

**PERFIL DE METILAÇÃO DO GENE P16 EM MUCOSA ORAL DE INDIVÍDUOS
COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL**

METHYLATION PROFILE OF P16 GENE IN ORAL MUCOSA OF INDIVIDUALS WITH
ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

MARIANA VARGAS CRUZ¹

ESTEVÃO AZEVEDO MELO²

ALINE GOMES SOARES²

ZILDA FAGUNDES LIMA OLIVEIRA³

JOSÉ ROBERTO VASCONCELOS DE PODESTÁ⁴

SÔNIA ALVES GOUVÊA⁵

SANDRA VENTORIN VON ZEIDLER⁶

MELISSA DE FREITAS CORDEIRO-SILVA³

ISSUE DOI: 10.5008/1809.7367.044

RESUMO

RESUMO

O câncer de boca é o sétimo tipo mais incidente na população brasileira. Alterações genéticas em genes supressores tumorais aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasia por estarem associadas ao controle do ciclo celular. Alterações epigenéticas envolvendo genes que regulam o ciclo celular estão relacionadas com o início e a progressão de diversos tumores. A hipermetilação do gene supressor tumoral p16 é encontrada em vários tipos de cânceres e está associada ao silenciamento gênico. O objetivo deste estudo foi determinar o

¹ Graduação em Ciências Biológicas – Faesa

² Graduação em Odontologia – Faesa

³ Doutora e professora da Faesa.

⁴ Médico Cirurgião de Cabeça e Pescoço, Hospital Santa Rita de Cássia – Vitória – Sesa/ES.

⁵ Doutora professora do Departamento de Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

⁶ Doutora professora do Departamento de Patologia – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Espírito Santo (Ufes).

perfil de metilação da região promotora do gene p16 em amostras de mucosa bucal normal de indivíduos com carcinoma epidermoide. A técnica *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction* (MS-PCR) foi utilizada e possibilitou a distinção entre alelos metilados e não metilados na região promotora do gene p16. Foram analisadas 23 amostras, sendo 17,4% positivas para a metilação e 50% destas eram de usuários crônicos de tabaco e 25% de álcool. O envelhecimento pode estar associado à metilação do p16, uma vez que a média de idade dos pacientes positivos foi de 72 anos, maior que a dos pacientes negativos de 56 anos. Os resultados sugerem que a análise da hipermetilação do gene p16 pode tornar-se importante marcador molecular para o carcinoma epidermoide bucal.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide bucal. Mucosa bucal normal. Metilação de DNA. Gene p16.

ABSTRACT

Oral cancer is the seventh most frequent type in our population and approximately 90% of these malignancies are squamous cell carcinoma. Genetic alterations in tumor suppressor genes increase the risk of tumor development, since these genes are associated with cycle cell control. Epigenetic changes involving cell cycle regulatory genes are related to the initiation and progression of various tumors. The hyper methylation of tumor suppressor gene p16 is found in many types of cancers and is associated with gene silencing. The aim of this study was to determine the methylation of the promoter region p16 in samples of normal oral mucosa from patients with oral squamous cell carcinoma. The technique of MS-PCR (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction), which allowed the distinction between methylated and non-methylated alleles in the promoter region p16, was used. This study analyzed 23 samples, and 17.4% tested positive for methylation. Among these, 50% were chronic users of tobacco and 25% alcohol. Aging may be associated with methylation of p16, since the average age of positive patients was 72 years and negative patients was 56 years.

The results suggest that hyper methylation of the p16 can become important molecular marker for oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Normal oral mucosa. DNA methylation. p16 gene.

INTRODUÇÃO

O câncer bucal representa 3% das neoplasias que afetam a população brasileira, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009). O Ministério da Saúde estimou 489.270 novos casos de câncer em todo o País para o ano de 2010. Destes, 14.120 acometeriam a cavidade bucal, colocando o câncer bucal como o sétimo mais prevalente no gênero feminino, com 3.790 casos, e o quinto no gênero masculino, com 10.330 casos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2009).

O carcinoma epidermoide, originado de células do epitélio de revestimento da mucosa bucal expostas a agentes genotóxicos, corresponde a cerca de 90% das neoplasias orais malignas (SILVERMAN, 2001). Estudos têm demonstrado a associação entre a ocorrência de câncer bucal e o uso do tabaco. O risco de desenvolver a doença aumenta de cinco a nove vezes entre indivíduos fumantes em relação a não fumantes (WÜNSCH-FILHO, 2002). O consumo de álcool também tem sido relacionado com o risco de desenvolvimento do câncer bucal, principalmente quando associado ao uso do tabaco (LAMBERT *et al.*, 2011; SZYMAŃSKA *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2011).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas caracterizadas por alterações genéticas que direcionam a transformação do tecido normal em tumoral (LOEB; HARRIS, 2008). Alterações genéticas e epigenéticas podem acarretar perda do controle da proliferação celular, aumentando o risco para o desenvolvimento de neoplasia. Alterações epigenéticas são

mudanças herdáveis na expressão de um gene, sem alteração na sequência de DNA, podendo ocorrer hipermetilação, hipometilação, perda de *imprinting* gênico e modificação de cromatina (VERMA; SRIVASTAVA, 2002).

A citosina metilada (5-metilcitosina) ocorre no DNA de mamíferos por adição covalente do grupo metil (CH₃) ao carbono 5' de uma citosina. Essa modificação ocorre, em geral, em uma citosina adjacente a uma guanina (5' CG 3'), portanto em dinucleotídeos CpG (BIRD, 2002). Em células normais os dinucleotídeos CpGs, presentes em ilhas CpG, não estão metilados e, quando essa metilação ocorre, atinge os dinucleotídeos presentes em DNA não codificante (SINGAL; GINDER, 1999). No câncer, entretanto, se a metilação do DNA ocorre em ilhas CpG da região promotora ou no primeiro éxon dos genes, possui efeitos importantes na expressão gênica, sendo vinculada ao silenciamento gênico (BAYLIN; HERMAN, 2000). Quando as ilhas CpG dessa região estão metiladas, os fatores de transcrição são impedidos de se ligarem aos sítios de reconhecimento da fita de DNA, presentes na região regulatória de seus genes (SINGAL; GINDER, 1999).

A proteína p16 promove a interrupção da fase G1 do ciclo celular, por meio de inibição do complexo proteico ciclina D-CDK4/6. Essa inibição compromete a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), impedindo a liberação do fator de transcrição E2F, e a consequente progressão do ciclo celular para a fase S (HERMAN *et al.*, 1996). Portanto, o silenciamento do gene p16 desregula o ciclo celular, podendo induzir à carcinogênese.

Este estudo teve como objetivo analisar o perfil de metilação da região promotora do gene p16 em células de mucosa oral normal de indivíduos com carcinoma epidermoide da cavidade bucal.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foram analisadas amostras de DNA de células da mucosa bucal normal de indivíduos com carcinoma epidermoide atendidos no Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer de Boca, no Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória, da Secretaria de Saúde do Espírito Santo (Sesa / ES).

Foi utilizado o método de raspagem de células provenientes da mucosa bucal, utilizando-se escova citológica estéril (Kolplast, SP, Brasil). O raspado, realizado em local distante da lesão bucal, foi obtido por fricção da escova contra a superfície durante 30 segundos, acondicionado em 200µl de tampão de lise de DNA (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 1mM EDTA e 0,6% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e mantido à temperatura de 5°C.

As variáveis idade, gênero e história sobre o consumo de álcool e uso de tabaco foram avaliadas por meio de questionário. O exame físico dos indivíduos com câncer bucal permitiu avaliar o estadiamento do tumor. Essas informações foram classificadas de acordo com o American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging System (2002).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (120/2006) e o consentimento informado foi obtido de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10 de outubro de 1996.

Extração do DNA

Ao raspado de células epiteliais foram acrescentados 10µl de proteinase K, e as amostras foram incubadas a 37°C, durante 12 horas. Após esse período, adicionou-se fenol saturado com 0,1M de Tris-HCl com pH 7,0 – 8,0 e clorofórmio- álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v/v). O material foi centrifugado a uma velocidade de 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo acetato de sódio (0,3M pH 5,2) e 1,0ml de etanol absoluto. Os tubos foram armazenados à temperatura de -20°C, *overnight* e a precipitação realizada em séries decrescentes de etanol. A pureza das amostras foi verificada por espectrofotometria.

Modificação do DNA e Amplificação por MS-PCR

Foi utilizado o kit de conversão por bissulfito (*Methylcode Bissulfite Conversion Kit*-Invitrogen). As citosinas não metiladas presentes em ilhas CpG foram convertidas em uracilas, de modo a possibilitar a distinção do DNA metilado e não metilado. O DNA modificado foi amplificado pela técnica de MS-PCR, com uso de dois pares de primers para regiões metiladas e não metiladas, conforme disposto na Tabela 1 (HERMAN *et al.*, 1996).

Tabela 1 – *Primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase específica para metilação (MS-PCR)

<i>Primer</i>	P16 Metilado	P16 Não metilado
Sequência primer sense, 5'→3'	TTA TTA GAG GGT GGG GCG GAT CGC	TTA TTA GAG GGT GGG GTG GAT TGT
Sequência primer antisense, 5'→3'	GAC CCC GAA CCG CGA CCG TAA	CAA CCC CAA ACC ACA ACC ATA A
Tamanho (pb)	150	151
Temperatura de anelamento (°C)	63	58
Posição genômica	+167	+167

A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). A reação de PCR iniciou-se com o aquecimento a 95°C por 5min, seguida de 35 ciclos (95°C por 30seg / 30seg à temperatura de anelamento específica para cada *primer*, conforme indicado na Tabela 1 / 72°C por 30seg) e 4min de extensão final a 72°C. O DNA de

Nota: As colunas *unmet* e *met* correspondem a reações específicas para DNA não metilado e metilado, respectivamente, 119, 155: amostras metiladas / C+: controle positivo (células de carcinoma urotelial, linhagem T24) / C- : controle negativo (água ultrapura).

A história do consumo de álcool e tabaco está descrita na Tabela 2. Os indivíduos com resultado negativo para metilação apresentaram tempo médio de duração de uso do tabaco de 34±19 anos e consumo do álcool de 31±14 anos. Enquanto os indivíduos com resultado positivo para metilação apresentaram tempo médio de duração de uso do tabaco de 42±17 anos, considerando apenas os usuários, a história de consumo do álcool foi relatada em 55 anos por apenas um indivíduo consumista.

Tabela 2 – Características tumorais e fatores de riscos em casos positivos para metilação da região promotora de gene p16.

Amostras	Sexo	Idade	Estadiamento tumoral	Tabagista	Etilista
119	F	56	II	Não	Não
148	M	82	IV	Não	Não
155	M	87	III	Sim	Sim
158	F	63	IV	Sim	Não

Nota: M: masculino / F: feminino

Um dos casos positivos foi classificado em estágio II, segundo a classificação TNM de tumores malignos, apresentando tumor de tamanho entre 2 e 4cm (T2), sem ocorrência de metástases em linfonodos regionais (N0) ou metástases a distância do tumor primário (M0). Os outros três casos positivos para metilação foram classificados em estágios avançados. Um deles apresentou estágio III, com tumor maior que 4cm (T3) e sem metástases (N0, M0). Os outros dois foram classificados em estágio IV, apresentando tumor maior que 4cm (T3), sem metástases a distância (M0), sendo um com metástase em linfonodo, com mais de 6cm (N3) e o outro com metástase em um único linfonodo homolateral, com tamanho entre 3 e 6cm (N2). Os dados das amostras positivas para metilação do gene p16 encontram-se na Tabela 2. A média de idade dos pacientes positivos para metilação foi de 72 ± 14 anos, e os pacientes negativos apresentaram uma média de 56 ± 15 anos.

DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide é o tumor mais prevalente na região da cabeça e do pescoço. Estudos têm demonstrado aumento de sua incidência em indivíduos com idade superior a 55 anos, especialmente entre indivíduos do sexo masculino (SEOANE *et al.*, 2006; LAWOYIN *et al.*, 2005). O processo de tumorigênese resulta do acúmulo de mutações em proto e genes supressores de tumor. Nos últimos anos, diversos trabalhos têm mostrado que mutações epigenéticas nesses genes têm papel essencial na carcinogênese (FEINBERG; TYCKO, 2004; BAYLIN; HERMAN, 2000; HERMAN *et al.*, 1996). A hipermetilação da região promotora de genes supressores tumorais tem sido apontada como importante fator associado à inativação da expressão gênica e à progressão tumoral (JONES; BAYLIN, 2002; HERMAN *et al.*, 1996; BAYLIN *et al.*, 1998).

Estudos têm demonstrado elevada frequência de metilação da região promotora do gene p16 em células tumorais de carcinoma epidermoide, variando entre 23 e 50,9% dos casos (KAZUHIRO *et al.*, 2002; VISWANATHAN *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2006; ROSAS *et al.*, 2001). Sailasree *et al.* (2008) demonstraram que a ocorrência de metilação do gene p16 está associada a pior prognóstico. A metilação do gene p16 está relacionada com o aumento do risco relativo de recorrência tumoral após tratamento, enquanto 84% dos casos com ausência de metilação demonstraram resposta positiva no início do tratamento, sem células tumorais residuais.

Este estudo mostrou que a frequência de metilação da região promotora do gene p16 foi de 17,4% (4/23), resultados estes similares aos encontrados por Kato *et al.* (2006), que observaram uma frequência de 27,27% (6/22) de metilação. Von Zeidler *et al.* (2004) encontraram 17,5% de casos positivos para metilação da região promotora do p16 (45/258), em epitélio de cavidade bucal de indivíduos tabagistas sem evidências clínicas de câncer bucal. No presente estudo, 50% dos pacientes com carcinoma epidermoide positivo para metilação de DNA de células normais eram fumantes crônicos, com mais de 30 anos de uso, podendo o tabagismo estar associado a mudanças epigenéticas em células normais. Vários estudos têm mostrado que o tabagismo e o etilismo têm uma relação direta com a metilação de DNA e que a idade avançada contribui para essas alterações (SPITZ, 1994; MORSE *et al.*, 1996). Diversos estudos apontaram que o uso crônico de álcool pode influenciar na carcinogênese dos tumores da cavidade bucal (WÜNSCH-FILHO, 2002; ANDRE, 1995; LEE *et al.*, 2011). Dentre os quatro pacientes com metilação do gene p16 analisados neste trabalho, apenas um (25%) afirmou fazer uso de álcool diariamente, por 55 anos. Esses hábitos podem ter influenciado o estado hipermetilado do gene p16, no entanto os casos positivos não

expostos a esses fatores de risco sugerem que modificações epigenéticas podem estar associadas a outros fatores, como hábitos alimentares, infecções virais (HPV) e idade.

A proporção de homens e mulheres com metilação do p16 encontrada neste trabalho foi de 1:1. Zöchbauer-Müller *et al.* (2001) identificaram maior frequência em homens, em um estudo realizado com amostras de câncer de pulmão, entretanto essa relação não está esclarecida. A média de idade entre os indivíduos que apresentaram metilação do gene p16 foi de 72 anos, idade superior para a média verificada nos negativos (56 anos). O envelhecimento torna as células mais suscetíveis às alterações na expressão de genes envolvidos com a proliferação celular, diferenciação e apoptose. Diversos estudos demonstraram que a metilação das ilhas CpG aumenta com o avanço da idade (AHUJA *et al.*, 1998; ISSA *et al.*, 1994).

Os resultados deste estudo mostraram que 75% dos casos metilados se apresentavam em estádios avançados da doença, no entanto relatos sugerem que a metilação do gene p16 está relacionada com o início do desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço (EL-NAGAR *et al.*, 1997; KRESTY *et al.*, 2002), o que aponta a necessidade de estudos que agrupem maior número de indivíduos em estádios iniciais.

De acordo com os resultados deste estudo, conclui-se que o envelhecimento pode estar associado à metilação do gene p16, enquanto o estágio de desenvolvimento tumoral parece não apresentar essa relação. No entanto, são necessários mais estudos, incluindo um maior número de casos, que confirmem o papel da metilação do gene p16 e sua aplicação como possível marcador molecular de diagnóstico precoce e prognóstico do carcinoma epidermoide de cavidade bucal.

Agradecimentos: À Dra. Eliete Rabbi Bortolini pelo apoio dado aos projetos de iniciação científica realizados pelos alunos da Faesa. Ao Hospital Santa Rita de Cassia onde este estudo foi desenvolvido.

Apoio financeiro: Fundo de Apoio à Ciência e Tecnologia do município de Vitória (Facitec – PMV) / ES, Brasil.

REFERÊNCIAS

AHUJA, N. et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. **Cancer Research**, n. 58, p. 5489-5494, 1998.

ANDRE, K. et al. Role of alcohol and tobacco in the etiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *Oral Oncology*, **European Journal of Cancer**, 31B, p. 301-309, 1995.

BAYLIN, S.B. et al. Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. **Advance Cancer Research**, n. 72, p. 141-196, 1998.

BAYLIN, S.B.; HERMAN, J.G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetic joins genetics. **Trends in Genetics**, n. 16, p. 168-174, 2000.

BIRD, A. DNA Methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, n. 16, p. 6-21, 2002.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2009.

EL-NAGAR, A. K. et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 6, n. 151, p. 1767-1774, 1997.

FEINBERG, A.P.; Tycko, B. The history of cancer epigenetics. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 143-153, 2004.

HERMAN, J.G. et al. Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 18, n. 93, p. 9821-9826, 1996.

ISSA, J. P. et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nature Genetics**, n.7, p. 536-540, 1994.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 3, p. 415-428, 2002.

KATO, K. et al. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 11, n. 132, p. 735-743, 2006.

KAZUHIRO, O. et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, n. 8, p. 3164-3171, 2002.

KRESTY, L.A. et al. Alterations of p16INK4a and p14ARF in patients with severe oral epithelial dysplasia. **Cancer Research**, n. 62, p. 5295-5300, 2002.

LAWOYIN, J.O. et al. Intra-oral squamous cell carcinoma in Nigerians under 40 years of age: a clinicopathological review of eight cases. **The African Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 1, n. 34, p. 99-102, 2005.

LAMBERT, R. et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 23, p. 633-41, 2011.

LEE, C. H. et al. The use of tobacco-free betel-quid in conjunction with alcohol/tobacco impacts early-onset age and carcinoma distribution for upper aerodigestive tract cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Mar., 2011. (Epub ahead of print).

LOEB, L.A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **American Association for Cancer Research**, n. 68, p. 6863-6872, 2008.

MORSE, D.E., KATZ, R.V. Pendrys D.G. Smoking and drinking in relation to oral epithelial dysplasia. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, n. 5, p.769-777, 1996.

ROSAS, S.L.B. et al. Promoter Hypermethylation Patterns of p16, O6-Methylguanine-DNA-methyltransferase, and Death-associated Protein Kinase in Tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients. **Cancer Research**, n. 61, p. 939-942, 2001.

SAILASREE, R. et al. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 2, n. 17, p. 414-420, 2008.

SEOANE, J. et al. Oral cancer: experiences and diagnostic abilities elicited by dentists in North-Western Spain. **Oral Disease**, v. 5, n. 12, p. 482-492, 2006.

SILVERMAN Jr., S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: the outcomes, the trends, the challenge. **The Journal of the American Dental Association**, n. 132, p. 7-11, 2001.

SPITZ M. R. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. **Seminars Oncology**, n. 21, p. 281-288, 1994.

SINGAL, R.; Ginder, G. D. DNA methylation. **Blood**, v. 12, n. 93, p. 4059-4070, 1999.

SZYMAŃSKA K. et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. **Cancer Causes Control**, v. 7, n. 22, p.1037-1046, 2011.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: Implications for early detection and prevention. **Lancet Oncology**, v. 12, n. 3, p. 755-763, 2002.

VISWANATHAN, M.; TSUCHIDA, N.; Shanmugam, G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, n. 105, p. 41-46, 2003.

VON ZEIDLER, S.V. *et al.* Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. **International Journal of Molecular Medicine**, n. 5, p. 807-11, 2004.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncology**, n. 38, p.737-746, 2002.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in nonsmall cell lung cancer. **Cancer Research**, n. 61, p. 249-255, 2001.

Recebido em março de 2011

Aceito em outubro de 2011

Correspondência para/ Reprint request to:

Dra. Sonia Alves Gouvêa

Dept. Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde,

Universidade Federal do Espírito Santo

Avenida Marechal Campos, 1468 - Vitória, ES, Brasil

CEP: 29042-755

Telefone: 55-27-33357333 - Fax: 55-27-33357330

E-mail: gouveasa@yahoo.com.br; sagouvea@ppgcf.ufes.br