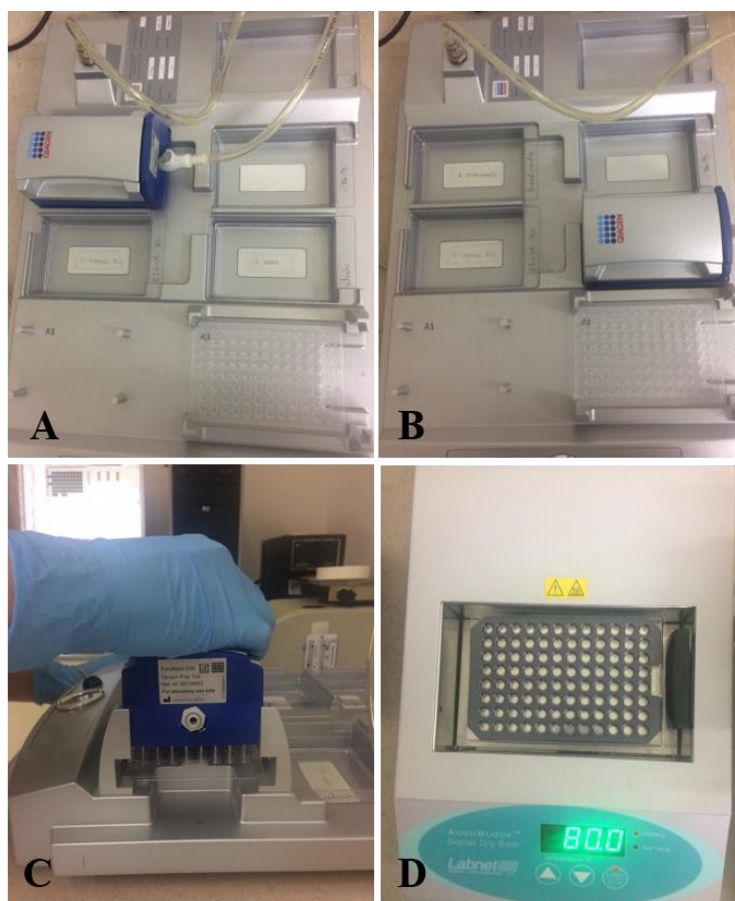
Em seguida o pente contendo as amostras foi lavado em 100 mL de etanol 70%, seguido por 100 mL de solução de denaturação utilizando o *PyroMark Denaturation Solution* (Qiagen) e, por fim, foi feita outra lavagem utilizando 100 mL do *PyroMark Washing Buffer* (Qiagen).

O produto já purificado foi então transferido do pente para uma placa de sequenciamento (*PSQ 96 low plate*) contendo em cada poço 38,4 μ L de tampão

de anelamento (*Annealing Buffer*, Qiagen) e 1,6 μ L do *primer* de sequenciamento (10 mM).

Posteriormente a placa foi incubada a 80 °C por 3 min e resfriada a temperatura ambiente por 10 min, seguida de 10 min a 8 °C para anelamento dos *primers* de sequenciamento (Figura 6).

Figura 6 – *Workstation* utilizada para lavagens das amostras e transferência para placa de sequenciamento



Legenda: A: Segunda lavagem em solução denaturante. B: Última etapa de lavagem no *Washing Buffer* (Qiagen). C: Processo de transferências das amostras fixadas no pente para a placa de sequenciamento contendo tampão de anelamento e os *primers* de sequenciamento. D: Placa de sequenciamento posta no termobloco durante 03 min a 80 °C.

Fonte: Elaborado pela autora.

O produto purificado e ligado aos *primers* de sequenciamento foi transferidos para o equipamento *PSQ HS 96A Pyrosequencer* (Qiagen, Valencia, CA) (Figura 7), juntamente com um cartucho (Figura 8) contendo as enzimas (ATP sulfúrilase, luciferase e apirase), substratos (adenosina 5-fosfo-sulfato e luciferina) e dNTPs, reagentes do kit *Pyromark Gold Q96* (Qiagen, Valencia, CA). Neste equipamento foi realizado o sequenciamento em tempo real das regiões avaliadas e, para garantir a confiabilidade dos dados, foram utilizados controles comerciais (*Qiagen*) 100% metilado e 0% metilado.

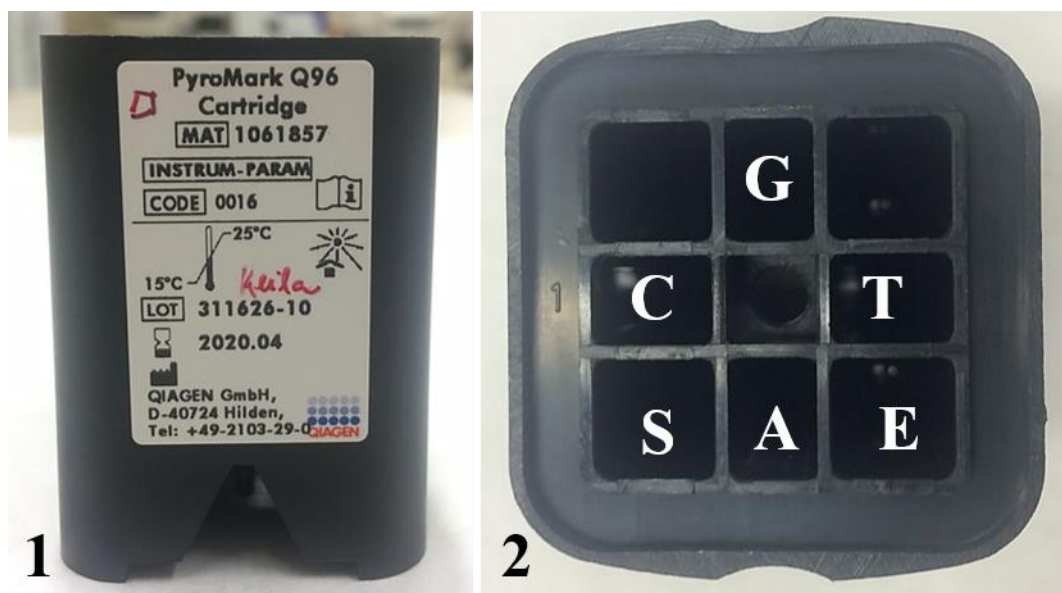
O nível de metilação de cada CpG foi quantificado com base no SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) gerado na posição da citosina após conversão de bissulfito de sódio (citosinas metiladas permanecem como citosinas, enquanto citosinas não-metiladas serão convertidas em timina).

Figura 7 – Pirosequenciador utilizado para quantificar os níveis de metilação



Legenda: *PSQ HS 96A Pyrosequencer* (Qiagen, Valencia, CA).
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 8 - Cartucho contendo enzimas, substratos e dNTPs utilizados no pirosequenciamento



Legenda: 1: Cartucho em vista frontal. 2: Cartucho vista superior, apontando os locais de dispensação dos reagentes utilizados no pirosequenciamento, sendo G - guanina, C - citosina, T - timina, S - substrato, A - adenina e E - Enzimas.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Processamento de dados e análise estatística

O programa *PyroMark CpG* foi utilizado durante o pirosequenciamento e para posterior análise da porcentagem de metilação. Todos os resultados foram correlacionados com os dados clínicos, histopatológicos e prognóstico dos casos de CCEB.

Os dados paramétricos obtidos receberam tratamento estatístico utilizando o teste t de Student e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. Para associação entre as variáveis foi utilizada correlação de Pearson ou Spearman. Em todos os testes foi adotado um nível de significância

de 5%.

A análise estatística foi executada no *software* GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste *post-hoc* foi utilizado para definir a significância das diferenças estatísticas entre as médias pelo *software* GPower 3.1.9.4 (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Germany).

4 RESULTADO

4.1 Rastreamento global *in silico* realizada a partir de pacientes obtidos em colaboração com o ACCCC

4.1.1 Casuística

O perfil de metilação investigado na HM450K incluiu 53 amostras de DNA de CCEB e 53 amostras de DNA de TA. Destas amostras, 40 (75,5%) pertenciam a pacientes do sexo masculino e 13 (24,5%) a pacientes do sexo feminino.

A idade média das mulheres foi de 52,62 ($\pm 13,53$) anos e dos homens 57,25 ($\pm 12,11$) anos. Nesse grupo, havia 17 amostras (32,1%) com diagnóstico positivo para o vírus HPV e 36 negativos (67,9%), 38 amostras eram de fumantes (71,7%) e 15 de não-fumantes (28,3%).

A língua foi o sítio mais acometido pelo CCEB, representando 75,5% das lesões. As características clínico-patológicas dos pacientes podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados clínico-patológicos dos pacientes participantes do estudo de metilação global utilizando a plataforma HM450K

Variável	Categoria	n	%
Sexo	Masculino	40	75.5%
	Feminino	13	24.5%
Tabagismo	Sim	38	71.7%
	Não	15	28.3%
HPV	Positivo	17	32.1%
	Negativo	36	67.9%
Sítio anatômico	Língua	40	75.5%
	Assoalho	4	7.5%
	Palato	4	7.5%
	Outros	5	9.4%
Estágio clínico	I/II (inicial)	16	30.2%
	III/IV (avançado)	37	69.8%

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Análise do perfil de metilação dos 24 genes alvo no CCEB e tecido adjacente

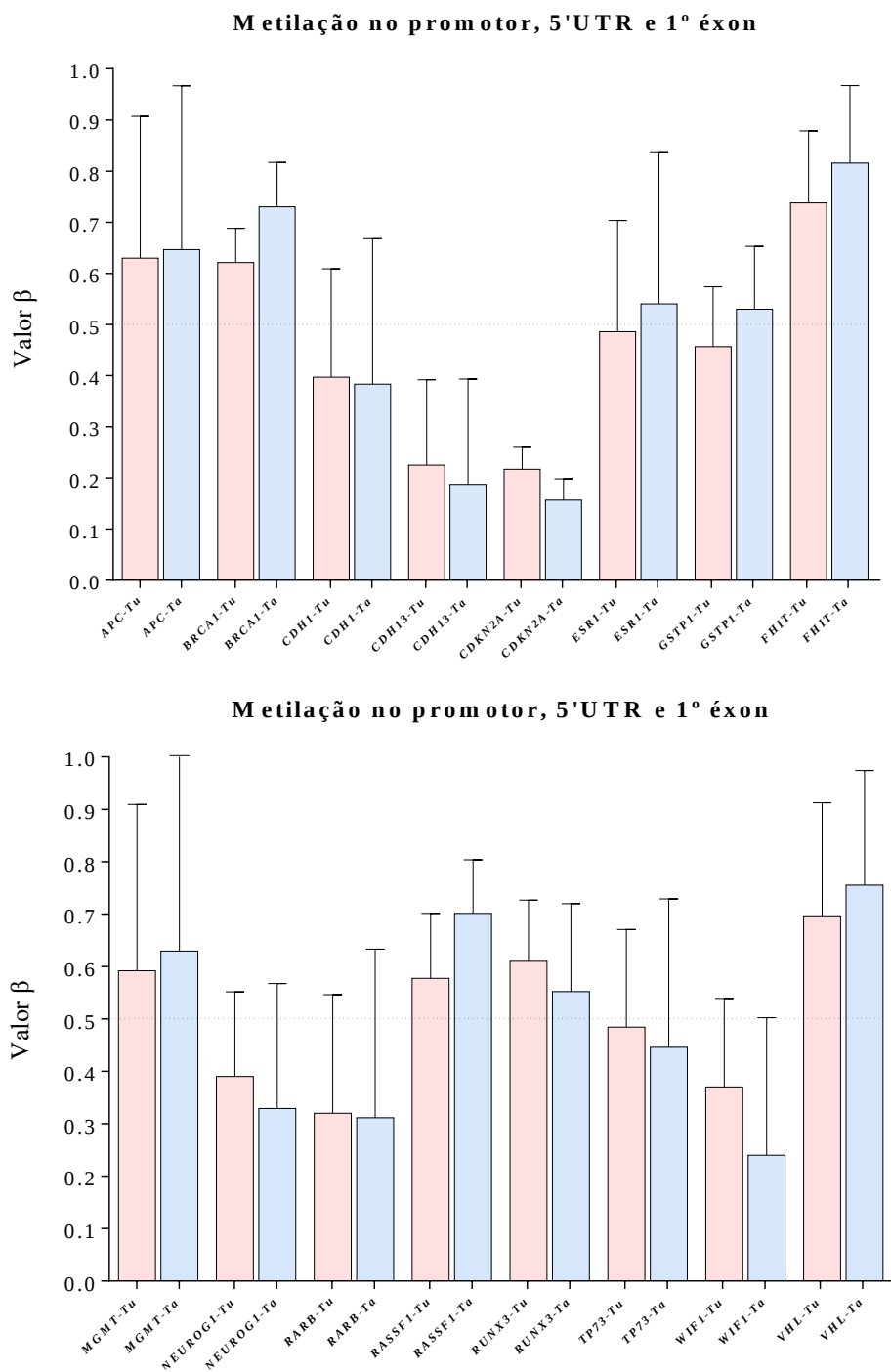
A análise por meio da HM450K foi realizada em amostras de 53 pacientes com CCEB e 53 amostras de tecido adjacente. O nível de metilação dos sítios CpGs foi quantificado pelo valor β , que significa a proporção de sondas para um sítio CpG específico que se mostraram metiladas. Esse valor é calculado pela intensidade da sonda metilada dividida pela soma da intensidade das sondas metiladas e não metiladas. O valor β varia de zero (sítio CpG desmetilado) a um (sítio CpG totalmente metilado). Foram utilizados controles comerciais 0 e 100% metilados (Qiagen, Hilden, Alemanha).

A investigação dos genes alvos no estudo interno realizado na HM450K revelou 1.076 sondas cobrindo os 24 genes alvos. Dentre essas sondas, 463 apresentaram $p \leq 0,01$ e $FDR \leq 0,01$. Essas sondas receberam agrupamento por gene e região gênica, assim os resultados abaixo são apresentados em dois grupos, sendo um para região promotora, 1º éxon e região 5'UTR (causam possível supressão da expressão gênica) e outro para corpo gênico e região 3'UTR (regiões que podem levar ao aumento da expressão gênica). Foram considerados apenas os genes que apresentaram no mínimo três sítios CpGs (três sondas) em pelo menos um dos grupos acima.

O único gene que apresentou diferença estatística entre o CCEB e o tecido adjacente foi *MGMT* no corpo gênico e/ou região 3'UTR, com β valor médio de $0,79 \pm 0,16$ no CCEB e $0,85 \pm 0,26$ no tecido adjacente ($p = 0,028$).

Os genes *APC*, *BRCA1*, *FHIT*, *MGMT*, *RASSF1*, *RUNX3* e *VHL* estavam hipermetilados ($\beta > 0,50$) no CCEB e no tecido adjacente na região promotora, 1º éxon e/ou 5'UTR (Figura 9). Por sua vez, os genes *CDH1*, *CDH13*, *CDKN2A*, *ESR1*, *GSTP1*, *NEUROG1*, *TP73* e *WIF1* mostraram-se hipometilados ($\beta \leq 0,50$) em ambos os tecidos (Figura 10).

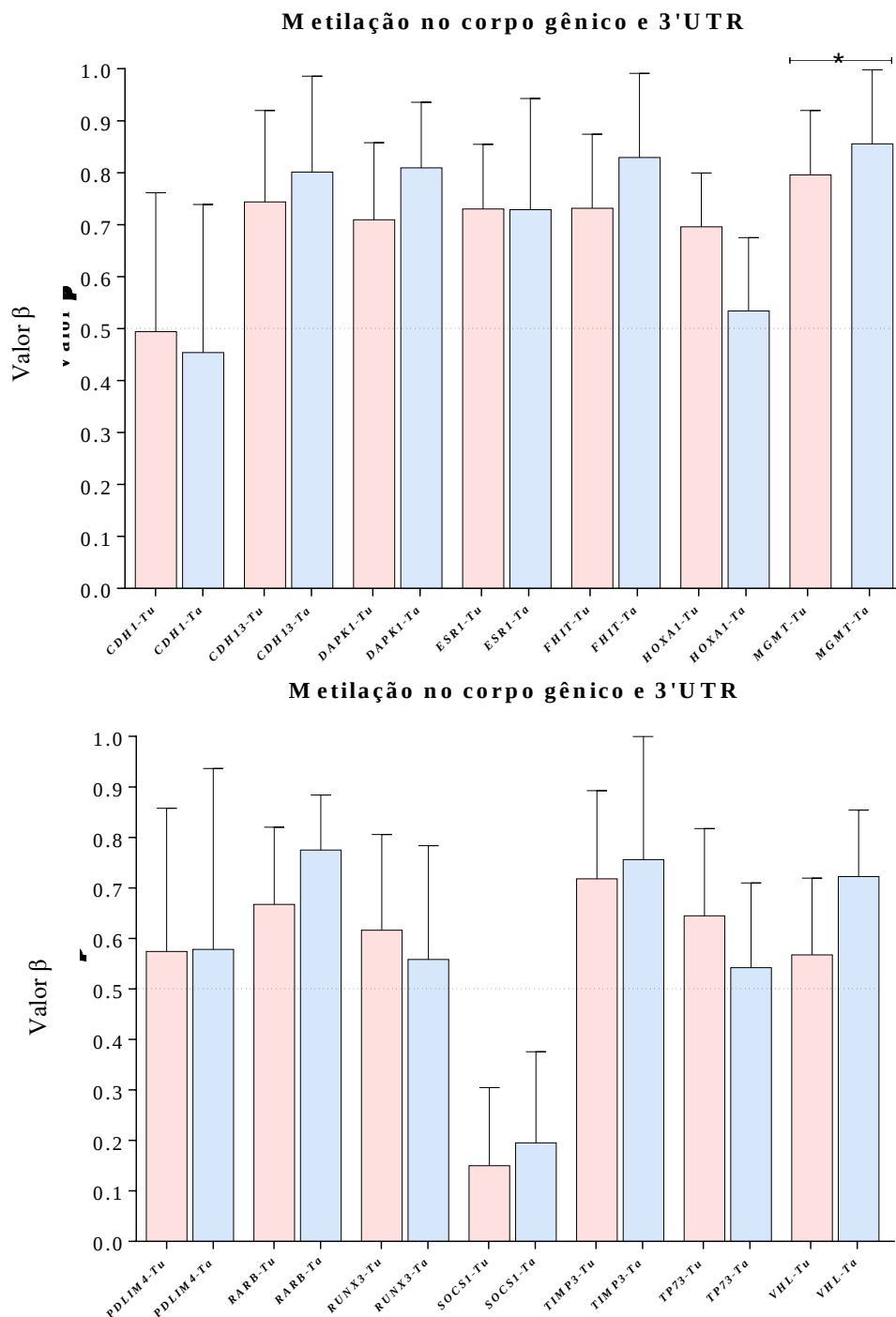
Figura 9 - Média dos valores β obtidos na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon no CCEB e no tecido adjacente



Legenda: Tu: CCEB; Ta: tecido adjacente. Acima da linha pontilhada, observa-se genes hipermetilados ($\beta > 0,50$) e abaixo dela, hipometilados ($\beta \leq 0,50$). Não houve diferença estatística entre CCEB e tecido adjacente nesta região.

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 10 - Média dos valores β obtidos no corpo gênico e/ou 3'UTR no CCEB e no tecido adjacente



Legenda: Tu: CCEB; Ta: tecido adjacente. *: $p = 0,028$. Acima da linha pontilhada, observa-se genes hipermetilados ($\beta > 0,50$) e abaixo, hipometilado ($\beta \leq 0,50$). O gene *MGMT* foi o único a apresentar diferença estatística significativa entre o CCEB e tecido adjacente nesta região.

Fonte: Elaborado pela autora.

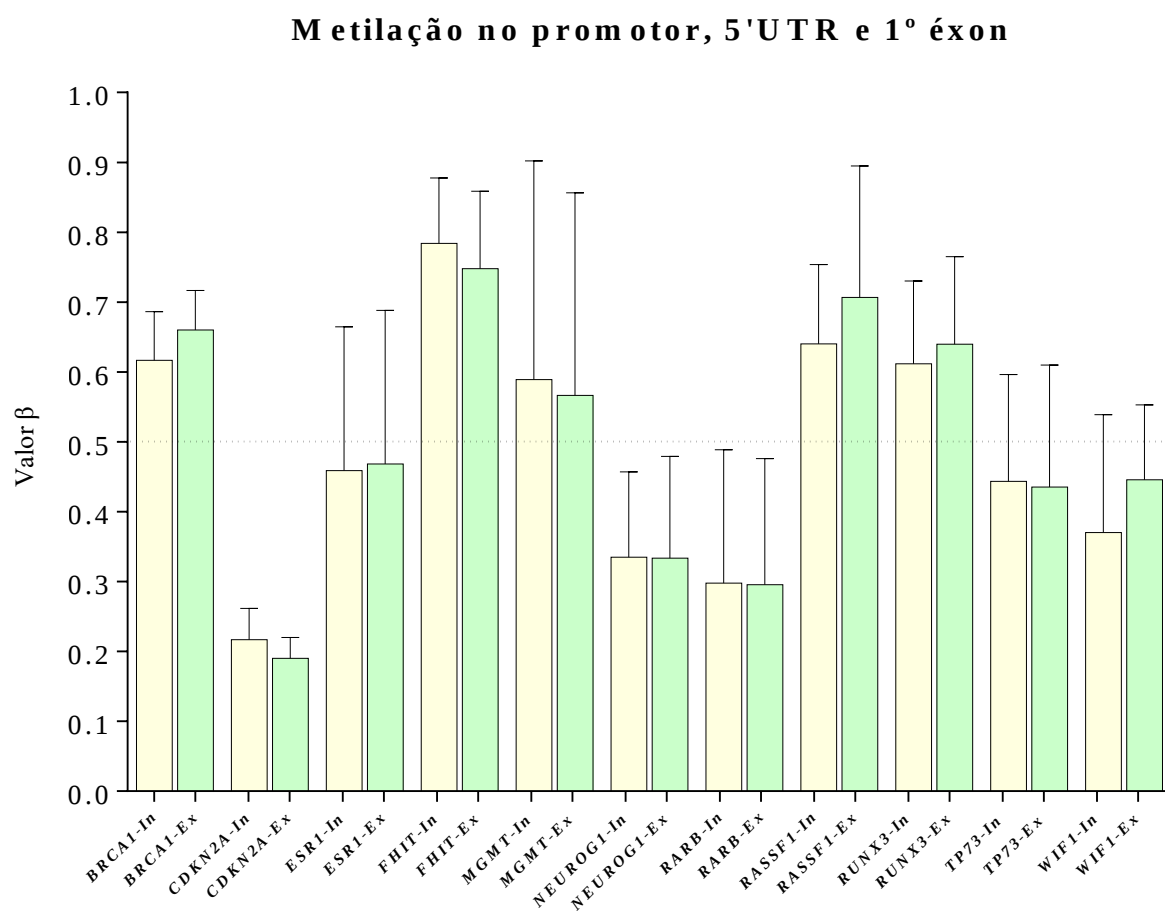
4.1.2.1 Validação *in silico* do perfil de metilação dos 24 genes alvo no CCEB a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)

Os dados disponíveis no UCSC Xena referentes aos carcinomas de boca rastreados pelo consórcio TCGA foram utilizados para validar o perfil de metilação obtido no estudo interno para os diferentes sítios CpGs nas amostras de CCEB. Assim, após aplicação dos mesmos critérios de busca, foram identificadas 599 sondas que investigaram os 24 genes alvos.

Essas sondas foram comparadas aos resultados obtidos no estudo interno por meio da plataforma HM450K e assim foram identificados 335 sítios comuns ao estudo interno e externo.

Na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon foram validados 143 sítios pertencentes a 11 genes, com ao menos três sítios em ambos os estudos. Dentre estes sítios, os que estavam hipermetilados pertenciam aos genes *BRCA1*, *FHIT*, *MGMT*, *RASSF1* e *RUNX3* (Figura 11). Apenas os genes *BRCA1* e *RUNX3* apresentaram sítios hipermetilados em ilha CpG, $\beta = 0,61$ e $\beta = 0,63$, respectivamente.

Figura 11 - Médias de valores β obtidas no estudo interno (HM540K) e externo (TCGA) para os genes que apresentaram pelo menos três sítios CpGs hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon



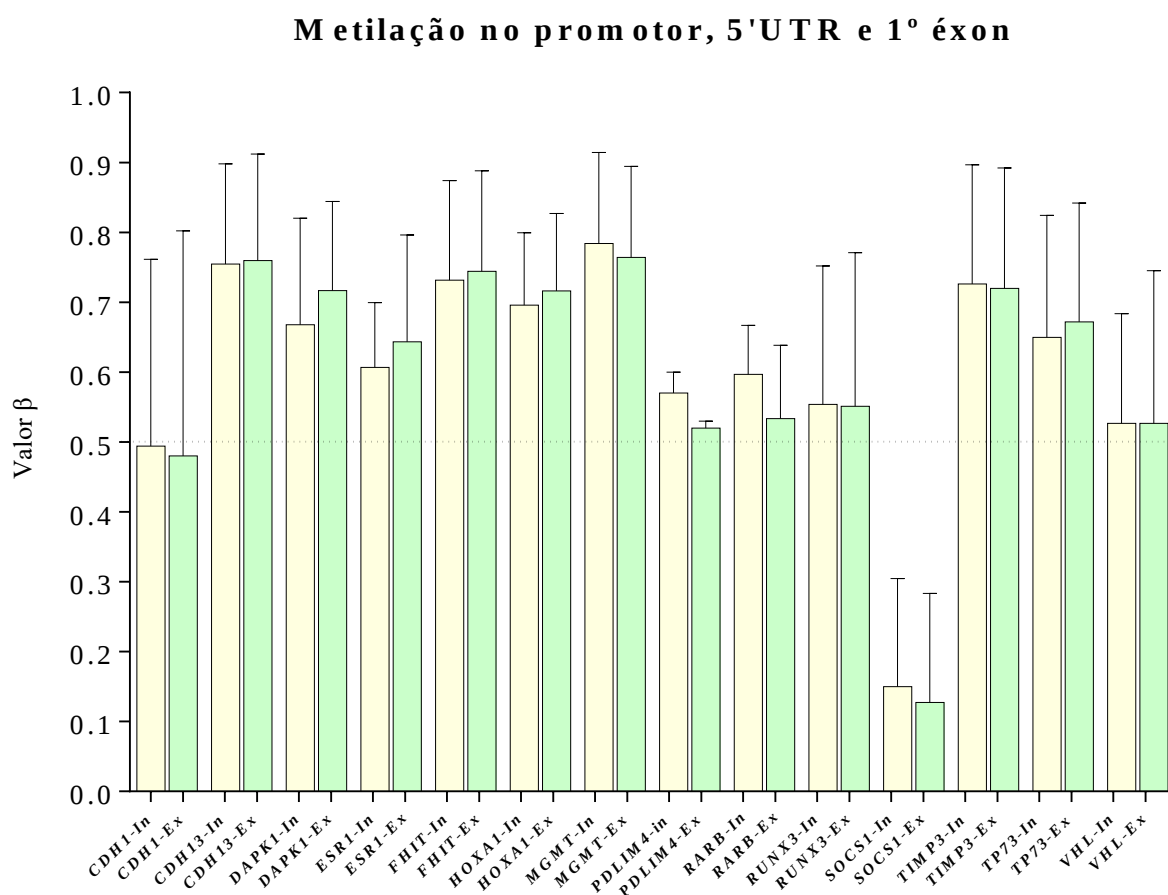
Legenda: Int: interno - HM450K; Ex: TCGA. Média dos valores β por gene de acordo com o estudo interno (amarelo) e externo (TCGA - verde). Considerou-se apenas os genes com pelo menos três sítios CpGs investigados nas regiões promotora, 5'UTR e 1º éxon, independentemente da localização em relação à ilha CpG. A linha pontilhada identifica os genes com $\beta > 0,50$ (hipermetilado).

Fonte: Elaborada pela autora.

Na região de corpo gênico e/ou 3'UTR foram observados 181 sítios hipermetilados, pertencentes a 14 genes com pelo menos três sítios comuns a ambos os estudos. Dentre estes, foram observados sítios CpGs hipermetilados

pertencentes aos genes *CDH13*, *DAPK1*, *FHIT*, *HOXA1*, *MGMT*, *PDLIM4*, *RARB*, *RUNX3*, *SOCS1*, *TIMP3*, *TP73* e *VHL* (Figura 12).

Figura 12 - Médias de valores β obtidas para os genes que apresentaram no mínimo três sítios hipermetilados em região 5'UTR, 1º éxon e 3'UTR



Legenda: Int: interno - HM450K; Ex: TCGA. Média dos valores β por gene de acordo com o estudo interno (amarelo) e externo (TCGA - verde). Considerou-se apenas os genes com pelo menos três sítios CpGs investigados nas regiões de corpo gênico e 3'UTR, independentemente da localização em relação à ilha CpG. A linha pontilhada identifica os genes com $\beta > 0,50$ (hipermetilado).

Fonte: Elaborada pela autora.

Nenhum gene apresentou diferença estatística significativa entre o estudo

interno e os dados disponíveis no TCGA ($p = 0,14$).

4.1.3 Comparação entre o perfil de metilação de tumores de pacientes fumantes e não-fumantes

Para identificação das posições diferencialmente metiladas (PDM), isto é, sítios CpGs diferencialmente metilados entre pacientes tabagistas e não-tabagistas, foi analisado o perfil de metilação de cada sítio CpG comparando as 38 amostras de CCEB de pacientes fumantes a 15 amostras de CCEB de não-fumantes.

Entretanto, sabe-se que podem ocorrer variações técnicas de forma aleatória no processo de análise, assim, diferenças mínimas de metilação, podem não denotar uma diferença biológica real entre os grupos fumantes e não-fumantes. Destarte, foi considerado um limite inicial absoluto de diferença de metilação ($\Delta\beta$) de 10% entre os grupos estudados, ou seja, o valor β do grupo fumante menos o valor β do grupo não-fumante ($\Delta\beta$) deveria ser no mínimo de 0,10 ou 10%. Essa porcentagem foi selecionada com base em estudos prévios (Dedeurwaerder et al., 2014; Imgenberg-Kreuz et al., 2016; Peters et al., 2015). Assim, robustecendo, o sítio CpG foi considerado diferencialmente metilado entre os grupos de CCEB fumantes e não-fumantes quando $\Delta\beta \geq 10\%$, sendo FDR e p valor $< 0,01$.

Apesar de terem sido identificados alguns sítios com $\Delta\beta \geq 10\%$ em CCEB de pacientes tabagistas para os genes *ESR1*, *MGMT*, *FHIT*, *NEUROG1* e *TP73*, esses sítios apresentaram FDR $> 0,01$, tornando estes achados poucos confiáveis (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre os níveis de metilação entre tumores de pacientes tabagistas e não-tabagistas

Sonda	Gene	$\Delta\beta$	<i>p</i> valor	FDR
cg21608605	<i>ESR1</i>	-0.12	0.005	0.811
cg17706972	<i>ESR1</i>	-0.10	0.010	0.811
cg25145165	<i>MGMT</i>	-0.10	0.014	0.811
cg15570148	<i>FHIT</i>	-0.10	0.017	0.811
cg04330449	<i>NEUROG1</i>	0.11	0.022	0.811
cg00295572	<i>TP73</i>	0.11	0.029	0.811
cg04391111	<i>TP73</i>	0.11	0.035	0.811
cg04897683	<i>NEUROG1</i>	0.12	0.044	0.811

Legenda: A primeira coluna mostra as sondas da HM450K que investigaram os sítios CpGs pertencentes aos genes da segunda coluna. Estes sítios apresentaram valor diferencial de metilação ($\Delta\beta$) $\geq 10\%$ na comparação entre tumor de paciente tabagista e não-tabagista, entretanto, não foram considerados para as próximas análises por apresentarem $FDR > 0,01$.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.4 Comparação entre o perfil de metilação do tecido tumoral e adjacente

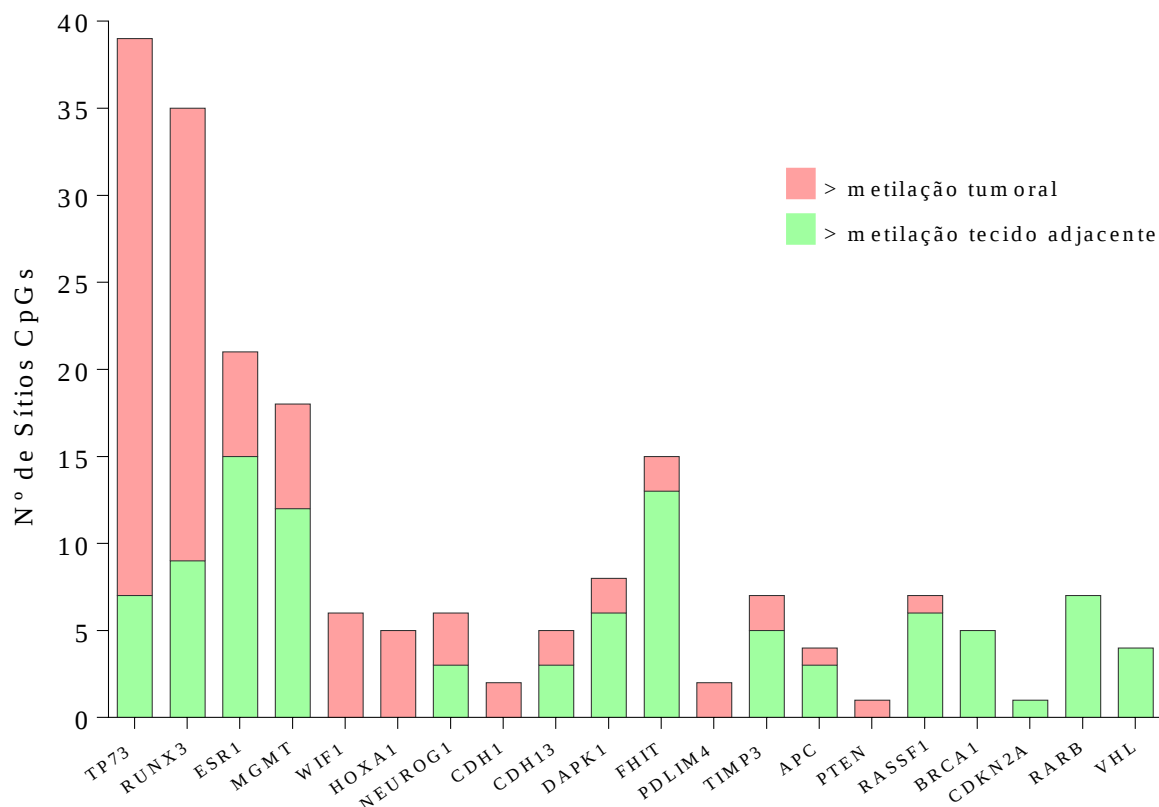
Nesta análise, objetivou-se encontrar uma diferença ($\Delta\beta$) significativa, ou seja, PDMs entre as amostras de CCEB e o tecido adjacente, considerando os mesmos critérios dispostos acima ($\Delta\beta \geq 10\%$, p valor $< 0,01$ e $FDR < 0,01$). Para tanto, comparou-se os valores de metilação entre as 53 amostras de tumor e seus respectivos tecidos adjacentes. Dessarte, foram encontrados 198 PDMs em CCEB quando comparado ao tecido adjacente.

Estes sítios CpGs diferencialmente metilados pertenciam a 20 genes, sendo estes: *APC* (4/198 - 2,0%), *BRCA1* (5/198 - 2,5%), *CDH1* (2/198 - 1%), *CDH13* (5/198 - 2,5%), *CDKN2A* (1/198 - 0,5%), *DAPK1* (8/198 - 4%), *ESR1* (21/198 - 10,6%), *FHIT* (15/198 - 7,6%), *HOXA1* (5/198 - 2,5%), *MGMT* (18/198 - 9,1%),

NEUROG1 (6/198 - 3%), *PDLIM4* (2/198 - 1%), *PTEN* (1/198 - 0,5%), *RARB* (7/198 - 3,5%), *RASSF1* (7/198 - 3,5%), *RUNX3* (35/198 - 17,7%), *TIMP3* (7/198 - 3,5%), *TP73* (39/198 - 19,7%), *VHL* (4/198 - 2%) e *WIF1* (6/198 - 3%).

Dentre as 198 PDMs, 99 (50%) apresentaram maior metilação no tecido tumoral e 99 (50%) maior metilação no tecido adjacente. A Figura 13 apresenta das PDMs conforme o gene e *status* de metilação.

Figura 13 - PDMs distribuídas por gene e *status* de metilação nos tecidos tumorais e adjacentes



Legenda: Observa-se a distribuição dos 198 sítios CpGs diferencialmente metilados no tumor quando comparado ao tecido adjacente ($\Delta\beta \geq 10\%$, p valor $< 0,01$ e FDR $< 0,01$). O tamanho total de cada barra representa o número de posições diferencialmente metiladas por gene, a região em vermelho refere-se ao número de sítios CpGs com maior β valor no CCEB e em verde, aos sítios com maior β valor no tecido adjacente.

Fonte: Elaborada pela autora.

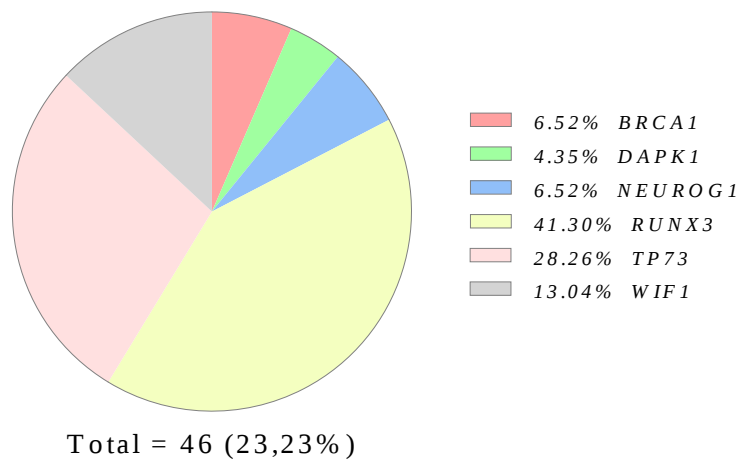
Foram observadas 109 PDMs no CCEB localizadas na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon de 13 genes, correspondendo a 55,05% do total destes sítios CpGs diferencialmente metilados.

Dentre esses sítios, 46 estavam localizados em ilha CpG, sendo estes pertencentes aos genes *BRCA1* (03), *DAPK1* (02), *NEUROG1* (03), *RUNX3* (19), *TP73* (13) e *WIF1* (06). Os outros 63 (31,81%) sítios eram dos genes *APC* (04), *BRCA1* (02), *ESR1* (17), *FHIT* (09), *MGMT* (01), *NEUROG1* (03), *RASSF1* (06),

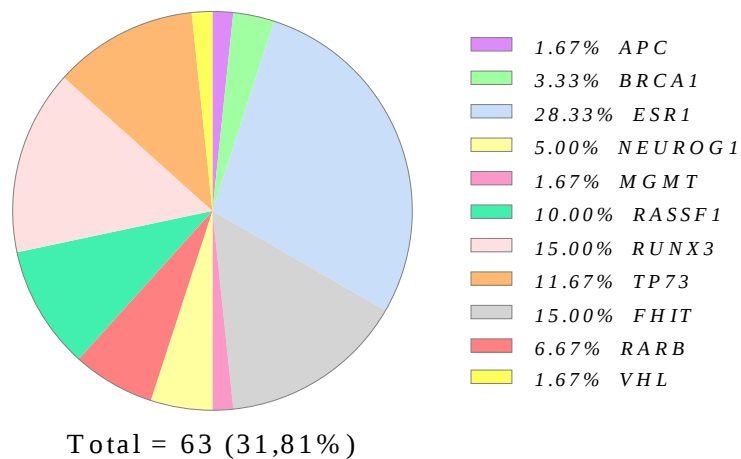
RUNX3 (09) e *VHL* (01) em região *shore*, *shelf* ou *open sea* (Figura 14).

Figura 14 - Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente, conforme região gênica e localização em relação à ilha CpG

Promotor, 5'UTR e 1º éxon - ilha CpG



Promotor, 5'UTR e 1º éxon - shore, shelf e open sea



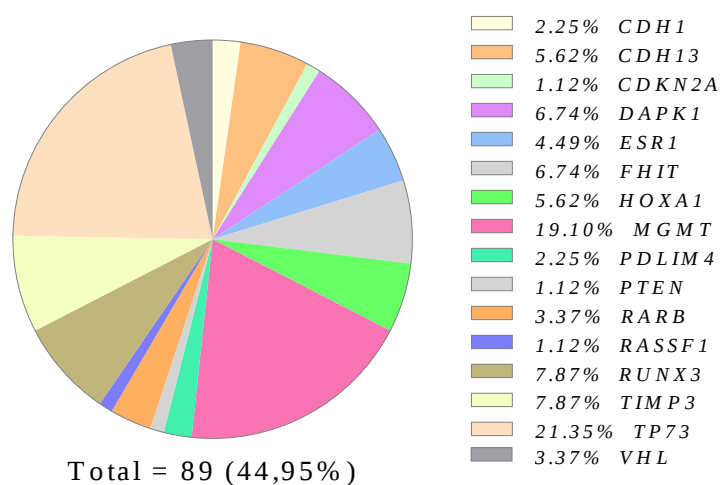
Legenda: PDMs identificadas na região promotora localizadas em ilhas CpG e PDMs identificadas na região promotora localizadas em região *shore*, *shelf* ou *open sea* em relação à ilha CpG.

Fonte: Elaborado pela autora.

No corpo gênico e região 3'UTR, independentemente da localização em relação à ilha CpG, foram observados 89 (44,95%) PDMs no tecido tumoral, sendo estas pertencentes aos genes *CDH1* (02), *CDH13* (05), *CDKN2A* (1), *DAPK1* (06), *ESR1* (04), *FHIT* (06), *HOXA1* (05), *MGMT* (17), *PDLIM4* (02), *PTEN* (01), *RARB* (03), *RASSF1* (01), *RUNX3* (07), *TIMP3* (07), *TP73* (19) e *VHL* (03), essa distribuição pode ser observada na Figura 15.

Figura 15 - Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente, conforme região gênica e localização em relação à ilha CpG

Corpo gênico e 3'UTR



Legenda: PDMs identificadas no CCEB na região do corpo dos genes e 3'UTR.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.4.1 Validação *in silico* do sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB comparado ao tecido adjacente a partir de dados obtidos no TCGA (HM450K e RNA-Seq)

As PDMs diferencialmente metiladas na análise anterior foram validadas *in silico* por meio de comparação aos dados externos de metilação disponíveis no TCGA, seguindo os mesmos critérios aplicados aos dados internos da plataforma HM450K.

Assim verificou-se que 16 sítios CpGs apresentaram valores diferenciais e significativos de metilação ($\Delta\beta \geq 10\%$, FDR e p valor $< 0,01$) em CCEB comparado ao tecido adjacente, tanto no estudo interno quanto nos estudos externos, sendo que estes cobriram os seguintes genes: *APC*, *BRCA1*, *FHIT*, *HOXA* e *WIF1* (Tabela 3).

A partir do banco de dados TCGA foram obtidos os níveis de transcritos (RNA-seq) de 165 carcinomas de boca e 15 tecidos adjacentes a fim de identificar uma possível relação entre a metilação e a expressão gênica destas PDMs. Os resultados obtidos nestas análises encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre os dados internos de metilação e os dados externos de metilação e expressão disponíveis no TCGA

Sondas	Genes	Região gênica	Ref Ilha	Dados internos HM450K			$\Delta\beta^*$	Dados externos TCGA		
				$\Delta\beta$	<i>p</i> valor	FDR		<i>p</i> valor*	FC [#]	<i>p</i> valor [#]
cg25288140	<i>BRCA1</i>	Promotor	Ilha	-0.15	1.56E-07	9.23E-07	-0.15	3.43E-03	1.85	1.03E-05
cg06973652	<i>BRCA1</i>	Promotor	S_Shore	-0.14	1.20E-06	5.54E-06	-0.17	7.17E-03	1.85	1.03E-05
cg05815247	<i>BRCA1</i>	Promotor	S_Shore	-0.13	2.06E-07	1.18E-06	-0.14	1.27E-03	1.85	1.03E-05
cg24900425	<i>BRCA1</i>	Promotor	Island	-0.11	1.28E-05	4.64E-05	-0.18	6.35E-04	1.85	1.03E-05
cg05645292	<i>FHIT</i>	Corpo	Open Sea	0.10	8.57E-07	4.10E-06	0.13	1.23E-03	-5.21	1.40E-10
cg23497707	<i>APC</i>	5'UTR	S_Shelf	0.11	1.39E-06	6.30E-06	0.18	8.02E-07	-1.51	2.59E-03
cg23865240	<i>HOXA1</i>	3'UTR	Ilha	0.14	1.59E-07	9.33E-07	0.19	2.37E-12	10.55	7.10E-20
cg22154659	<i>HOXA1</i>	3'UTR	N_Shore	0.14	2.29E-07	1.30E-06	0.21	5.14E-15	10.55	7.10E-20
cg07659054	<i>HOXA1</i>	3'UTR	Ilha	0.16	2.98E-08	2.20E-07	0.21	5.51E-13	10.55	7.10E-20
cg18805066	<i>HOXA1</i>	3'UTR	Ilha	0.21	2.64E-12	4.43E-11	0.28	2.48E-16	10.55	7.10E-20
cg26733786	<i>WIF1</i>	5'UTR	Ilha	0.13	7.16E-08	4.61E-07	0.21	2.68E-06	-54.04	2.65E-16
cg19427610	<i>WIF1</i>	5'UTR	Ilha	0.15	3.09E-08	2.26E-07	0.24	1.52E-06	-54.04	2.65E-16
cg24166864	<i>WIF1</i>	Promotor	Ilha	0.18	8.09E-09	6.70E-08	0.31	3.34E-08	-54.04	2.65E-16
cg03509412	<i>WIF1</i>	5'UTR	Ilha	0.19	8.57E-11	1.10E-09	0.30	2.34E-08	-54.04	2.65E-16
cg26397188	<i>WIF1</i>	Promotor	Ilha	0.19	6.04E-09	5.33E-08	0.30	1.85E-08	-54.04	2.65E-16
cg21383810	<i>WIF1</i>	Promotor	Ilha	0.16	6.54E-08	4.29E-07	0.34	7.94E-08	-54.04	2.65E-16

Legenda: FC: *Fold-Change* do nível de expressão no CCEB menos o tecido adjacente. Ref Ilha: Localização em relação à ilha CpG. *: dados de metilação; #: dados de expressão gênica. Observa-se os sítios CpGs diferencialmente metilados encontrados nos dados internos e validados no consórcio TCGA. Os sítios marcados em vermelho apresentam-se mais metilados nas amostras de CCEB e os sítios coloridos em verde mostraram-se menos metilados quando comparado ao tecido adjacente.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2 Sítios CpGs diferencialmente metilados no CCEB quando comparado ao tecido adjacente selecionados para validação experimental

Como mencionado anteriormente, podem ocorrer variações técnicas de forma aleatória no processo de análise, assim, diferenças mínimas de metilação podem não denotar uma diferença biológica real entre os grupos comparados. Deste modo, para maior assertividade nos resultados obtidos *in silico* verificou-se a necessidade de validar as PDMs identificadas no CCEB quando comparadas ao tecido adjacente de forma experimental por uma metodologia quantitativa.

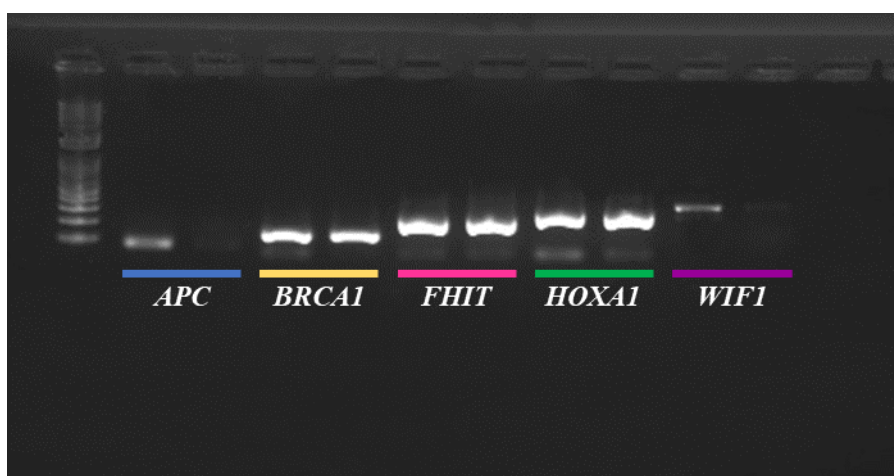
Deste modo, após análise exploratória *in silico* dos dados internos e externos (TCGA), os 16 sítios diferencialmente metilados seriam validados experimentalmente por pirosequenciamento. A primeira etapa deste processo consistiria no desenho manual dos primers de amplificação e sequenciamento das 16 regiões alvo. Entretanto, diante de dificuldades em atingir todos os critérios de qualidade e especificidade no desenho manual dos primers de PCR e sequenciamento, foi escolhido um CpG de interesse por gene:

Estes sítios foram escolhidos com base nas regiões com as melhores sequências, ou seja, ausência de SNPs e regiões repetitivas, e que permitiriam *primers* com boa quantidade de conteúdo CG e temperaturas de *melting* e anelamento adequadas. Assim, foram escolhidos os seguintes sítios: *APC* - cg23497707, *BRCA1* -cg05815247, *FHIT* - cg05645292, *HOXA1* - cg07659054 e *WIF1* - cg03509412.

Durante os testes de padronização realizados com controles comerciais positivos e negativos de metilação (Qiagen), os *primers* dos genes *APC* (cg23497707) e *WIF1* (cg03509412) não apresentaram resultados satisfatórios (Figura 16), portanto a validação experimental foi realizada para os seguintes sítios: *BRCA1* (cg05815247), *FHIT* (cg05645292), *HOXA1* (cg07659054).

Os demais sítios diferencialmente metilados serão validados em trabalhos futuros utilizando o *Software PyroMark Assay Design* (Qiagen) para desenho dos *primers*.

Figura 16 - Eletroforese mostrando o resultado dos testes efetuados como os *primers* para as regiões dos genes *APC*, *BRCA1*, *FHIT*, *HOXA1* e *WIF1*



Legenda: Eletroforese realizada em gel de agarose 1,5% para as regiões de interesse referentes aos genes *APC*, *BRCA1*, *FHIT*, *HOXA1* e *WIF1*. Não foi possível observar bandas correspondente aos genes *APC* e *BRCA1*, os quais não tiveram seus fragmentos amplificados por PCR, portanto os sítios CpGs destes genes não seguiram para validação experimental.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Validação experimental por pirosequenciamento

4.3.1 Casuística

Foram incluídos na validação experimental 11 pacientes do sexo masculino (73,3%) e 04 do feminino (26,7%), sendo 06 (40%) tabagistas ativos, 07 (46,7%) nunca tabagistas e 02 (13,3%) ex-tabagistas. Quanto ao consumo de álcool, 02 (13,3%) pacientes eram ex-etilistas, 06 (40%) não-etilistas, 04 (26,7%) etilistas e 03 (20%) apresentavam consumo social. As características clínico-patológicas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos na validação experimental

Variável	Categoria	n	%
Sexo	Masculino	11	73.3%
	Feminino	04	26.7%
Tabagismo	Não	07	46.7%
	Ex-tabagista	02	13.3%
	Sim	06	40.0%
Etilismo	Não	06	40.0%
	Social	03	20.0%
	Ex-etilista	02	13.3%
	Sim	04	26.7%
HPV	Negativo	02	13.3%
	NI	13	86.7%
Sítio anatômico	Língua	12	80.0%
	Assoalho	03	20.0%
Recidiva	Sim	06	40.0%
	Não	09	60.0%
Estágio clínico	I/II	06	40.0%
	III/IV	09	60.0%

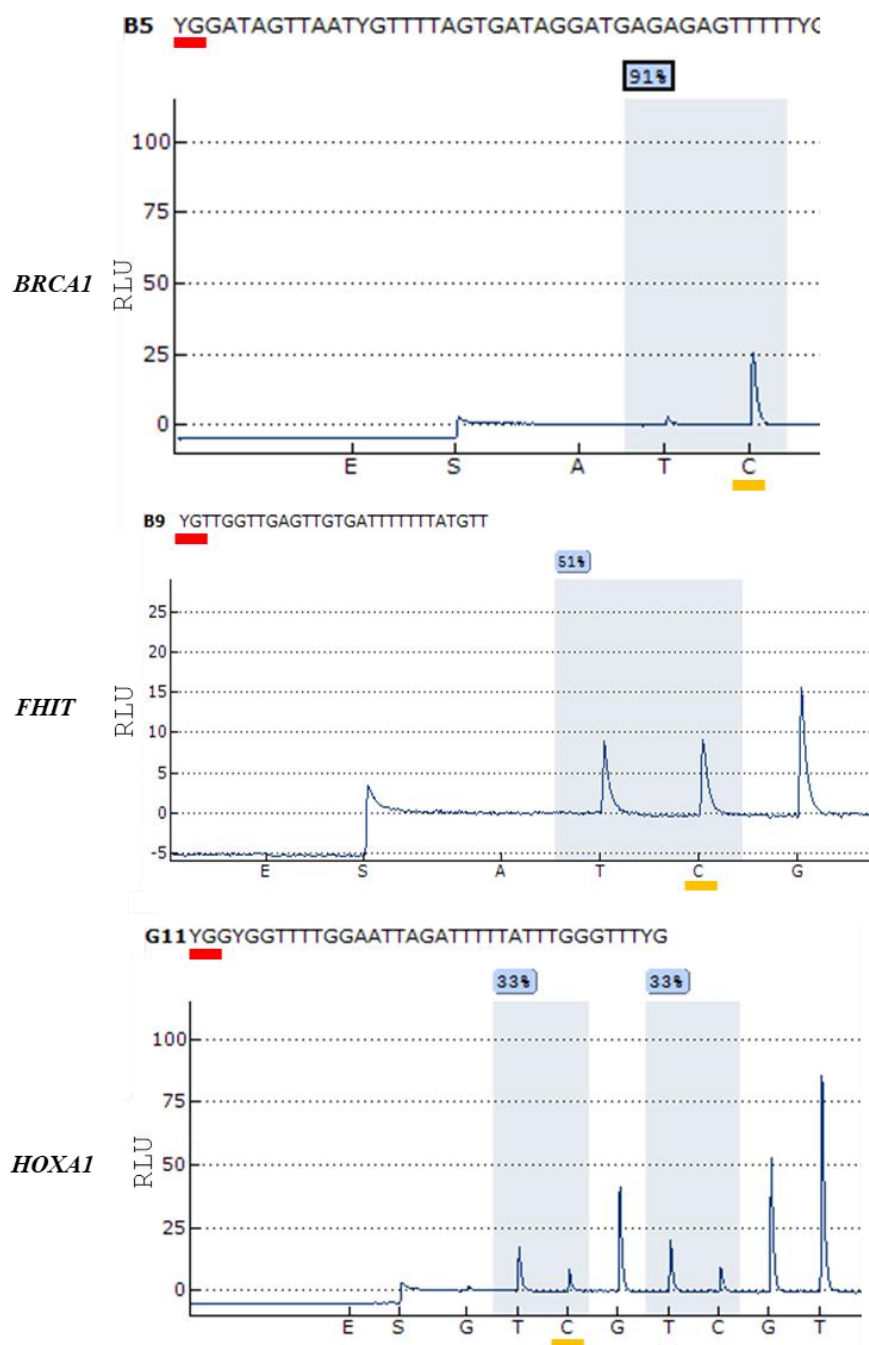
Fonte: Elaborado pela autora.

4.3.2 Análise geral do perfil de metilação dos sítios CpGs

O perfil de metilação dos sítios CpGs investigados pertencentes aos genes *BRCA1*, *FHIT* e *HOXA1*, identificados na HM450K e validados *in silico* com os dados do TCGA, foram também validados experimentalmente por meio da técnica de pirosequenciamento em 30 amostras independentes das utilizadas nos estudos anteriores.

Todos os resultados obtidos foram analisados pelo *PyroMark Q96 Software* (Qiagen) para obtenção da porcentagem de metilação de cada sítio CpG investigado. Exemplos de pirogramas para cada região dos genes estudados podem ser observados na Figura 17.

Figura 17 - Pirogramas obtidos na investigação do nível de metilação dos sítios CpGs dos genes *BRCA1*, *HOXA1* e *FHIT*



Legenda: B5, B9 e B11: poços da placa de sequenciamento onde estavam amostras de tecido adjacente ou CCEB. RLU: *Relative Light Unit* - unidade de luz relativa usada na pirograma para definir altura de um pico. A sequência de nucleotídeos representa a região de anelamento do *primer* de sequenciamento seguida do sítio CpG de interesse sublinhado em vermelho. No eixo X do gráfico, os Cs marcados em amarelo representam sítios com 91%, 51% e 33% de metilação, *BRCA1*, *FHIT* e *HOXA1*, respectivamente.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os três sítios CpGs investigados apresentaram algumas diferenças no padrão de metilação obtidos nas análises anteriores. Assim, o sítio CpG do gene *BRCA1* (promotor; *shore*) apesar de ter se mostrado hipermetilado no tecido tumoral e no tecido adjacente, média de 85,3% e 89,5%, respectivamente, apresentou maior hipermetilação do que as obtidas nos estudos anteriores.

Para o sítio CpG do gene *FHIT* (corpo gênico; *open sea*), obteve-se média de 40,9% de metilação no CCEB e 37,5% no tecido adjacente, mostrando uma pequena diferença inferior ao nível de metilação do tecido tumoral obtidos anteriormente (β 0,46).

O sítio CpG do gene *HOXA1* (5'UTR; ilha CpG) apresentou média de 55,5% de metilação no tumor e 39,6% no tecido adjacente, ambos menores do que foi identificado nos estudos exploratórios interno e externo.

Os padrões de metilação dos três sítios CpGs obtidos nas análises interna (HM450K), no TCGA e no pirosequenciamento podem ser observados na Tabela 5 e na Figura 18.

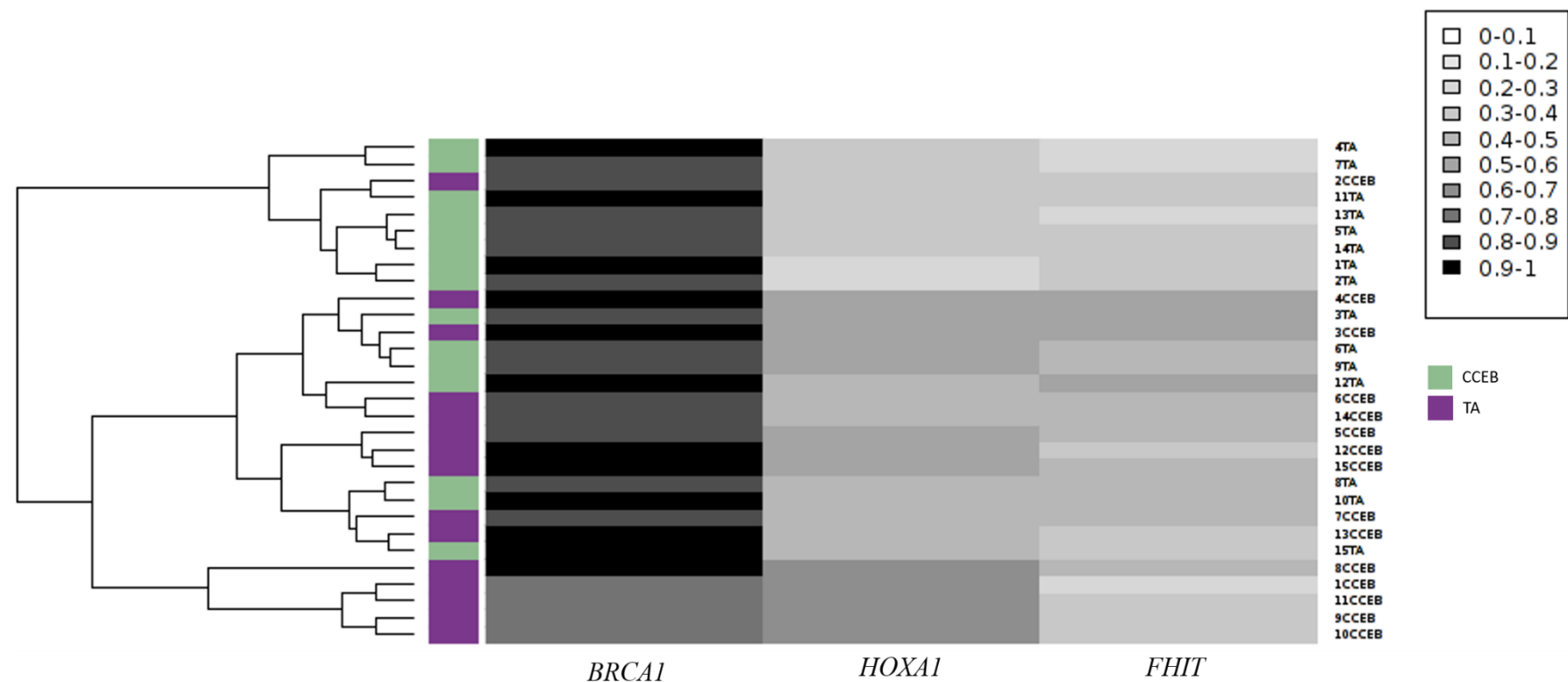
Tabela 5 - Comparação entre os níveis de metilação obtidos no estudo interno, no TCGA e no pirosequenciamento para os três sítios CpGs diferencialmente metilados nas análises exploratórias

Sítio CpG	Gene	CCEB			Tecido adjacente		
		β Interno	β TCGA	% Piroseq	β Interno	β TCGA	% Piroseq
cg05815247	<i>BRCA1</i>	0.46	0.65	85.33	0.36	0.79	89.52
cg05645292	<i>FHIT</i>	0.46	0.47	40.87	0.36	0.35	37.50
cg07659054	<i>HOXA1</i>	0.63	0.62	55.49	0.47	0.41	39.60

Legenda: CCEB: carcinoma de células escamosas bucal; % Piroseq: percentagem de metilação média obtida na análise de pirosequenciamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 - Dendograma representando o padrão de metilação obtido para cada sítio CpG nas amostras de CCEB e tecido adjacente na análise por pirosequenciamento



Legenda: É possível observar a hipermetilação (> 70%) do gene *BRCA1* nas amostras de CCEB e TA (tecido adjacente), assim como uma maior metilação do gene *HOXA1* quando comparado ao gene *FHIT*. Os tons mais escuros representam maior metilação, tons mais claros menor metilação numa escala de 0 a 1. Considerando os níveis de metilação dos genes *BRCA1*, *FHIT* e *HOXA1* não foi possível observar um padrão de agrupamento eficiente entre as amostras de CCEB e TA.

Fonte: Elaborado pela autora

Quando os níveis de metilação entre o tecido tumoral e o tecido adjacente foram comparados, verificou-se apenas um sítio CpG diferencialmente metilado ($p < 0,001$) no CCEB, sendo este pertencente ao gene *HOXA1* (Tabela 6).

Tabela 6 - Porcentagem de metilação obtida no pirosequenciamento por sítio CpG de acordo com o gene e o tecido investigado

Variável	Média	DP	CV	Mínimo	Mediana	Máximo	<i>p</i> valor
<i>BRCA1</i> -T	85.33	7.26	8.51	70.44	88.79	91.48	0.0532
<i>BRCA1</i> -A	89.52	1.73	1.94	86.84	89.36	92.47	
<i>HOXA1</i> -T	55.49	9.86	17.77	37.69	52.69	69.41	0.0003*
<i>HOXA1</i> -A	39.60	9.31	23.50	27.28	38.11	56.66	
<i>FHIT</i> -T	40.87	7.87	19.24	29.76	40.56	56.01	0.3390
<i>FHIT</i> -A	37.50	9.70	25.88	21.70	36.23	51.62	

Legenda: T: tumor (CCEB); A: tecido adjacente; DP: desvio padrão; CV: Coeficiente de variação; *: *p* valor estatisticamente significativo ($< 0,05$) de acordo com o teste t pareado de Student.

Fonte: Elaborado pela autora.

Apenas o gene *HOXA1* apresentou diferença de metilação entre o tecido tumoral e o tecido adjacente compatível com as análises anteriores. Os valores de $\Delta\beta$ obtidos nas análises interna e externa, assim como a diferença de metilação identificada no pirosequenciador podem ser observadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Diferenças de metilação entre o CCEB e o tecido adjacente obtidas nos estudos interno, TCGA e pirosequenciamento

Sítio CpG	Gene	$\Delta\beta$ interno	$\Delta\beta$ TCGA	Diferença pirosequenciamento
cg05815247	<i>BRCA1</i>	-0.13	-0.14	-4.19
cg05645292	<i>FHIT</i>	0.10	0.13	3.38
cg07659054	<i>HOXA1</i>	0.16	0.21	15.90

Legenda: $\Delta\beta$ representa a diferença de metilação entre o β valor do tecido tumoral (CCEB) e o β valor do tecido adjacente nas análises realizadas na HM450K, tanto no estudo interno, quanto nos estudos do TCGA. A diferença obtida no pirosequenciamento refere-se a porcentagem de metilação do tumor menos a porcentagem do tecido adjacente. O sítio CpG em negrito representa uma posição diferencialmente metilada entre CCEB e o tecido adjacente, obtida na análise interna, validada nos estudos do TCGA e experimentalmente por pirosequenciamento.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Correlação entre as PDMs e os dados clínico-patológicos dos pacientes

Os níveis de metilação obtidos na análise de pirosequenciamento, tanto para as amostras de CCEB quanto para o tecido adjacente, foram padronizados e correlacionados aos dados clínico-patológicos dos 15 pacientes. Os dados paramétricos foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson e os não-paramétricos pelo coeficiente de correlação de postos de Spearman.

O perfil de metilação do gene *HOXA1* no tecido tumoral mostrou-se positivamente correlacionada à carga tabágica dos pacientes ($r = 0,529$ e $p = 0,044$). Ainda no tecido tumoral, a metilação dos genes *BRCA1* e *FHIT* mostraram-se positivamente correlacionadas ($r = 0,567$ e $p = 0,03$).

No tecido adjacente, foi percebido que a maior metilação do gene *FHIT* estava fortemente correlacionada à maior metilação do *HOXA1* ($r = 0,717$ e $p = 0,003$).

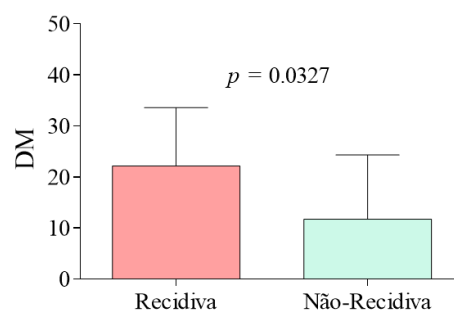
Os pacientes do sexo masculino apresentaram maior metilação do gene *BRCA1* ($p < 0,001$), principalmente no tecido adjacente. Por outro lado, a metilação do gene *FHIT* foi maior em pacientes do sexo feminino ($r = -0,418$ e $p = 0,005$). Os genes *FHIT* e *HOXA1* apresentaram correlação positiva entre os níveis de metilação no tecido adjacente ($r = 0,717$ e $p = 0,003$).

Apenas o sítio CpG do gene *HOXA1* mostrou diferença estatística significativa entre os pacientes que tiveram recidiva e outros que não recidivaram em um período de cinco anos (Figura 19).

Figura 19 - Comparação entre os níveis de metilação obtidos para os pacientes que apresentaram recidiva locorregional em um período de cinco anos

Perfil de metilação do sítio CpG em região 3'UTR do gene <i>HOXA1</i>				
Variável	n	CCEB	TA	DM
Recidiva	6	54.2 ± 8.3	42.5 ± 10.0	11.7 ± 12.6
Não-Recidiva	9	57.4 ± 12.4	35.3 ± 6.7	22.2 ± 11.4

$p = 0.0327$

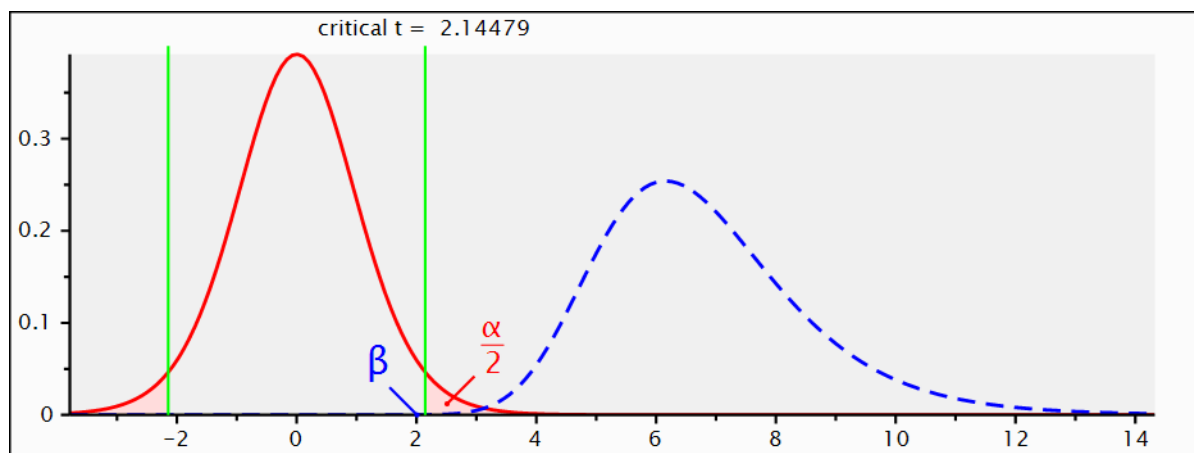


Legenda: CCEB: carcinoma de células escamosas bucal; TA: tecido adjacente; DM: diferença de metilação (metilação da amostra de CCEB menos a metilação do TA) obtida no pirosequenciamento. Fonte: Elaborado pela autora.

Foi realizado teste *post hoc* de Cohen (comparação entre diferenças de média) para análise de poder do teste com base no resultado obtido para o gene

HOXA1. No qual obteve-se poder $(1-\beta) = 0.999$ e *effect size* = 1,272 conforme Figura 20.

Figura 20 - Análise de poder do teste para o nível de metilação do sítio CpG do gene *HOXA1* entre o tecido tumoral e o tecido adjacente



Legenda: O gráfico mostra a probabilidade de ocorrer um erro do tipo II (β), isto é, não rejeitar a H_0 quando ela é falsa. Neste caso o poder do teste é de 99,9%, considerando $\alpha = 0,05$ e efeito grande ($d = 1,272$).

Fonte: Elaborada pela autora.

5 DISCUSSÃO

A metilação de DNA tem se mostrado como um importante fator na patogênese de vários cânceres humanos, principalmente em estágios iniciais, estando relacionada também à evolução e ao desfecho da doença. Ainda assim, no câncer bucal, estes mecanismos são pouco compreendidos. Destarte, este estudo objetivou caracterizar o perfil de metilação em diferentes regiões de genes supressores de tumor afim de elucidar os fatores moleculares que interferem no prognóstico e sobrevida destes pacientes.

Evidentemente, um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal é o tabagismo. Sabe-se que o consumo de tabaco está relacionado a modificações epigenéticas. A metilação do DNA é o mecanismo mais bem compreendido e já foi identificado um perfil diferencial entre células normais de fumantes comparadas a de não-fumantes (Teschendorff et al., 2015).

No âmbito do câncer, Alexandrov et al. (2018) encontraram alguns CpGs diferencialmente metilados em fumantes com adenocarcinoma de pulmão e câncer de boca quando comparado aos tumores de pacientes não-fumantes, porém, estes sítios não pertenciam a genes envolvidos na carcinogênese, nem a genes hipometilados no sangue normal ou em células bucais de fumantes de tabaco.

Neste estudo, considerando a primeira análise *in silico*, não foi evidenciada diferença significativa entre os níveis de metilação do grupo de genes estudados em CCEB de pacientes fumantes e não-fumantes. Acredita-se que isso possa ser atribuído ao fato de a carcinogênese ser um mecanismo extremamente complexo, envolvendo diferentes vias de evolução.

Inegavelmente, nos tecidos normais de fumantes há diferença na metilação do DNA comparado aos de não-fumantes, conquanto que essas diferenças são

obscurcidas com o desenvolvimento do câncer. Saliente-se que, mesmo após o câncer ter se instalado, o tabagismo está relacionado a um maior número de substituições de bases, pequenas inserções, deleções e rearranjos genômicos em tumores de pacientes fumantes quando comparado aos mesmos tumores de pacientes não-fumantes (Alexandrov et al., 2018).

Independente do hábito tabagista, sabe-se a que metilação na região promotora da ilha CpG interrompe a transcrição de genes supressores de tumor no câncer, por meio do recrutamento de proteínas repressoras ou proteínas que aumentam a afinidade do DNA pelas histonas (Jones et al., 1998). Estudos recentes têm mostrado que a metilação na região 5'UTR e 1º éxon também agem reprimindo a expressão gênica (Evans et al., 2018; Guo et al., 2020; Lim et al., 2018).

De modo geral, a hipermetilação da região promotora de diversos genes supressores de tumor tem sido relatada em CCEB, entretanto poucos estudos avaliaram a metilação em outras regiões gênicas e fora da ilha CpG. Neste estudo, os sítios CpGs pertencentes às regiões promotora, 5'UTR e 1º éxon foram analisados em conjunto devido às recentes evidências apontando que genes hipermetilados nessas regiões possuem expressão diminuída.

Desta forma, foram observados dois genes, *BRCA1* e *RASSF1*, exclusivamente hipermetilados na região promotora, 5'UTR e 1º éxon no CCEB, validados *in silico* com os dados de metilação disponíveis no consórcio TCGA. Dentre estes, o *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) foi o único que apresentou hipermetilação exclusivamente na região promotora localizada em ilha CpG, embora a análise de expressão obtida no TCGA mostrou maior expressão desse gene no CCEB (FC = 1,85).

Este gene atua na codificação de uma fosfoproteína importante na manutenção da estabilidade genômica e supressão tumoral (RefSeq, 2020), por isso tem suma importância no desenvolvimento de alguns tipos de cânceres. A

hipermetilação da sua região promotora é frequentemente identificada no câncer de mama (Brianese et al., 2018; Harahap et al., 2018; Vu et al., 2018).

No CCEB, alterações no número de cópia do gene *BRCA1* já foram associadas a maiores chances de metástase e recidivas (Ribeiro et al., 2018). Entretanto, este foi o primeiro estudo a relatar a hipermetilação deste gene em amostras de CCEB ($\beta = 0,62$).

O gene *RASSF1* (*Ras association domain family member 1*) codifica uma proteína inibidora do acúmulo de ciclina D1, induzindo a parada do ciclo celular. A perda de expressão desse gene tem sido relatada em diversos tipos de cânceres. Sabe-se que esta inativação ocorre na maioria das vezes pela hipermetilação de sua região promotora (RefSeq, 2020). Strzelczyk et al., (2018) e Weng et al. (2018) já relataram hipermetilação do gene *RASSF1* no CCEB, o que corrobora com o presente estudo, onde foi observada hipermetilação na região promotora deste gene ($\beta = 0,64$).

Apesar do papel da metilação na região promotora dos genes já ser bem elucidado, o papel da metilação em regiões fora do promotor ainda permanece incerto. A metilação no corpo do gene e região 3'UTR tem prendido a atenção dos pesquisadores em relação ao seu papel no controle e eficiência da transcrição (Zhou et al., 2017). Segundo Jones (2012), a metilação no corpo dos genes contribui na carcinogênese causando mutações em células somáticas e germinativas e está positivamente correlacionada com os níveis de expressão gênica.

Ainda diante da ausência de conhecimento nesta área, McGuire et al. (2019) investigaram em 10 tipos de tumores a relação entre a metilação da região 3'UTR e a expressão gênica. Assim, identificaram que a metilação desta região e expressão gênica também estão positivamente correlacionadas. Deste modo, neste estudo, considerou-se que a metilação no corpo gênico tem papel similar à região

3'UTR, aumentando a taxa de transcrição, assim, essas regiões foram analisadas em conjunto.

Outrossim, na região de corpo gênico e 3'UTR, foram identificados seis genes hipermetilados, *CDH13*, *DAPK1*, *HOXA1*, *PDLIM4*, *RARB*, *TIMP3*, *TP73* e *VHL*. Sendo que dentre estes, os genes *CDH13* e *HOXA1* apresentaram maior expressão no tecido tumoral quando comparado ao adjacente, FC = 1,78 e FC = 10,55, respectivamente.

O gene *CHD13* (*Cadherin 13*) é responsável pela codificação de uma proteína membro da superfamília da caderina, entretanto não possui domínio citoplasmático como outras caderinas. Acredita-se que esta seja responsável por ser um regulador negativo de axônios no desenvolvimento neural, assim como protege células endoteliais do estresse oxidativo (RefSeq, 2020). Este gene é hipermetilado em muitos tipos de cânceres, incluindo aqueles que atingem a região colorretal (Ye et al., 2017), bexiga (Chen et al., 2016) e pulmão (Pu et al., 2016).

Noorlag et al., (2014) observaram hipermetilação da região promotora do gene *CDH13* em 13% dos seus pacientes com carcinoma de células escamosas na língua, o que se opõe aos resultados obtidos neste estudo, onde foi vista hipermetilação meramente no corpo deste gene ($\beta = 0,75$).

Acredita-se que a hipermetilação do corpo gênico esteja presente em genes que estão ativamente sendo transcritos, sendo frequente, por exemplo, no corpo de genes do cromossomo X ativo. Em 2009, Flanagan et al. sugeriram que a metilação excessiva no corpo gênico seria um mecanismo de modulação positiva do nível de transcrição. Deste modo, o aumento na metilação do corpo do gene *CDH13* poderia estar relacionado a uma resposta ao estresse oxidativo das células tumorais.

O gene *DAPK1* (*Death-associated protein kinase 1*) é um candidato a supressor de tumor por ser um mediador positivo da morte celular programada.

Diversos estudos têm focado na hipermetilação deste gene sem discernir entre as diferentes regiões gênicas. Strzelczyk et al. (2019) identificaram que o nível de metilação geral deste gene estava positivamente correlacionado à metástase linfonodal e ao histórico familiar de câncer. Entretanto, a hipermetilação de *DAPK1* mostrou correlação com menores taxas de óbito.

No presente estudo, foi identificada hipermetilação apenas no corpo gênico de *DAPK1* ($\beta = 0,67$), o que pode estar relacionado à tentativa do organismo de promover a morte celular programada destas células tumorais.

O *HOXA1* (*Homeobox 1*) codifica um fator de transcrição de ligação ao DNA que pode regular a expressão, morfogênese e diferenciação celular. Alguns estudos têm relatado maior expressão desse gene em CCEB e cânceres de cabeça e pescoço (Bitu et al., 2012; Rivera et al., 2014).

Mohanta et al. (2019) relacionaram a expressão aberrante deste gene às células-tronco do câncer (*cancer stem cells*) e consequentemente a maiores episódios de recorrência. Todavia, não foram encontrados estudos que avaliaram a metilação deste gene em amostras de CCEB, deste modo, este estudo foi o primeiro a relatar hipermetilação na região 3'UTR do gene *HOXA1* ($\beta = 0,70$), o que pode estar diretamente correlacionado com sua maior expressão no câncer bucal. Outros estudos têm mostrado hipermetilação desse gene no câncer de pulmão de pequenas células (Fang et al., 2016), colangiossarcoma (Prachayakul et al., 2017) e carcinoma da tireóide (Chang et al., 2016).

O gene *MGMT* (O-6-methylguanine-DNA methyltransferase) codifica uma proteína que atua no reparo de DNA envolvida na defesa contra toxicidade e mutagênese causada por agentes alquilantes (RefSeq, 2020). A metilação da região promotora deste gene tem sido descrita em diversos cânceres, incluindo no CCEB. Ferlazzo et al. (2017) identificaram metilação deste gene em cerca de 60% dos seus pacientes e Dvojakovska et al. (2018) considerou este gene um possível biomarcador de diagnóstico não-invasivo. Ambos os estudos corroboram com o

perfil de metilação identificados na região promotora ($\beta = 0,59$), entretanto não investigaram os níveis de metilação no corpo do gene, que aqui, se mostrou mais hipermetilado ($\beta = 0,78$).

O gene *PDLIM4* (*PDZ and LIM domain 4*) é um potencial gene supressor de tumor envolvido na manutenção do crescimento celular normal. A hipermetilação em sua região promotora já foi relatada em tumores de próstata (Vanaja et al., 2006), cólon e reto (Pataí et al., 2017), tireóide (Bozetatu et al., 2019) e leucemia (Jelinek et al., 2017). No entanto, não existem relatos da metilação deste gene em tumores da boca ou cabeça e pescoço. Este estudo foi o primeiro a identificar a hipermetilação no corpo deste gene em amostras de CCEB ($\beta = 0,57$).

O gene *TIMP3* (*Tissue inhibitor of metalloproteinase-3*) codifica inibidores das metaloproteinases da matriz, envolvidas na degradação da matriz extracelular, suprime o crescimento, angiogênese, migração e invasão de células cancerígenas. A expressão de *TIMP3* é induzida em resposta à estímulos mitogênicos e o silenciamento deste gene tem sido relatado em alguns tipos de cânceres, sendo associado à progressão da doença e ao pior prognóstico (Jackson et al., 2017).

A metilação da região promotora do *TIMP3* já foi relatada no câncer de mama triplo negativo (Maleva et al., 2018) e no câncer de tireóide (Stephaen et al., 2018). No presente estudo, não foi observada metilação na região promotora deste gene, sendo esta tipificada ao corpo gênico. Todavia, Su et al., (2019) identificaram que a supressão de *TIMP3* pelo mecanismo de metilação da região promotora contribui para a metastatização de tumores da boca. Strzelczyk et al. (2018) utilizando pirosequenciamento, observaram uma taxa de metilação de 50,67% na região promotora do *TIMP3* em tumores da boca, enquanto este estudo revelou um perfil de metilação levemente superior ($\beta = 0,73$) no corpo do gene. Essa diferença pode ter ocorrido haja vista que o pirosequenciamento é uma técnica quantitativa, enquanto a plataforma HM450K faz uma análise exploratória

dos níveis de metilação. Além disso, é possível que em estágios iniciais do câncer, a metilação no corpo seja maior que na região promotora.

O gene *TP73* (*Tumor Protein p73*) faz parte da família p53 e codifica fatores de transcrição relacionados às respostas celulares ao estresse e desenvolvimento. Foram encontrados escassos estudos na literatura quanto às análises de expressão e metilação deste gene no desenvolvimento do CCEB. Khor et al. (2013) em estudo realizado com 40 amostras de CCEB, por meio de PCR metilação-específica (MSP) identificou um status de metilação de 92,5% para a região promotora de *TP73*.

Segundo estudo realizado por Ribeiro et al. (2018), em Portugal, o status de metilação do mesmo gene foi menor que 50% em sua coorte de 49 pacientes, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo para a região promotora ($\beta = 0,44$).

Stephen et al. (2009), em pesquisa com seis linhagens celulares de CCEB, identificaram hipermetilação de *TP73* em duas delas relatando ser um evento primário na carcinogênese bucal. No presente estudo, a metilação foi maior no corpo deste gene ($\beta = 0,65$) quando comparado ao promotor ($\beta = 0,44$); não foram encontrados outros estudos avaliando o corpo deste gene.

O gene *VHL* (*von Hippel-Lindau tumor supressor*) também apresentou metilação apenas no corpo gênico ($\beta = 0,53$). A proteína codificada por esse gene está envolvida na ubiquitinação e degradação do fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF), importante na regulação da expressão gênica pelo oxigênio (RefSeq, 2020).

No CCEB já foram identificadas perdas no cromossomo e alterações no número de cópias do gene *VHL* (Ribeiro, et al., 2017; Ribeiro et al., 2018). Conquanto, avaliando marcadores epigenéticos, Yeh et al. (2003) não identificaram metilação neste gene no câncer bucal. Sendo este, portanto, o primeiro estudo a relatar hipermetilação do gene *VHL* em amostras de CCEB.

No presente estudo, foram identificados dois genes com níveis de metilação diferentes entre o corpo gênico/3'UTR e a região promotora/5'UTR/1º éxon, *ESR1* e *RARB*.

O gene *ESR1* (*Estrogen Receptor 1*) é um receptor de estrogênio essencial para a ligação de hormônios, ligação do DNA e ativação da transcrição. Este gene é expresso em diversos órgãos e possui processos de uso alternativo do promotor resultando em dezenas de variantes de transcrição, as quais muitas de suas funções não foram identificadas (RefSeq, 2020).

No CCEB, o único estudo que investigou a metilação deste gene, envolve a linhagem HSC-3 oriunda de carcinoma de células escamosas da língua, desenvolvido por Ribeiro et al. (2018), no qual encontraram nível de metilação de 96% para este gene, o que está um pouco acima do resultado obtido no presente estudo nas regiões promotora/5'UTR e 1º éxon ($\beta = 0,46$) e corpo gênico/3'UTR ($\beta = 0,61$). Essa diferença pode ter sido ocasionada por se tratar de um estudo *in vitro*.

O gene *RARB* (*Retinoic acid receptor beta*) codifica uma proteína responsável por ligar-se ao ácido retinóico, que medeia a sinalização celular na morfogênese embrionária, crescimento e diferenciação celular. Acredita-se também que esta proteína possa controlar o crescimento de alguns tipos de células, regulando a expressão gênica (RefSeq, 2020).

Em experimentos com animais, Lai et al. (2014) identificaram que a hipermetilação da região promotora deste gene estava correlacionada com a perda de expressão e com o desenvolvimento do CCEB. Noorlag et al. (2014) observaram um maior nível de metilação (46%) do gene *RARB* em CCEB que acometeram o assoalho da boca. Ribeiro et al. (2018) também relataram alto nível de hipermetilação (75%) na região promotora deste gene em amostras de CCEB. Estes resultados não corroboram ao observado no presente estudo, onde se obteve

menor metilação ($\beta = 0,30$) na região promotora/5'UTR comparado ao corpo gênico ($\beta = 0,60$).

Os gene *FHIT* e *RUNX3* apresentaram-se hipermetilados tanto na região promotora/5'UTR/1º éxon, quanto no corpo do gene e 3'UTR. O gene *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*) é responsável pela codificação da proteína Fhit, uma hidrolase de diadenosina trifosfato (AP3A) e membro da tríade de histidina, subfamília de proteínas de ligação a nucleotídeos (Haragannavar et al., 2019). A perda de expressão dessa proteína influencia a formação de tecidos neoplásicos devido à instabilidade genética, interrupção de vias de sinalização e perda do controle da divisão celular (Haragannavar et al., 2019).

Em 2002, Chang et al. sugeriram que a expressão aberrante do gene *FHIT* poderia ser um evento inicial no desenvolvimento do CCEB. Entretanto, Lin et al. (2014), utilizando MSP, em estudo realizado com modelos celulares de CCEB, identificou que o silenciamento epigenético deste gene está relacionado à maior resistência a tratamentos por radioterapia.

No presente estudo, foi identificado que este gene estava hipermetilado tanto na região promotora quanto no corpo gênico, $\beta = 0,78$ e $0,73$, respectivamente, o que pode ter sido ocasionado pela maior porcentagem de pacientes avançados na coorte utilizada no estudo.

O gene *RUNX3* (*Runt Related Transcriptor Factor 3*) é um fator de transcrição importante da via supressora de tumor induzida por TGF- β (Gao et al., 2009). A perda de expressão desse gene tem potencial para reduzir a sensibilidade celular, tanto na inibição de crescimento quanto na indução da apoptose (Ito, Miyazono, 2003).

Este gene tem sido descrito como supressor de tumor em diversos tipos de cânceres, tais como bexiga, estômago, cólon, reto, fígado e pâncreas por meio de alterações na via Wnt, β -catenina e SMAD3/SMAD4 (Li et al., 2002; Subramaniam et al., 2009).

Por meio de um mecanismo ainda pouco explorado, o gene *RUNX3* pode apresentar caráter oncogênico inibindo a transcrição de outros genes por meio da modulação da estrutura da cromatina principalmente em estágios avançados dos carcinomas de células basais e epitélio do ovário (Chuang, Ito, 2010).

O papel de *RUNX3* no câncer de cabeça e pescoço é incerto e controverso. Park et al. (2015) demonstraram, por meio de *knockout* gênico em camundongos, que a hiperexpressão de *RUNX3* está correlacionada à invasão óssea e aumento de malignidade em CCEB. Kudo et al. (2011) definiram *RUNX3* como oncogene ao relacionar a hiperexpressão desse gene ao crescimento celular e à inibição da apoptose em cânceres de cabeça e pescoço.

Entretanto, Lim et al. (2014), em estudo realizado utilizando MSP, correlacionaram a hipermetilação de *RUNX3* a menor sobrevida em cinco anos de pacientes com CCEB.

Gao et al. (2009), por sua vez, realizaram uma análise por MSP em 30 amostras de CCEB e encontraram *RUNX3* pouco expresso devido à hipermetilação da região promotora ($p < 0,001$). Estes resultados estão de acordo com o que foi encontrado no presente estudo, entretanto, além da hipermetilação na região promotora ($\beta = 0,61$), também se observou hipermetilação no corpo deste gene ($\beta = 0,55$).

Em relação a margem cirúrgica, muitos estudos têm investigado o potencial de alterações genéticas e epigenéticas nessas regiões como fatores de prognóstico para pacientes com CCEB. Grande parte destes relatam que o tecido adjacente ao tumor, mesmo histologicamente negativo para células cancerosas, já apresentam alterações que podem afetar o diagnóstico e a cura destes pacientes (Eljabo et al., 2018; Supic et al., 2011; Strzelczyk et al., 2018).

Diante deste panorama, este estudo buscou identificar sítios CpGs diferencialmente metilados entre o tecido tumoral e o tecido adjacente ao tumor,

margem cirúrgica, que fossem marcadores do prognóstico dos pacientes acometidos pelo CCEB.

Na análise de metilação realizada por pirosequenciamento, foi observado maior metilação do sítio CpG investigado do gene *BRCA1* para o tecido tumoral e também para o tecido adjacente, 85,3% e 89,5%, respectivamente, não havendo diferença estatística entre ambos. Entretanto, os genes *FHIT* e *HOXA1* apresentaram menor metilação na análise quantitativa quando comparada à análise exploratória da plataforma HM450K.

Estas diferenças nos níveis de metilação obtidas por diferentes metodologias já foram reportadas anteriormente e reforçam a importância do uso de metodologias quantitativas para análises de metilação (Lim et al., 2014).

O sítio CpG do gene *HOXA1* apresentou diferença significativa nos níveis de metilação entre as amostras de CCEB e o tecido adjacente. Conforme mencionado anteriormente, a metilação na região 3'UTR pode controlar positivamente a expressão gênica, portanto esses dados corroboram com a literatura disponível onde há relatos de expressão aberrante do gene *HOXA1* (Bitu et al., 2012; Ding et al., 2019; Mohanta et al., 2019; Hassan et al., 2006).

Os dados acessados no consórcio TCGA também corroboram com esta teoria, mostrando que as amostras de CCEB quando comparadas com o tecido adjacente, apresentam maior expressão deste gene (FC = 10,55). Sugere-se que este aumento da expressão esteja relacionado à hipermetilação da região 3'UTR do gene *HOXA1*.

Estudos já demonstraram a influência do tabagismo como causa da metilação em genes supressores de tumor em outros tipos de cânceres (Callahan et al., 2019), entretanto, não foi encontrado em nenhum outro estudo relação entre a carga tabágica e metilação da região 3'UTR do gene *HOXA1* como aqui demonstrado. Assim, sugere-se maior investigação dessa possível causalidade.

Outrossim, o presente estudo mostrou que o óbito está negativamente correlacionado ao hábito tabagista. Isso pode ser justificado devido ao crescente aumento na frequência de casos de CCEB em pacientes abaixo dos 45 anos e não-fumantes, principalmente no sexo feminino, em rebordo da língua.

Segundo Hussein et al. (2017), mundialmente, tem sido relatado um crescente aumento no número de casos de CCEB em mulheres jovens e não-fumantes. Entretanto, ainda não foi identificado se isso é um fator de causa hormonal ou uma resposta diferencial ao estresse ou se estritamente por fatores ambientais ou genéticos.

De modo geral, as principais limitações deste estudo se deram em relação ao desenho dos *primers* para sequenciamento e ao tamanho amostral utilizado na validação experimental e posterior correlação aos dados clínico-patológicos. Dessarte, para estudos futuros, sugere-se métodos automatizados para desenho dos *primers* e maior número de casos nas análises experimentais.

6 CONCLUSÃO

O método de rastreamento *in silico* utilizado na plataforma HM450K e no TCGA mostrou-se efetivo na seleção dos alvos e comparação entre os diferentes grupos. Os estudos *in silico* também demonstraram que os genes supressores de tumor geralmente apresentam-se hipermetilados em regiões gênicas distintas, podendo impactar de maneira contrária no nível de transcritos. Portanto, são necessários mais estudos avaliando o efeito da metilação em diferentes regiões gênicas para melhor entendimento da implicação deste mecanismo.

Os genes *BRCA1*, *FHIT*, *MGMT*, *RASSF1* e *RUNX3* mostraram-se comumente hipermetilados na região promotora, 5'UTR e/ou 1º éxon, enquanto os genes *CDH13*, *DAPK1*, *HOXA1*, *PDLIM4*, *RARB*, *TIMP3*, *TP73* e *VHL* apresentaram maior hipermetilação no corpo gênico e/ou 3'UTR.

Não foram observadas diferenças significantes entre os níveis de metilação de pacientes tabagistas e não-tabagistas com CCEB nas análises exploratórias. Todavia, na validação experimental, a carga tabágica dos pacientes fumantes estava positivamente correlacionada ao maior nível de metilação do gene *HOXA1* na região 3'UTR, o que parece resultar em um aumento de expressão deste gene. Isto reflete a complexidade do processo de desenvolvimento e manutenção do câncer, e a necessidade do uso de metodologias quantitativas para avaliar pequenas diferenças nos níveis de metilação.

O tecido adjacente ao CCEB apresenta alterações nos níveis de metilação, refletindo um padrão muito similar ao da lesão. O sítio CpG na região 3'UTR do gene *HOXA1* parece ser um CpG *hot site*, ou seja, capaz de controlar e induzir maior expressão gênica, podendo este ser alvo de propostas terapêuticas com o intuito de impedir a expressão aberrante deste gene no CCEB, diminuindo assim o desenvolvimento de células-tronco do câncer e episódios de recorrência.

REFERÊNCIAS*

Al-Moghrabi N, Al-Showimi M, Al-Yousef N, Al-Shahrani B, Karakas B, Alghofaili L, et al. Methylation of NBR2 and MGMT genes in white blood cells are transmitted from mothers to daughters. *Clin Epigenetics*. 2018 Jul 26;10(1):99. doi: 10.1186/s13148-018-0529-5. PubMed PMID: 30049288.

Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, Totoki Y, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*. 2016 Nov 4;354(6312):618-22. PubMed PMID: 27811275.

Baj A, Fusco N, Bolzoni A, Carioli D, Mazzucato C, Faversoni A, et al. A novel integrated platform for the identification of surgical margins in oral squamous cell carcinoma: results from a prospective single-institution series. *BMC Cancer*. 2019 May 17;19(1):467. doi: 10.1186/s12885-019-5634-0. PubMed PMID: 31101023.

Barrero MJ, Boue S, Belmonte JCI. Epigenetic Mechanisms that Regulate Cell Identity. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):565-70. doi:10.1016/j.stem.2010.10.009. PubMed PMID: 21040898.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon 2005. 163-5. ISBN-10: 9283224388.

Basu B, Chakraborty J, Chandra A, Katarkar A, Baldevbhai JRK, Dhar Chowdhury D, et al. Genome-wide DNA methylation profile identified a unique set of differentially methylated immune genes in oral squamous cell carcinoma patients in India. *Clin. Epigenetics*. 2017 Feb 3;9(1):1–15. doi: 10.1186/s13148-017-0314-x. PubMed PMID: 28174608.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011 Oct;98(4):288-95. doi: 10.1016/j.ygeno.2011.07.007. PubMed PMID:21839163.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Jan 2019]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bitu CC, Destro MF, Carrera M, da Silva SD, Graner E, Kowalski LP, et al. HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer*. 2012 Apr 12;12:146. doi: 10.1186/1471-2407-12-146. PMCID: PMC3351375.

Botezatu A, Iancu IV, Plesa A, Manda D, Popa O, Bostan M, et al. Methylation of tumour suppressor genes associated with thyroid cancer. *Cancer Biomark*. 2019;25(1):53-65. doi: 10.3233/CBM-182265. PubMed PMID: 31006665.

Brianese RC, Nakamura KDM, Almeida FGDSR, Ramalho RF, Barros BDF, Ferreira ENE, et al. NBR2 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Feb;167(3):803-14. doi: 10.1007/s10549-017-4552-6. PubMed PMID: 29116469

Chang H, Shin B, Kim A, Kim H, Kim B. DNA methylation analysis for the diagnosis of thyroid nodules - a pilot study with reference to BRAF(V) (600E) mutation and cytopathology results. *Cytopathology*. 2016 Apr;27(2):122–30. doi:10.1111/cyt.12248. PubMed PMID: 25988212.

Chang KW, Kao SY, Tzeng RJ, Liu CJ, Cheng AJ, Yang SC, et al. Multiple molecular alterations of FHIT in betel-associated oral carcinoma. *J Pathol*. 2002 Mar;196(3):300-6. doi: 10.1002/path.1047. PubMed PMID: 11857493.

Chen K, Sawhney R, Khan M, Benninger M, Hou Z, Sethi S, et al. Methylation of multiple genes as diagnostic and therapeutic markers in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg*. 2007 Nov;133(11):1131–8. doi: 10.1001/archotol.133.11.1131. PubMed PMID: 18025318.

Chen F, Huang T, Ren Y, Wei J, Lou Z, Wang X, et al. Clinical significance of CDH13 promoter methylation as a biomarker for bladder cancer: a meta-analysis. *BMC Urol*. 2016 Aug 30;16(1):52. doi: 10.1186/s12894-016-0171-5. PubMed PMID: 27578166.

Chuang LSH, Ito Y. RUNX3 is multifunctional in carcinogenesis of multiple solid tumors. *Oncogene*. 2010 May 6;29(18):2605–15. doi: 10.1038/onc.2010.88. PubMed PMID: 20348954.

Dedeurwaerder S, Defrance M, Bizet M, Calonne E, Bontempi G, Fuks F. A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing. *Brief Bioinform*. 2014;15(6):929-41. 94.

De Oliveira SR, Da Silva IC, Mariz BA, Pereira AM, De Oliveira NF. DNA methylation analysis of cancer-related genes in oral epithelial cells of healthy smokers. *Arch Oral Biol*. 2015 Jun;60(6):825–33. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.02.022. PubMed PMID: 25791328.

Deng X, Hou C, Wang H, Liang T, Zhu L. Hypermethylation of WIF1 and its inhibitory role in the tumor growth of endometrial adenocarcinoma. *Mol Med Rep*. 2017 Nov;16(5):7497–503. doi: 10.3892/mmr.2017.7564. PubMed PMID: 28944908.

Ding J, Sun D, Xie P. Elevated microRNA-145 inhibits the development of oral squamous cell carcinoma through inactivating ERK/MAPK signaling pathway by down-regulating HOXA1. *Biosci Rep*. 2019 Jun 25;39(6). pii: BSR20182214. doi: 10.1042/BSR20182214. Print 2019 Jun 28. PubMed PMID: 31138758.

Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*. 2009 Dec;41(12):1350-3. doi: 10.1038/ng.471. PubMed PMID: 19881528.

Dou M, Zhou X, Fan Z, Ding X, Li L, Wang S, et al. Clinical Significance of retinoic acid receptor beta promoter methylation in prostate cancer: a meta-analysis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;2497–505. doi: 10.1159/000488268. PubMed PMID: 29554659.

Dvojakovska S, Popovic-Monevska D, Grcev A, Pancevski G, Benedetti A, Popovski V, et al. Promotor hypermethylated genes: Prospective diagnostic biomarkers in oral cancerogenesis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018 Oct;46(10):1737-1740. doi: 10.1016/j.jcms.2018.07.019. PubMed PMID: 30100382.

Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, Jelovac D, Lazarevic M, Tanic N, Milasin J. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Aug;47(8):976-982. doi: 10.1016/j.ijom.2018.01.020. PubMed PMID: 29449053.

Evans DGR, van Veen EM, Byers HJ, Wallace AJ, Ellingford JM, Beaman G, et al. Dominantly Inherited 5' UTR Variant Causing Methylation-Associated Silencing of BRCA1 as a Cause of Breast and Ovarian Cancer. *Am J Hum Genet.* 2018 Aug 2;103(2):213-220. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.07.002. PubMed PMID: 30075112.

Fang S, Gao H, Tong Y, Yang J, Tang R, Niu Y, et al. Long noncoding RNA-HOTAIR affects chemoresistance by regulating HOXA1 methylation in small cell lung cancer cells. *Lab Invest.* 2016 Jan;96(1):60–8. doi: 10.1038/labinvest.2015.123. PubMed PMID: 26707824.

Ferlazzo N, Currò M, Zinellu A, Caccamo D, Isola G, Ventura V, et al. Influence of MTHFR Genetic Background on p16 and MGMT Methylation in Oral Squamous Cell Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Mar 29;18(4). pii: E724. doi: 10.3390/ijms18040724. PubMed PMID: 28353639; PubMed Central PMCID: PMC5412310.

Flanagan J, Munoz-Alegre M, Henderson S, Tang T, Sun P, Johnson N, et al. Gene-body hypermethylation of ATM in peripheral blood DNA of bilateral breast cancer patients. *Hum Mol Genet.* 2009 Apr 1;18(7):1332–42. doi: 10.1093/hmg/ddp033. PubMed PMID: 19153073.

Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sorensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005 Feb; 34(2):116-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2004.00275.x. PubMed PMID: 15641992

Gao Y, Teschendorff A. Epigenetic and genetic deregulation in cancer target distinct signaling pathway domains. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 25;45(2):583–96. doi: 10.1093/nar/gkw1100. PubMed PMID: 27899617.

Guo M, Chen Y, Chen Q, Guo X, Yuan Z, Kang L, Jiang Y. Epigenetic changes associated with increased estrogen receptor alpha mRNA transcript abundance during reproductive maturation in chicken ovaries. *Anim Reprod Sci.* 2020 Mar;214:106287. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106287. Epub 2020 Jan 18. PubMed PMID: 32087914.

Harahap WA, Sudji IR, Nindrea RD. NBR2 Promoter Methylation and Clinicopathological Characteristics in Sporadic Breast Cancer Patients in Indonesia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Sep 26;19(9):2643-9. PubMed PMID: 30256562.

Haragannavar VC, Tegginamani AS, Raju S, Kudva S, Peter CD, Shruthi DK. Assessment of fragile histidine triad expression in ameloblastoma, odontogenic keratocyst and dentigerous cyst. *Indian J Pathol Microbiol*. 2019 Jan-Mar;62(1):3-6. doi: 10.4103/IJPM.IJPM.403.18. PubMed PMID: 3070685.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Feb;18(2):541-50. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0347. Epub 2009 Feb 3. PubMed PMID: 19190158.

Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res*. 2006;16(5):217-24. PubMed PMID: 17294802.

Hayashi M, Wu G, Roh JL, Chang X, Li X, Ahn J, et al. Correlation of gene methylation in surgical margin imprints with locoregional recurrence in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2015 Jun 15;121(12):1957-65. doi: 10.1002/cncr.29303. Epub 2015 Mar 13. PubMed PMID: 25773145.

Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, Forouzanfar T. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer*. 2017 Sep;82:115-27. doi: 10.1016/j.ejca.2017.05.026. PubMed PMID: 28654785.

Illumina®. Infinium® HumanMethylation450 Beadchip. The ideal solution for affordable, large size sample-size genome wide methylation studies. Data Sheet: Epigenetics; 2012.

Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlöf JC, Nordlund J, Signer L, Norheim KB, et al. Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(11):2029-36.

Instituto Nacional de Câncer - INCA [Internet]. Rio de Janeiro: INCA [cited 2020 Mar 02]. Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil. Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.

Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, Berindan-Neagoe I. Current Insights into Oral Cancer Epigenetics. *Int. J. Mol. Sci.* 2018 Feb 27; 19(3): 670. doi:10.3390/ijms19030670. PubMed PMID: 29495520.

Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003 Feb;13(1):43–7. doi: 10.1016/S0959-437X(03)00007-8. PubMed PMID: 12573434.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet.* 2009 Feb;41(2):178-86. doi: 10.1038/ng.298. PubMed PMID: 19151715.

Jayaprakash C, Radhakrishnan R, Ray S, Satyamoorthy K. Promoter methylation of MGMT in oral carcinoma: A population-based study and meta-analysis. *Arch Oral Biol.* 2017 Aug;80:197-208. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.006. PubMed PMID: 28458179.

Jelinek J, Gharibyan V, Estecio MR, Kondo K, He R, Chung W, et al. Aberrant DNA methylation is associated with disease progression, resistance to imatinib and shortened survival in chronic myelogenous leukemia. *PLoS One.* 2011;6(7):e22110. doi: 10.1371/journal.pone.0022110. PubMed PMID: 21760961.

Jin Z, Liu Y. DNA methylation in human diseases. *Genes Dis.* 2018 Jan 31;5(1):1–8. doi: 10.1016/j.gendis.2018.01.002.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(2):187–191.

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews.* 2012 May 29, (13):484-92. doi: 10.1038/nrg3230. PubMed PMID: 22641018.

Khor GH, Froemming GRA, Zain RB, Thomas Abraham M, Omar E, Tan SK, et al. DNA methylation profiling revealed promoter hypermethylation-induced silencing of p16, DDAH2 and DUSP1 in primary oral squamous cell carcinoma. *Int J Med Sci.* 2013 Oct;10(12):1727–39. doi: 10.7150/ijms.6884. PubMed PMID: 24155659

Kudo Y, Tsunematsu T, Takata T. Oncogenic role of RUNX3 in head and neck cancer. *J. Cell. Biochem.* 2011 Feb;112(2):387–93. doi:10.1002/jcb.22967. PubMed PMID: 21268058.

Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010 Mar;11(3):204–20. doi:10.1038/nrg2719. PubMed PMID: 20142834.

Leek JT, Johnson WE, Parker HS, Jaffe AE, Storey JD. The sva package for removing batch effects and other unwanted variation in high-throughput experiments. *Bioinformatics.* 2012 Mar 15;28(6): 882–3. doi: 10.1093/bioinformatics/bts034. PubMed PMID: 22257669.

Li Q, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi X, Lee C, et al. Causal Relationship between the Loss of RUNX3 Expression and Gastric Cancer. *Cell.* 2002 Apr 5;109(1):113-24. PubMed PMID: 11955451.

Lim AM, Candiloro IL, Wong N, Collins M, Do H, Takano EA, et al. Quantitative methodology is critical for assessing DNA methylation and impacts on correlation with patient outcome. *Clin Epigenetics.* 2014 Dec 9;6(1):22. doi: 10.1186/1868-7083-6-22. PubMed MID: 25859283.

Lim KH, Park ES, Kim DH, Cho KC, Kim KP, Park YK, et al. Suppression of interferon-mediated anti-HBV response by single CpG methylation in the 5'-UTR of TRIM22. *Gut.* 2018 Jan;67(1):166-178. doi: 10.1136/gutjnl-2016-312742. Epub 2017 Mar 23. PubMed PMID: 28341749.

Lin HY, Hung SK, Lee MS, Chiou WY, Huang TT, Tseng CE, et al. DNA methylome analysis identifies epigenetic silencing of FHIT as a determining factor for radiosensitivity in oral cancer: an outcome-predicting and treatment-implicating study. *Oncotarget.* 2015 Jan 20;6(2):915-34. doi: 10.18632/oncotarget.282. PubMed PMID: 25460508.

Liu H, Liu X, Dong G, Zhou J, Liu Y, Gao Y, et al. P16 Methylation as an Early Predictor for Cancer Development From Oral Epithelial Dysplasia: A Double-blind Multicentre Prospective Study. *E Bio Medicine.* 2015 Mar 23;2(5):432–7. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.03.015. PubMed PMID: 2613758.

Majumdar B, Patil S, Sarode SC, Sarode GS, Rao RS. Clinico-pathological prognosticators in oral squamous cell carcinoma: An update. *Translational Research in Oral Oncology* 2 (2017): Doi: 2057178X17738912.

Maleva KI, Jakimovska M, Popovska-Jankovic K, Kubelka-Sabit K, Karagjozov M, Plaseska-Karanfilska D. TIMP3 Promoter Methylation Represents an Epigenetic Marker of BRCA1ness Breast Cancer Tumours. *Pathol Oncol Res.* 2018 Oct;24(4):937-40. doi: 10.1007/s12253-018-0398-4. Epub 2018 Mar 9. PubMed PMID: 29524167.

McGuire MH, Herbrich SM, Dasari SK, Wu SY, Wang Y, Rupaimoole R, et al. Pan-cancer genomic analysis links 3'UTR DNA methylation with increased gene expression in T cells. *EBioMedicine.* 2019 May;43:127-37. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.04.045. PubMed MID: 31056473.

Mielcarek-Kuchta D, Paluszczak J, Seget M, Kiwerska K, Biczysko W, Szyfter K, et al. Prognostic factors in oral and oropharyngeal cancer based on ultrastructural analysis and DNA methylation of the tumor and surgical margin. *Tumour Biol.* 2014 Aug;35(8):7441–9. doi: 10.1007/s13277-014-1958-1. PubMed PMID: 24782031.

Mohanta S, Sekhar Khora S, Suresh A. Cancer Stem Cell based molecular predictors of tumor recurrence in Oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol.* 2019 Mar;99:92-106. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.01.002. Epub 2019 Jan 4. PubMed PMID: 30641296.

National Cancer Institute - NIH [Internet]. Bethesda (Maryland): NIH [cited 2020 Mar 14]. Genome Data Commons Data Portal. Available from: <https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000012048>.

Noorlag R, van Kempen PM, Moelans CB, de Jong R, Blok LE, Koole R, et al. Promoter hypermethylation using 24-gene array in early head and neck cancer: better outcome in oral than in oropharyngeal cancer. *Epigenetics.* 2014 Sep;9(9):1220-7. doi: 10.4161/epi.29785. PubMed MID: 25147921.

Paluszczak J, Sarbak J, Kostrzevska-Poczekaj M, Kiwerska K, Jarmuż-Szymczak M, et al. The negative regulators of Wnt pathway—DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. *Tumour Biol.* 2015 Apr;36(4):2855–61. doi: 10.1007/s13277-014-2913-x. PubMed PMID: 25487617.

Pannone G, Bufo P, Santoro A, Franco R, Aquino G, Longo F, et al. WNT pathway in oral cancer: epigenetic inactivation of WNT-inhibitors. *Oncol Rep.* 2010 Oct;24(4):1035-41. doi: 10.3892/or.2010.1035. PubMed PMID: 20811686.

Park J, Kim H-J, Rim Kim K, Kyoung Lee S, Kim H, Park K-K, et al. Loss of RUNX3 expression inhibits bone invasion of oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Feb 7;8(6):9079–92. doi: 10.18632/oncotarget.14071. PubMed PMID: 28030842.

Patai ÁV, Barták BK, Péterfia B, Micsik T, Horváth R, Sumánszki C, et al. Comprehensive DNA Methylation and Mutation Analyses Reveal a Methylation Signature in Colorectal Sessile Serrated Adenomas. *Pathol Oncol Res*. 2017 Jul;23(3):589-94. doi: 10.1007/s12253-016-0154-6. PubMed PMID:27896617.

Prachayakul V, Kanchanapermpoon J, Thuwajit C, Boonyaarunnate T, Pongpaibul A, Chobson P, et al. DNA Methylation Markers Improve the Sensitivity of Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography-Based Brushing Cytology in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2017 Dec;16(6):1252–8. doi: 10.1177/1533034617748090. PubMed PMID: 29484968.

Pu W, Geng X, Chen S, Tan L, Tan Y, Wang A, Lu Z, Guo S, Chen X, Wang J. Aberrant methylation of CDH13 can be a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma. *J Cancer*. 2016 Nov 25;7(15):2280-2289. eCollection 2016. PubMed PMID: 27994665; PubMed Central PMCID: PMC5166538.

Ramachandran I, Ganapathy V, Gillies E, Fonseca I, Sureban SM, Houchen CW, et al. Wnt inhibitory factor 1 suppresses cancer stemness and induces cellular senescence. *Cell Death Dis*. 2014 May 22;5(5):1246-312. doi: 10.1038/cddis.2014.219. PubMed PMID: 24853424.

Rasmussen K, Helin K. Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*. 2016 Apr 1;30(7):733–50. doi: 10.1101/gad.276568.115. PubMed PMID: 27036965.

Rasmussen SL, Krarup HB, Sunesen KG, Pedersen IS, Madsen PH, Ussing OT. Hypermethylated DNA as a biomarker for colorectal cancer: A systematic review. *Colorectal. Dis*. 2016 Jun;18(6):549–61. doi: 10.1111/codi.13336. PubMed PMID: 26998585.

RefSeq. NCBI Reference Sequence DataBase. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine [Internet]. Bethesda (Maryland): RefSeq.[cited 2019 Nov 02]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>.

Ribeiro IP, Marques F, Barroso L, Miguéis J, Caramelo F, Santos A, et al. Genetic and epigenetic characterization of the tumors in a patient with a tongue primary tumor, a recurrence and a pharyngoesophageal second primary tumor. *Mol Cytogenet.* 2017 Apr 11;10:13. doi: 10.1186/s13039-017-0310-z. eCollection 2017. PubMed PMID: 28413448.

Ribeiro IP, Rodrigues JM, Mascarenhas A, Kosyakova N, Caramelo F, Liehr T, et al. Cytogenetic , genomic , and epigenetic characterization of the HSC-3 tongue cell line with lymph node metastasis. *J Oral Sci.* 2018 Mar 24;60(1):70–81. doi: 10.1300/J377v26n02. PubMed PMID: 29479029.

Ribeiro IP, Caramelo F, Esteves L, Oliveira C, Marques F, Barroso L, et al. Genomic and epigenetic signatures associated with survival rate in oral squamous cell carcinoma patients. *J Cancer.* 2018;9(11):1885–1895. Published 2018 Apr 27. doi:10.7150/jca.23239.

Rideout WMIII, Coetzee GA, Olumi AF e Jones PA. 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* 1990 Sep 14; 249(4974):1288-90. doi: 10.1126/science.1697983. PubMed PMID: 1697983.

Rivera C, González-Arriagada WA, Loyola-Brambilla M, de Almeida OP, Coletta RD, Venegas B. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Aug 15;7(9):5968-77. eCollection 2014. PubMed PMID: 25337241.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Peters TJ, Buckley MJ, et al. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:6. 96. Martin TC, Yet I, Tsai PC, Bell JT. coMET: visualisation of regional epigenome-wide association scan results and DNA co-methylation patterns. *BMC Bioinformatics.* 2015;16:131. 97.

Rigi-Ladiz MA, Kordi-Tamandani DM, Torkamanzehi A. Analysis of hypermethylation and expression profiles of APC and ATM genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics.* 2011 Nov 1;3:6. doi: 10.1186/1868-7083-3-6. PubMed PMID: 22414247.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research.* 2015 Apr 20;43(7):e47. doi: 10.1093/nar/gkv007. PubMed PMID: 25605792.

Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011 Jun;6(6):692-702. doi: 10.4161/epi.6.6.16196. PubMed PMID: 21593595.

Schalkwyk LC, Pidsley, Ruth, Wong YCC. A data-driven approach to preprocessing illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*. 2013 May 1;14:293. doi: 10.1186/1471-2164-14-293.

Sharma R, Panda N, Khullar M. Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, CYP1A1, CYP2A13 and GSTM1 genes in head and neck cancer. *Oral Dis*. 2010 Oct;16(7):668–73. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01676.x. PubMed PMID: 20846153.

Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007;45(8):617-22.

Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, et al. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. *Head Neck*. 2009;31(11):1423-30.

Stephen JK, Chen KM, Raitanen M, Grénman S, Worsham MJ. DNA hypermethylation profiles in squamous cell carcinoma of the vulva. *Int. J. Gynecol. Pathol*. 2009 Jan;28(1):63–75. doi: 10.1097/PGP.0b013e31817d9c61. PubMed PMID: 19047905.

Stephen JK, Chen KM, Merritt J, Chitale D, Divine G, Worsham MJ. Methylation markers differentiate thyroid cancer from benign nodules. *J Endocrinol Invest*. 2018 Feb;41(2):163-70. doi: 10.1007/s40618-017-0702-2. Epub 2017 Jun 13. PubMed PMID: 28612287.

Stirzaker C, Taberlay PC, Statham AL, Clark SJ. Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends Genet*. 2014 Feb;30(2):75-84. doi: 10.1016/j.tig.2013.11.004. PubMed PMID: 24368016.

Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Owczarek AJ. Methylation status of SFRP1, SFRP2, RASSF1A, RAR β and DAPK1 genes in patients with oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol*. 2019;98:265–72. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.12.001

Su CW, Chang YC, Chien MH, Hsieh YH, Chen MK, Lin CW, Yang SF. Loss of TIMP3 by promoter methylation of Sp1 binding site promotes oral cancer metastasis. *Cell Death Dis.* 2019 Oct 17;10(11):793. doi: 10.1038/s41419-019-2016-0. PubMed PMID: 31624299; PubMed Central PMCID: PMC6797751.

Subramaniam MM, Chan JY, Yeoh KG, Quek T, Ito K, Salto-Tellez M. Molecular pathology of RUNX3 in human carcinogenesis *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1796(2):315-31. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.004. PubMed PMID: 19682550.

Supic G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2009 Dec;45(12):1051–7. doi:10.1016/j.oraloncology.2009.07.007. PubMed PMID: 19665921.

Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2011 Aug;47(8):702–8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.05.014. PubMed PMID: 21697000.

Teodoridis J, Hall J, Marsh S, Kannall H, Smyth C, Curto J, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res.* 2005 Oct;65(19):8961–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1187. PubMed PMID: 16204069.

Teschendorff AE, Lee SH, Jones A, Fiegl H, Kalwa M, Wagner W, et al. HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer. *Genome Med.* 2015 Oct 24;7:108. doi: 10.1186/s13073-015-0233-4. PubMed PMID: 26497652.

The Cancer Genome Atlas - TCGA [Internet]. Bethesda (Mayland):TCGA [cited 2019 Mar 02] Genomic Data Commons Data Portal. Available from: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>

Thomson PJ. Oral carcinogenesis. Oral Precancer diagnosis and management of potentially malignant disorders. Chichester, UK: Wiley-Blackwell; 2012:31-47. ISBN: 978-1-444-33574-3.

Towle R, Garnis C. Methylation-mediated molecular dysregulation in clinical oral malignancy. *J. Oncol.* 2012;2012:170172. doi: 10.1155/2012/170172. PubMed PMID: 22645611.

Towle R, Truong D, Hogg K, Robinson W, Poh C, Garnis C. Global analysis of DNA methylation changes during progression of oral cancer. *Oral Oncol.* 2013 Nov;49(11):1033-42. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.08.005. PubMed PMID: 24035722.

Tsantoulis P, Kastrinakis N, Tourvas A, Laskaris G, Gorgoulis V. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007 Jul;43(6):523-34. doi: 10.1016/j.oraloncology.2006.11.010. PubMed PMID: 17258495.

Uesugi H, Uzawa K, Kawasaki K, Shimada K, Moriya T, Tada A, et L. Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med.* 2005 Apr;15(4):597-602. PubMed PMID: 15754020.

Vanaja DK, Ballman KV, Morlan BW, Cheville JC, Neumann RM, Lieber MM, et al. PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 15;12(4):1128-36. PubMed PMID: 16489065.

Van der Waal I, de Bree R, Brakenhoff R, Coebergh JW. Early diagnosis in primary oral cancer: is it possible? *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 May 1;16(3):e300-5. doi: 10.4317/medoral.16.e300. PubMed PMID: 21441877.

Vu TL, Nguyen TT, Doan VTH, Vo LTT. Methylation Profiles of NBR2, RASSF1A and GSTP1 in Vietnamese Women with Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018 Jul 27;19(7):1887-93. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.7.1887. PubMed PMID: 30049201.

Wang T, Hsia S, Shih Y, Shieh T. Association of smoking, alcohol use, and betel quid chewing with epigenetic aberrations in cancers. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 6. doi: 10.3390/ijms18061210. PubMed PMID: 28587272.

World Cancer Research Fund International - WCRFI [Internet]. London (United Kingdom): WCRFI [cited 2020 Feb 01]. Worldwide cancer data, global cancer statistics for the most common cancers. 2019. Available from: <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/worldwide-cancer-data>.

Wen G, Wang H, Zhong Z. Associations of RASSF1A, RAR β , and CDH1 promoter hypermethylation with oral cancer risk: A PRISMA-compliant meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018 Mar;97(11):e9971. doi: 10.1097/MD.00000000000009971. PMID: 29538221; PMCID: PMC5882397.

World Health Organization - WHO [Internet]. Geneva (Switzerland): WHO. [cited 2020 May 12]. Cancer. Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>

Wong TS, Tang KC, Kwong DLW, Sham JST, Wei WI, Kwong YL, et al. Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Oncol*. 2003 Apr;22(4):869–74. PubMed PMID: 12632081.

Ye M, Huang T, Li J, Zhou C, Yang P, Ni C, et al. Role of CDH13 promoter methylation in the carcinogenesis, progression, and prognosis of colorectal cancer: A systematic meta-analysis under PRISMA guidelines. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Jan;96(4):e5956. doi: 10.1097/MD.0000000000005956. PubMed PMID: 28121942.

Yeh KT, Chang JG, Lin TH, Wang YF, Tien N, Chang JY, et al. Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol Rep*. 2003 May-Jun;10(3):659-63. PubMed PMID: 12684640.

Zhao Z, Liu W, Liu J, Wang J, Luo B. The effect of EBV on WIF1, NLK, and APC gene methylation and expression in gastric carcinoma and nasopharyngeal cancer. *J Med Virol*. 2017 Oct;89(10):1844–51. doi: 10.1002/jmv.24863. PubMed PMID: 28543390.

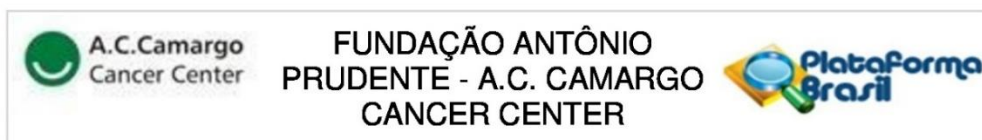
Zhang W, Spector TD, Deloukas P, Bell JT, Engelhardt BE. Predicting genome-wide DNA methylation using methylation marks, genomic position, and DNA regulatory elements. *Genome Biol*. 2015 Jan 24;16:14. doi: 10.1186/s13059-015-0581-9. PubMed PMID: 25616342.

Zhou S, Chen L, Mashrah M, Zhu Y, He Z, Hu Y, et al. Expression and promoter methylation of Wnt inhibitory factor-1 in the development of oral submucous fibrosis. *Oncol Rep*. 2015 Nov;34(5):2636–42. doi: 10.3892/or.2015.4264. PubMed PMID: 17912431.

Zhou S, Shen Y, Zheng M, Wang L, Che R, Hu W, Li P. DNA methylation of METTL7A gene body regulates its transcriptional level in thyroid cancer. *Oncotarget*. 2017 May 23;8(21):34652-60. doi: 10.18632/oncotarget.16147. PMID: 28416772; PMCID: PMC5470999.

ANEXO A —Certificado Comitê de Ética

(continua)

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****Elaborado pela Instituição Coparticipante****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE**Pesquisador:** JANETE DIAS ALMEIDA**Área Temática:****Versão:** 1**CAAE:** 42387315.0.3001.5432**Instituição Proponente:** FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE**Patrocinador Principal:** Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 3.295.277**Apresentação do Projeto:**

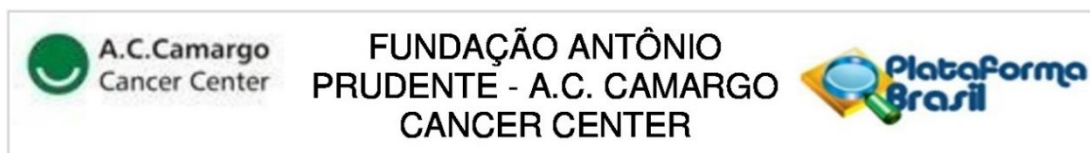
Acredita-se que o tabaco e álcool são os carcinógenos responsáveis pela maior parte dos casos de carcinoma de células escamosas (CCE) da cavidade bucal e contribuem para o desfecho desfavorável destes casos. Além disso, recentemente, fatores virais com EBV e HPV também têm sido considerados como fatores de risco nos cânceres da região de cabeça e pescoço. No entanto não se sabe ao certo como tais fatores poderiam afetar o prognóstico desta doença. O projeto intitulado ESTUDO GENÉTICO DOS PRINCIPAIS FATORES DE RISCO NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE BUCAL tem como objetivo estabelecer uma correlação clínico patológica entre alguns fatores como tabagismo e o prognóstico de casos de CCE da cavidade bucal através da avaliação da metilação dos genes supressores de tumor, expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo do tabaco, análise da ploidia do DNA, análise salivar e de células esfoliadas da mucosa bucal de pacientes com CCE da cavidade bucal.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da atual proposta do estudo nesta solicitação de inclusão de instituição co-participante é validar por pirosequenciamento o perfil de metilação dos genes HOXA1, NEUROG1, RUNX3, TP73 e WIF1, identificados como candidatos em análises prévias de metilação global de carcinoma de células escamosas bucal, e relacionar o perfil de metilação com os dados clínicos dos pacientes.

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211**Bairro:** Liberdade**CEP:** 01.509-900**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2189-5020**Fax:** (11)2189-5020**E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

(continuação)



Continuação do Parecer: 3.295.277

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As amostras utilizadas nesta etapa serão retrospectivas e os riscos são mínimos relativos a perda de confidencialidade das informações. Os pesquisadores se comprometem a manter os dados em sigilo e segurança. Benefícios: identificar fatores prognósticos e o papel do tabagismo em CCE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está aprovado e em andamento na instituição proponente desde 2016. A atual solicitação de inclusão do A.C. Camargo como instituição tem como objetivos validar achados prévios em uma coorte independente de amostras de tumores frescos do biobanco do ACC. O estudo é relevante, com embasamento e resultados prévios apropriados e a validação em outra coorte pode auxiliar na identificação de fatores prognósticos em CCE e na identificação de novos genes envolvidos nesta patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão de acordo com o requerido por este comitê.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este Comitê não identifica objeção ética ou pendências/inadequações envolvendo o projeto proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	declaracao_biobanco_2.pdf	28/03/2019 15:54:06	Sandra Fabiana de Almeida	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1300759.pdf	28/03/2019 15:25:00		Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	Declaracao_sobre_uso_e_destino_do_material.pdf	28/03/2019 15:21:24	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

(continuação)



**FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER**

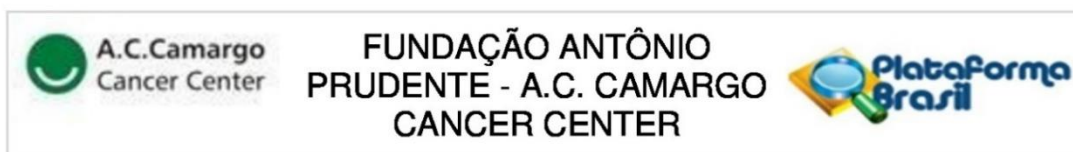


Continuação do Parecer: 3.295.277

Biobanco	Declaracao_sobre_uso_e_destino_do_material.pdf	28/03/2019 15:21:24	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Identificacao_dos_curriculos.pdf	28/03/2019 15:21:02	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ciencia_e_comprometimento_instituicao_coparticipante.pdf	28/03/2019 15:20:29	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_CEP_ICT.pdf	28/03/2019 15:17:42	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ciencia_e_comprometimento_biobanco.pdf	28/03/2019 15:16:31	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ciencia_e_comprometimento_cab_pesc.pdf	28/03/2019 15:16:22	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ciencia_e_comprometimento_Fabio_Marchi_CIPE.pdf	28/03/2019 15:16:11	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Orçamento	Orcamento_Financeiro_Detalhado.pdf	28/03/2019 15:15:44	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_estudo.pdf	28/03/2019 15:15:21	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Instalacoes_Infraestrutura.pdf	28/03/2019 15:15:00	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Declaracao_sobre_os_dados_coletados.pdf	28/03/2019 15:04:00	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_dispensa_do_TCLE.pdf	28/03/2019 15:03:21	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_do_Pesquisador.pdf	28/03/2019 15:02:53	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_JANETE DIAS_ALMEIDA.doc	28/03/2019 15:00:10	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	Formulario_para_submissao_do_projeto_ao_CEP.pdf	28/03/2019 14:59:26	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/03/2019 14:58:11	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	declaracao_cirurgia.pdf	15/02/2019 16:10:25	Denise Nicodemo	Aceito
Outros	declaracao_infra.pdf	15/02/2019 15:59:18	Denise Nicodemo	Aceito
Outros	declaracao_coparticipante.pdf	15/02/2019 15:58:39	Denise Nicodemo	Aceito
Outros	declaracao_biobanco.pdf	15/02/2019 15:58:13	Denise Nicodemo	Aceito
Outros	EMENDA.pdf	20/12/2018 14:25:53	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Projeto Detalhado	PROJETO_REFORMULADO_2018.pdf	20/12/2018	JANETE DIAS	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211**Bairro:** Liberdade**CEP:** 01.509-900**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2189-5020**Fax:** (11)2189-5020**E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br

(conclusão)



Continuação do Parecer: 3.295.277

/ Brochura Investigador	PROJETO_REFORMULADO_2018.pdf	14:22:15	ALMEIDA	Aceito
Outros	tclemodificado.pdf	24/08/2017 10:35:05	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	justificativa.pdf	24/08/2017 10:34:39	JANETE DIAS ALMEIDA	Aceito
Outros	ANEXO 2.pdf	06/04/2015 12:17:30		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO 1.pdf	06/04/2015 12:16:50		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto para Plataforma Brasil FINAL.pdf	06/04/2015 12:11:34		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 30 de Abril de 2019

Assinado por:
Sandra Caires Serrano
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211**Bairro:** Liberdade**CEP:** 01.509-900**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)2189-5020**Fax:** (11)2189-5020**E-mail:** cep_hcancer@accamargo.org.br