

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas  
Nível Mestrado

## **Análise da metiltransferase *SUV39H1* e da enzima telomerase na carcinogênese oral**

Beatriz Itai Haupt Ribeiro

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Doralina do Amaral Rabello Ramos

Coorientador: Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Brasília

2022

**Análise da metiltransferase *SUV39H1* e da enzima telomerase na  
carcinogênese oral**

Dissertação para defesa de mestrado  
apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina  
da Universidade de Brasília.

Brasília

2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Paulo e Yurika, que tanto me apoiaram e ajudaram, e por estarem sempre comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, cujo apoio e incentivo foram essenciais para que eu chegasse aqui;

Ao meu coorientador, por todo apoio;

Ao apoio financeiro da CAPES, FAP/DF e CNPq;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas;

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP;

À Universidade de Brasília.

## RESUMO

As alterações epigenéticas são mudanças que ocorrem no material genético sem alterar a sua sequência de bases nitrogenadas. Elas são influenciadas pela ação de diversas enzimas, como a metiltransferase SUV39H1. Essas alterações podem contribuir para a malignidade celular, como já visto em câncer de mama e de pulmão. Já a parte catalítica hTERT da enzima telomerase possui contribuição na manutenção dos telômeros, estando relacionada com a estabilidade e proteção do genoma, possuindo também participação na carcinogênese, com suas funções canônicas e não-canônicas. Este estudo, pelo método de PCR quantitativa em tempo real, analisou a expressão dos genes *SUV39H1* e *hTERT* em amostras tumorais de boca e amostras de margem normal, para melhor entender o seu comportamento no contexto específico do câncer de boca e assim analisar a possibilidade de seu uso como biomarcador molecular para um diagnóstico ou prognóstico mais acurado e para ajudar no progresso das pesquisas sobre o câncer de boca, buscando um melhor manejo clínico para os pacientes acometidos por esta doença. Neste estudo foi encontrado que a expressão de *SUV39H1* foi maior em amostras de margem normal (QR = 1,227) quando comparadas com amostras tumorais (QR = 0,5250), enquanto a expressão de *hTERT* teve uma tendência de maior expressão nas amostras tumorais (QR = 69,76) quando comparada com a expressão em amostras de margem normal (QR = 5,179). O resultado encontrado para *hTERT* coincide com o descrito na literatura, de maior expressão na maioria dos cânceres. Já *SUV39H1* mostrou um comportamento heterogêneo nas análises experimentais e *in silico*, além de não apresentar correlação com a expressão de *hTERT*. Embora mais estudos sejam necessários, estes resultados proporcionam um maior entendimento acerca do funcionamento de *SUV39H1* e *hTERT* no câncer de boca, proporcionando dados que até então não estavam disponíveis na literatura científica.

**Palavras-chave:** câncer de boca, epigenética, histonas, metiltransferase, SUV39H1, telomerase, hTERT, expressão gênica, expressão proteica.

## ABSTRACT

Epigenetic alterations are changes that occur in the genome without modifying its nucleotide bases sequence. These alterations can be influenced by enzymes methyltransferases, such as SUV39H1. These alterations can contribute to cancer malignancy, as shown in breast and liver cancer. Moreover, catalytic unit of telomerase, hTERT, contributes to telomere maintenance, being related to stability and genome's protection, and may participate in cancer malignancy with its canonical and non-canonical functions as well. In this study, using quantitative real time PCR, the expression profile of *SUV39H1* e *hTERT* was analyzed using normal margin and oral cancer samples to better understand their behavior in the context of this cancer and then analyze their potential use as diagnosis or prognosis biomarker in oral cancer and contribute to research development. It was found that *SUV39H1* expression was higher in normal margin (RQ = 1,227) when compared to the expression in tumor tissue (RQ = 0,5250), while for *hTERT*, the tendency was a higher expression in tumor tissue (RQ = 69,76) compared to normal margin (RQ = 5,179). *hTERT* showed the same behavior described in the literature for most types of cancer. However, *SUV39H1* showed a heterogeneous behavior in experimental and *in silico* analyses, with no correlation to *hTERT* expression. Although more studies are necessary, these results provide a better understanding of *SUV39H1* e *hTERT* in oral cancer, providing data that were not available until this moment, contributing for the progress of oral cancer research.

**Keywords:** oral cancer, epigenetics, histones, methyltransferases, SUV39H1, telomerase, hTERT, gene expression, protein expression.

## SIGLAS E ABREVIACOES

<b>SUV</b>	Supressor of Variegation
<b>DNA</b>	cido Desoxirribonucleico
<b>OMS</b>	Organizao Mundial da Sade
<b>RNA</b>	cido Ribonucleico
<b>RNA<sub>m</sub></b>	cido Ribonucleico mensageiro
<b>cDNA</b>	cido Desoxirribonucleico Complementar
<b>qPCR</b>	Reao em Cadeia da Polimerase Quantitativa
<b>hTERT</b>	Transcriptase Reversa da Telomerase
<b>H3K9me3</b>	Trimetilao da Histona 3 Lisina 9

## FIGURAS

Figura 1: Hallmarks do câncer. ....	2
Figura 2: Fatores de risco para o câncer de boca. ....	5
Figura 3: Epigenética .....	7
Figura 4: Estrutura do telômero e sua sequência de repetição G-Quadruplex (TTAGGG). ....	11
Figura 5: Gráficos da análise de associação entre a expressão de <i>SUV39H1</i> e os dados clínicos dos pacientes. ....	22
Figura 6: Gráficos da análise de associação entre a expressão de <i>hTERT</i> e os dados clínicos dos pacientes. ....	23

## TABELAS

Tabela 1: Descrição das Bases de Dados utilizadas na pesquisa <i>in silico</i> . ....	16
Tabela 2: Análise de Contingência entre a expressão de <i>SUV39H1</i> e <i>hTERT</i> e os dados clínicos. ....	24

## GRÁFICOS

Gráfico 1: Estimativa de novos casos de câncer de boca no Brasil no período de 2012 a 2020. ....	4
Gráfico 2: Distribuição dos pacientes de acordo com o gênero. ....	17
Gráfico 3: Distribuição dos pacientes de acordo com as faixas etárias. ....	17
Gráfico 4: Distribuição dos pacientes de acordo com a localização anatômica dos tumores. ....	18
Gráfico 5: Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento dos tumores. ....	18
Gráfico 6: Distribuição dos pacientes de acordo com a ocorrência de recidiva dos tumores. ....	18
Gráfico 7: Distribuição dos pacientes de acordo com a ocorrência de óbitos. ....	19
Gráfico 8: Expressão de <i>SUV39H1</i> em amostras normais e tumorais pelo cálculo matemático $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . ....	19
Gráfico 9: Expressão de <i>hTERT</i> em amostras normais e tumorais pelo cálculo matemático $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ....	20
Gráfico 10 - Expressão de <i>hTERT</i> em amostras normais e tumorais em gráfico seccionado. ....	21
Gráfico 11: Correlação de Spearman entre a expressão dos genes <i>hTERT</i> e <i>SUV39H1</i> . ....	21
Gráfico 12: Expressão do gene <i>SUV39H1</i> em amostras normais e tumorais de acordo com o banco de dados UALCAN. Adaptado. ....	25
Gráfico 13: Curva de sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com os níveis de expressão do gene <i>SUV39H1</i> . Adaptado. ....	25
Gráfico 14: Expressão do gene <i>hTERT</i> em amostras normais e tumorais de acordo com o banco de dados UALCAN. Adaptado .....	26
Gráfico 15: Curva de sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com os níveis de expressão do gene <i>hTERT</i> . Adaptado. ....	27
Gráfico 16: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com a localização anatômica dos tumores dos pacientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA). ....	27
Gráfico 17: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o gênero dos pacientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA). ....	28
Gráfico 18: Distribuição dos pacientes de acordo com a ocorrência de óbitos, segundo os dados clínicos do The Cancer Genome Atlas (TCGA). ....	28
Gráfico 19: Expressão do gene <i>SUV39H1</i> em amostras normais e tumorais em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o banco de dados Oncomine. Adaptado. ....	29



Gráfico 20: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com a localização anatômica dos tumores dos pacientes do Estudo de Gino. ....	29
Gráfico 21: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o gênero dos pacientes do Estudo de Gino. ....	29
Gráfico 22: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o estadiamento dos tumores dos pacientes do Estudo de Gino. ....	30

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. CÂNCER DE BOCA.....	2
1.2. EPIGENÉTICA.....	5
1.3. SUV39H1.....	8
1.4. TELOMERASE.....	10
2. <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	12
3. <b>OBJETIVOS</b> .....	13
3.1. OBJETIVO GERAL.....	13
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
4.1. SUJEITOS.....	14
4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS, SÍNTESE DE cDNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR).....	14
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
4.4. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	16
5. <b>RESULTADOS</b> .....	16
5.1. DADOS CLÍNICOS.....	16
5.2. qPCR.....	19
5.2.1. <i>SUV39H1</i> .....	19
5.2.2. <i>hTERT</i> (TELOMERASE).....	20
5.3. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO.....	21
5.3.1. CORRELAÇÃO ENTRE <i>hTERT</i> x <i>SUV39H1</i> .....	21
5.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES E OS DADOS CLÍNICOS.....	22
5.4.1. EXPRESSÃO DO GENE <i>SUV39H1</i> x DADOS CLÍNICOS.....	22
5.4.2. EXPRESSÃO DO GENE <i>hTERT</i> x DADOS CLÍNICOS.....	23
5.5. ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA.....	23
5.6. ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	24
5.6.1. UALCAN.....	24
5.6.1.1 <i>SUV39H1</i> .....	24
5.6.1.2 <i>hTERT</i> .....	26
5.6.2. The Cancer Genome Atlas (TCGA).....	27
5.6.3. Oncomine.....	28
6. <b>DISCUSSÃO</b> .....	30
7. <b>CONCLUSÃO</b> .....	36
8. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	37

## 1. INTRODUÇÃO

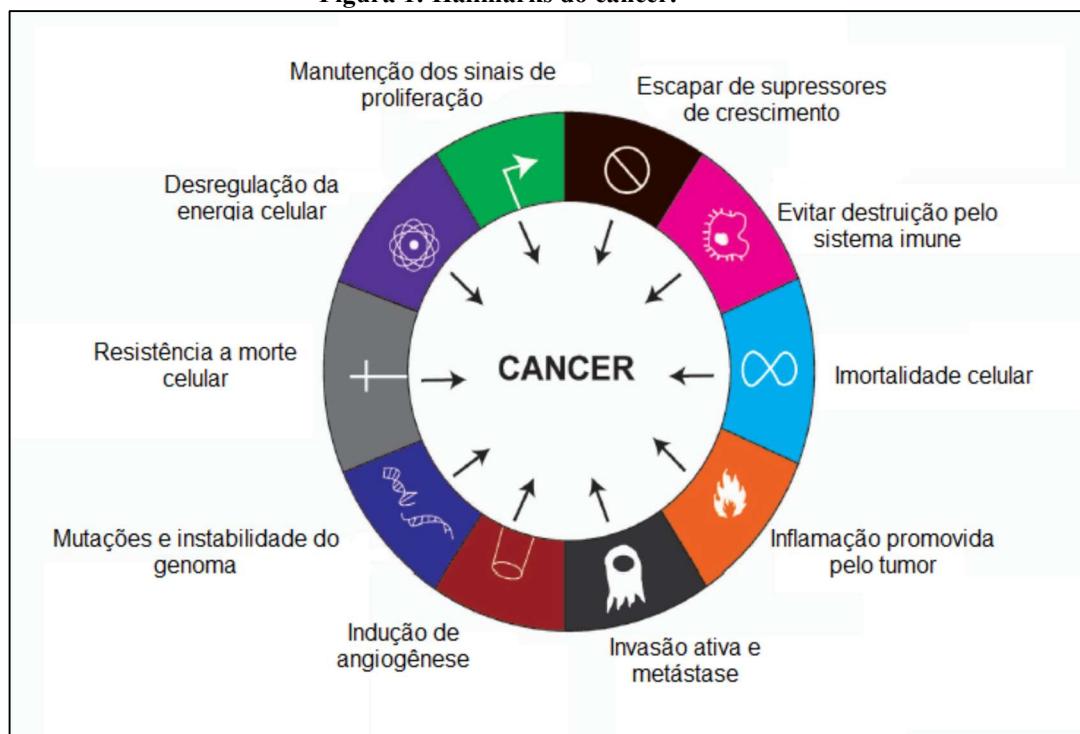
Nos últimos anos houve uma mudança no perfil epidemiológico das doenças no mundo, principalmente como consequência da modernização e aumento das descobertas no ramo da ciência. Com o avanço das pesquisas e a disponibilidade de tratamentos e vacinas, as mortes por doenças infecciosas e parasitárias como AIDS, dengue e hepatites diminuíram, elevando as doenças não comunicáveis (doenças cardíacas, câncer, diabetes e doenças respiratórias crônicas) como a principal causa de mortes no mundo atualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

O câncer, doença que pode ter origem em praticamente qualquer tecido do corpo humano, é responsável por 1 a cada 6 mortes no mundo, sendo de alta relevância para a saúde pública (OMS, 2018, 2020).

Por definição, câncer, ou neoplasia maligna, é a divisão descontrolada e contínuo crescimento das células de qualquer tecido do corpo humano de forma aleatória e desorganizada, provocando um mau funcionamento das funções da célula e gerando danos ao organismo. Podem decorrer de mutações no material genético e de alterações epigenéticas, que podem se originar de diversas causas, os chamados fatores de risco, ou até mesmo acontecer de forma espontânea no processo da divisão celular (LÓPEZ-LÁZARO, 2017; OMS, 2020; PODOLSKIY; GLADYSHEV, 2016).

Os fatores de risco podem ser hereditários ou agentes externos/ambientais. Esses agentes podem ser as radiações ultravioletas, radiações ionizantes, componentes do tabaco, aflotoxinas e vírus como o HPV (Figura 1). Tais fatores não são mutuamente excludentes, podendo resultar em um efeito agravante quando somados (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015; PODOLSKIY; GLADYSHEV, 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020). No decorrer da vida de um indivíduo, aumentam-se as chances de desenvolver um tumor, em decorrência de suas células já terem passado incontáveis vezes pelo processo de multiplicação celular, podendo ocorrer acúmulos de alterações no material genético. Assim, tanto as alterações genéticas espontâneas quanto as que ocorrem por influência dos fatores de risco podem permanecer no material genético sem um produto visível imediato, podendo levar tempo até que manifeste uma transformação das células (LÓPEZ-LÁZARO, 2017; MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

**Figura 1: Hallmarks do câncer.**



Fonte: CONNOR A. H. and WONG, JUDY M. Y. Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase: Emerging roles and biological relevance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Volume 20, páginas 498-507. 2020. Adaptado.

As mutações alteram as vias moleculares das células, modificando assim o produto final do processo de leitura do material genético e fabricação de proteínas, influenciando nas vias de sinalização intracelular que controlam, por exemplo, a multiplicação celular, apoptose, processos de compactação do DNA. Tanto as mutações propriamente ditas como as alterações em decorrência dos mecanismos epigenéticos, não são acontecimentos excludentes: é possível ocorrer uma mudança na sequência de bases em um gene que codifica componentes que participam do processo epigenético, gerando assim uma acumulação de motivos, que podem ainda se somar com os fatores de risco, ocorrendo um aumento e acúmulo de alterações e início do processo carcinogênico (CAVALLI; HEARD, 2019; LÓPEZ-LÁZARO, 2017; NAKAYAMA; ARIKAWA; BHAWAL, 2017).

## 1.1. CÂNCER DE BOCA

Como já citado anteriormente, o câncer inicia o seu desenvolvimento a partir da multiplicação desordenada das células de um tecido qualquer do corpo devido a algum estímulo que levou à alteração genética ou epigenética. No caso do câncer de boca, essa multiplicação desordenada pode se iniciar a partir de pequenas lesões e inflamações

crônicas, com presença de uma mucosa hiperplásica, onde já há a inativação de genes supressores de tumor. As lesões se tornam persistentes, ocorrendo uma transição para displasia, com perda da especialização celular, em que pode ocorrer uma reversão ou avanço para o estágio seguinte. A partir da displasia, pode ocorrer a evolução para um carcinoma *in situ*, até progredir para um carcinoma invasivo, com a possibilidade de metástase (BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, 2020; JOHNSON et al., 2020; SHIN; KIM, 2018).

Os sinais clínicos que podem surgir nos pacientes são dor, sangramento, disfagia, parestesia, perda de dente e perda de peso, devido à dificuldade de ingestão de alimentos. Esse conjunto de sinais e sintomas gera uma situação que possui reflexos também na qualidade de vida do paciente (BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, 2020; ERNANI; SABA, 2015; OMS, 2018; PATEL et al., 2016; SHIN; KIM, 2018).

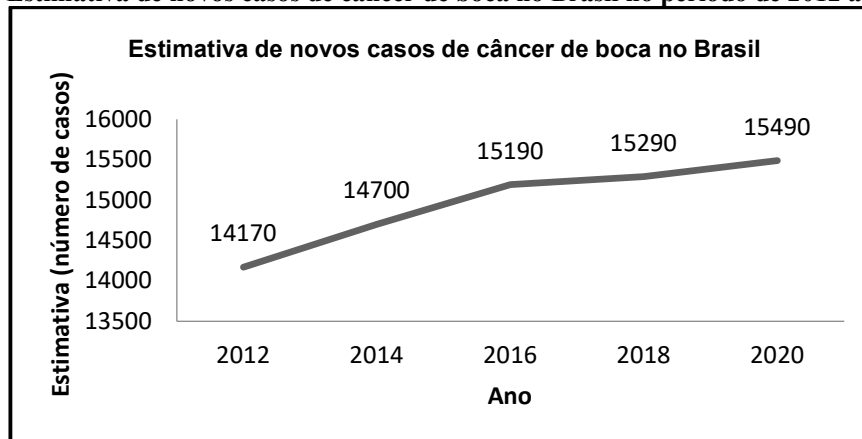
As estruturas anatômicas que delimitam e fazem parte da cavidade oral são os lábios, mucosa bucal, trígono retromolar, cristas alveolares, palato duro, assoalho da boca e a língua (ANAND et al., 2018). O câncer de boca se desenvolve em sua maioria a partir das células epiteliais escamosas, sendo o subtipo de câncer de boca mais comum o carcinoma de células escamosas, que corresponde a 90% dos casos. Os restantes 10% variam entre sarcomas, linfomas, tumores nas glândulas salivares e adenocarcinomas, entre outros (ELJABO et al., 2018; ERNANI; SABA, 2015). As regiões da boca que acumulam a maior incidência de lesões que levam ao desenvolvimento de um tumor maligno são a língua e o assoalho bucal, sendo esta última a região que apresenta geralmente as lesões de maior agressividade (ERNANI; SABA, 2015).

No Brasil, o câncer de boca representa 3,4% dos novos casos previstos para o período de 2020 até o ano de 2022, segundo dados retirados da Estimativa 2020, feita pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2020). Desde 2012, a incidência de novos casos cresceu, tendo aumentado aproximadamente 10%, como pode ser observado no Gráfico 1.

Mesmo com todos os avanços científicos e tecnológicos e o considerável número de publicações nessa área, o câncer de boca continua tendo um prognóstico desfavorável e sendo uma doença que é descoberta tardiamente, na maioria dos casos, quando já apresenta um alto comprometimento dos tecidos bucais, com grande área afetada, o que torna as intervenções mais agressivas aos pacientes, com maior duração do tratamento e com mais sequelas. Como o diagnóstico em estágios mais avançados está fortemente relacionado

com a inacessibilidade a um acompanhamento por um profissional de saúde, o câncer de boca é considerado um problema de saúde pública mundialmente, principalmente em países de médio e baixo desenvolvimento, que juntos apresentam 70% das mortes relacionadas a essa doença (OMS, 2018, 2020).

**Gráfico 1: Estimativa de novos casos de câncer de boca no Brasil no período de 2012 a 2020.**



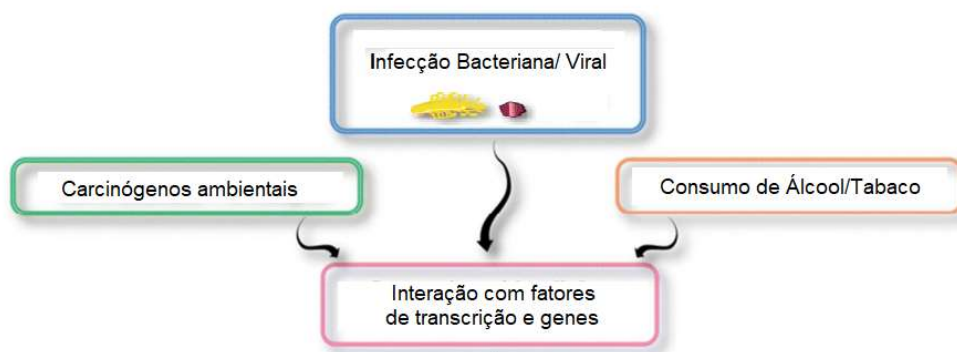
Fonte: INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas Incidência de Câncer no Brasil do ano de 2012 a 2020. Disponível em < <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros>>.

Por ser uma via de acesso ao interior do organismo e seu tecido constituinte não possuir proteções como a queratina da pele, a cavidade oral é altamente exposta a fatores externos. Assim, o câncer de boca possui uma etiologia multifatorial, que tem como seus principais fatores de risco o consumo exacerbado de álcool e tabaco (independente da sua forma de consumo ser o fumo ou o mascado) e infecção pelo vírus do papiloma humano (Figura 2), além do sol, nos casos de câncer nos lábios (BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, 2020; D’SOUZA; SARANATH, 2015; KUMAR et al., 2016; SHIN; KIM, 2018).

Em sua maioria, esses fatores quando associados possuem ação sinérgica, aumentando seus efeitos carcinogênicos. Entretanto, a maioria dos casos relacionados à infecção pelo HPV não possuem ligação com o consumo de álcool e tabaco e sim com uma mudança nos hábitos da vida sexual, fato observado mais frequentemente em pacientes jovens. Pacientes com câncer de cabeça e pescoço recorrente, ou que progrediram para a fase metastática, ou que possuem múltiplos tumores primários (decorrentes da cancerização de campo, quando uma área de um tecido ou órgão é afetada pelas alterações carcinogênicas, aumentando a probabilidade de ocorrer um segundo tumor primário) possuem um prognóstico mais desfavorável quando comparados aos demais casos. O

estágio em que o câncer de boca é diagnosticado é um fator diretamente relacionado com a efetividade do tratamento. Portanto, como a maioria dos diagnósticos feitos para câncer de boca são tardios, o tratamento mais adotado é a cirurgia, seguida de radioterapia, métodos mais agressivos (BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, 2020; D'SOUZA; SARANATH, 2015; MOHAN; JAGANNATHAN, 2014; SHIN; KIM, 2018).

**Figura 2: Fatores de risco para o câncer de boca.**



Fonte: BANIEBRAHIMI G., MIR F & KHANMOHAMMADI R. Cancer stem cells and oral cancer: insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Cancer Cell Int*. Volume 20, página 113. 2020. Adaptado.

## 1.2. EPIGENÉTICA

*Modificações que não interferem na sequência original de bases nitrogenadas do material genético, como ocorre nas mutações gênicas, mas que possuem a capacidade de propagar, no DNA e por RNA não codante, estados alternativos da atividade de um gene, alterando a estrutura da cromatina.* Essa é a definição de epigenética. Pela sua capacidade de ser transmitida após a divisão celular, diz-se que ela é herdada (BENEVENTO et al., 2015; CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017; CAVALLI; HEARD, 2019; FARDI; SOLALI; FARSHDOUSTI HAGH, 2018).

O sistema de regulação epigenético é atuante nas condições normais da célula, em resposta a estímulos da condição ambiental ou por uma necessidade do desenvolvimento celular. Se a sua função será de inibir ou estimular a expressão de um gene, irá depender da interpretação da modificação feita por terceiros, da região em que ela se encontra e em qual gene irá atuar. Contudo, em muitos estados de doença, os mecanismos epigenéticos se encontram desregulados, favorecendo e mantendo a doença, como ocorre em muitos tipos de câncer e também diabetes, lúpus e asma. Em razão desse fato, a epigenética vem sendo muito estudada, para que se entenda seus mecanismos e as moléculas envolvidas e assim se

possa analisar uma possível aplicação no desenvolvimento de novos fármacos e tratamentos, métodos de detecção e prognóstico, já que estas modificações são reversíveis (BENEVENTO et al., 2015; CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017; CAVALLI; HEARD, 2019; FARDE; SOLALI; FARSHDOUSTI HAGH, 2018).

As alterações epigenéticas incluem a metilação do DNA, modificações químicas covalentes pós-traducionais das proteínas histonas e não-histonas, como a acetilação, metilação, fosforilação; e a regulação por ação de RNAs não-codantes (D'SOUZA; SARANATH, 2015).

A metilação do DNA ocorre diretamente em sua estrutura, mais especificamente na região dos promotores dos genes, o que leva à inativação desses genes, não ocorrendo a sua expressão. A metilação ocorre em ambas as fitas que formam a estrutura de dupla hélice do DNA (ELJABO et al., 2018; JELTSCH; BROCHE; BASHTRYKOV, 2018).

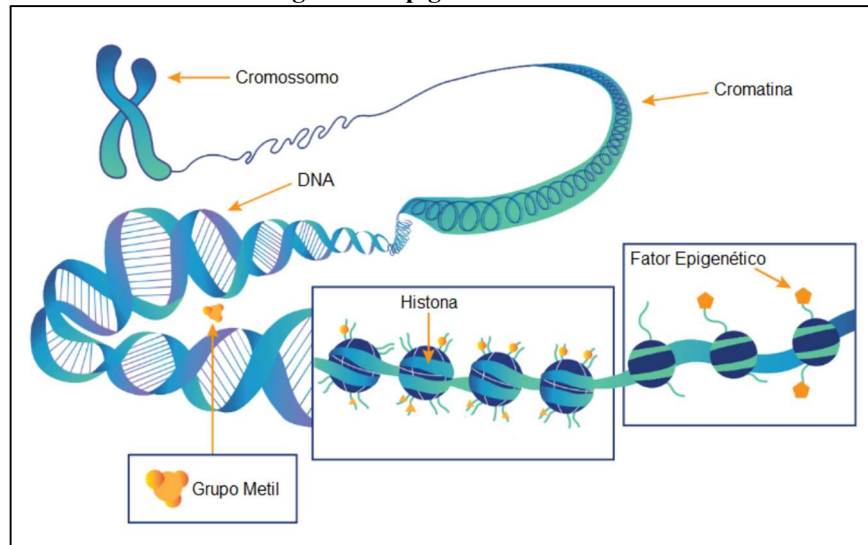
O RNA não-codante corresponde a pequenas moléculas de RNA que não possuem função na transcrição gênica propriamente dita, mas que possuem papel como reguladores dos processos que estão ligados a ela, podendo ser, por exemplo, um microRNA ou um RNA pequeno de interferência. Eles estão relacionados à conformação da cromatina, a uma maior ação repressiva na transcrição dos genes e podem estar ligados à hereditariedade epigenética pela formação de loops na heterocromatina (CAVALLI; HEARD, 2019).

As alterações pós-traducionais em histonas ocorrem na cauda N-terminal desta proteína (parte que fica exposta, estando mais acessível para que as reações enzimáticas ocorram), e desencadeiam consequências na biologia molecular das células desde a embriogênese até o desenvolvimento de doenças (RAO; PAL; TANEJA, 2017).

A conformação estrutural da cromatina possui influência direta no controle da expressão dos genes. Em virtude dessas alterações em histonas mudarem a estrutura da cromatina, elas estão diretamente associadas com a expressão gênica e integridade do genoma. Com a mudança no funcionamento das enzimas que realizam essas reações, ocorrem mudanças no espaçamento do material genético, tendo influência direta nos genes e sua desregulação (BENEVENTO et al., 2015).



**Figura 3 - Epigenética**



Fonte: Savelieff, Masha. Above the genome: How epigenetics influences cancer and obesity. *Genomics Research*. 2018. Disponível em <<https://www.technologynetworks.com/genomics/articles/above-the-genome-how-epigenetics-influences-cancer-and-obesity-310015>>. Adaptado.

Devido à extensão do tamanho do material genético e a necessidade de armazená-lo no micro espaço de uma célula, é necessário compactá-lo. Para que isso efetivamente ocorra, o material genético é enrolado nas proteínas histonas, ficando compactado e organizado na forma de nucleossomos, que juntos formam a cromatina. A cromatina é essencial para entender o estudo da epigenética, pois estão intimamente ligados. As marcações epigenéticas modificam justamente a densidade e compactação da cromatina, controlando a dinâmica entre um DNA frouxo, com suas bases nitrogenadas acessíveis para uso e um DNA mais rígido, influenciando sua estabilidade, ajustando-a de acordo com a demanda celular de transcrição, replicação ou reparo, como indicado na Figura 3 (FARDI; SOLALI; FARSHDOUSTI HAGH, 2018).

A cromatina pode variar entre duas formas, a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina, por mais que esteja compactada, é mais frouxa, e permite o acesso de proteínas ao DNA e possui maior quantidade de genes, enquanto a heterocromatina é mais densa, contendo sequências repetidas do DNA e número inferior de genes. As marcas da repressão gênica em histonas estão presentes em ambas as formas, sendo mais quantitativamente presente na heterocromatina (BENEVENTO et al., 2015; LIN et al., 2018). A heterocromatina pode ainda ser subdividida em facultativa, parte mais envolvida na expressão gênica, e constitutiva, como os telômeros e centrômeros (BENEVENTO et al., 2015).

Os fatores que determinam qual será o resultado final da metilação catalisada por uma metiltransferase na histona, como ativação ou repressão do gene, dependem da sequência genética da histona, qual aminoácido foi metilado e qual a sua posição na cauda N-terminal, bem como qual o grau de metilação foi catalisado – mono, di ou trimetilado (RAO; PAL; TANEJA, 2017).

Uma particularidade das alterações epigenéticas é a sua possibilidade de reversão: há um sistema de enzimas, como as demetilases de histonas, que agem de forma inversa à das metilases, retirando um grupo metil da cauda N-terminal das histonas, podendo ocorrer uma interrupção na sinalização feita previamente pelas metilases de histonas. Esse acontecimento exemplifica a plasticidade das mudanças epigenéticas. Entretanto, as mudanças epigenéticas são hereditárias, e para permanecerem nas células filhas não podem ser desfeitas (CAVALLI; HEARD, 2019; NAKAYAMA; ARIKAWA; BHAWAL, 2017).

### **1.3. SUV39H1**

As proteínas da família de histonas metiltransferases são agrupadas por possuírem em comum um domínio catalítico SET, que fornece a energia necessária para que a reação de metilação executada por elas aconteça. São integrantes do subgrupo de SUV39 as proteínas SUV39H1 (KMT1A), SUV39H2 (KMT1B), SETDB1 (KMT1E), SETDB2 (KMT1F), G9A (EHMT2) e proteína G9a-like (GLP1) (LI; ZHENG; YANG, 2019). Especificamente as enzimas SUV39H(1-2) possuem na extremidade C-terminal o seu domínio SET, responsável pela catalização da metilação, e na extremidade N-terminal da enzima, possuem um cromodomínio, que reconhece o local que irá ser metilado e se liga a ele (SHIRAI et al., 2017).

A histona SUV39H1(Suppressor of variegation 3-9 homolog 1) é responsável por catalisar a reação de transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina para o resíduo de lisina na posição 9 da cauda N-terminal da histona 3 do nucleossomo. Essa enzima se liga à região da cromatina já metilada por outras enzimas da mesma família, aumentando o nível de metilação para dimetilação ou trimetilação, que funcionam como uma sinalização para outros elementos, em conjunto com proteínas da família HP1, que irão se ligar à região metilada e iniciar o processo de compactação da cromatina e repressão transcricional (JOHNSON et al., 2017; RAO; PAL; TANEJA, 2017).

A trimetilação executada por SUV39H1 está associada com a conformação constitutiva da heterocromatina. Essa conformação do material genético é principalmente encontrada nas regiões pericentroméricas e de centrômero e telômero e é formada principalmente por regiões repetidas de DNA, que por sua estrutura, são regiões de importância para execução da segregação do material genético e contribuem para a estabilidade do genoma. Possui função também nos processos ligados ao reparo do DNA, manutenção do telômero, diferenciação celular e envelhecimento (JOHNSON et al., 2017). Quando há o rompimento da dupla fita de DNA, fatores atuantes na compactação do mesmo, como SUV39H1, são recrutados para executar o processo de recombinação homóloga, que é um dos mecanismos existentes de reparo do DNA (ALAGOZ et al., 2015). Estudos que avaliaram a relação entre SUV39H1 e a heterocromatina mostraram que há uma forte concentração desta enzima na região pericentromérica (SHIRAI et al., 2017). Seus mecanismos suprimem genes que transcrevem produtos necessários para a proliferação celular, desempenhando assim uma função de supressor de tumor (RAO; PAL; TANEJA, 2017).

Na fase de metáfase da divisão celular, há uma concentração de SUV39H1 na região dos centrômeros e essa compactação é importante para o processo de segregação das cromátides na mitose, pois sem ela podem ocorrer disfunções no material genético, que pode levar à expressão de produtos alterados (RAO; PAL; TANEJA, 2017).

A marca da trimetilação é uma forte sinalização da heterocromatina e do silenciamento de genes. Ela gera sítios de ligação para proteínas que, após encaixadas a este sítio, irão interpretar e executar os comandos recebidos dessa sinalização. A região dos telômeros também é formada pela heterocromatina e se encontra alterada quando há a ausência de SUV39H1. (GARCÍA-CAO et al., 2004; RIVERA et al., 2015; SHIRAI et al., 2017; TRYBEK et al., 2020).

A ausência da marca da trimetilação gera defeitos na estruturação da heterocromatina, conseqüentemente gerando uma região pericêntrica frágil, fato observado em camundongos *knockout* para *SUV39H1*, que apresentaram instabilidade nos cromossomos e aumento no risco de formação de tumores (JOHNSON et al., 2017). Camundongos completamente *knockout* para *SUV39H1* demonstraram redução geral nos níveis de trimetilação em H3K9, juntamente com letalidade pré-natal, mostrando um

possível envolvimento dessas enzimas com o desenvolvimento de mamíferos (ZHENG et al., 2018).

Estudos prévios sobre a metilação de histonas em câncer de boca mostraram que a metilação da lisina 9 da histona 3 está aumentada em 47%, em uma análise realizada em 199 amostras parafinizadas de casos de câncer de boca pela técnica de imunohistoquímica, avaliando apenas a presença ou não da forma de trimetilação, quando comparados com tecido saudável, onde os níveis de metilação foram baixos. Apenas as amostras com coloração de média a alta foram consideradas como positivas para a trimetilação. Esse estudo mostra a presença da modificação final da histona, mas não o comportamento dela nesse contexto e nem qual enzima metiltransferase especificamente catalisou essa metilação, pois há várias enzimas que podem desempenhar essa atividade, ressaltando a relevância de haver uma análise da expressão de *SUV39H1* no câncer de boca (CHEN et al., 2013; D'SOUZA; SARANATH, 2015). Em amostras parafinizadas de carcinoma de células escamosas de esôfago, houve marcação alta para a trimetilação de H3K9 e H4K20, estando relacionadas a um pior prognóstico para esse câncer (ZHOU et al., 2019).

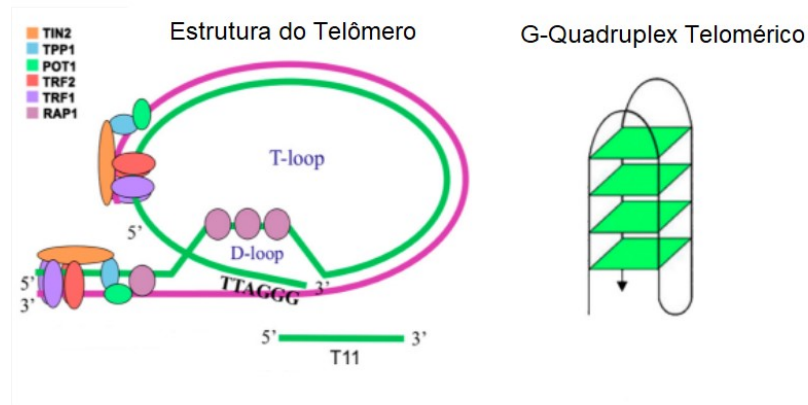
Este estudo busca unir o conhecimento já estabelecido sobre o gene *SUV39H1* e sua possível atuação no câncer de boca, para uma melhor caracterização de seu papel neste câncer específico, buscando entender o seu potencial de se tornar um biomarcador molecular e assim auxiliar, futuramente, no diagnóstico ou prognóstico do câncer de boca, suprimindo essa demanda existente no cenário clínico.

#### **1.4. TELOMERASE**

Os telômeros, terminações do cromossomo formadas por complexos de repetições da sequência não-codante (TTAGGG)<sub>n</sub>, vide Figura 4, possuem a função de proteger o DNA, impedindo erosão, desgaste e fusão. Além de poder ser influenciado por eventos epigenéticos que já foram mencionados, o comprimento do telômero pode ser usado como biomarcador para demonstrar os efeitos cumulativos do ambiente no genoma, pois o telômero está associado com o envelhecimento das células, já que a cada nova divisão celular, eles não são replicados por completo, tendo as suas terminações diminuídas a cada vez. Quando as terminações teloméricas ficam muito encurtadas, ativam respostas de controle de dano ao DNA, como a apoptose e senescência celular. Devido a esse controle

da vida celular, a má regulação dos telômeros contribui para o desenvolvimento de células tumorais, com o comprimento dos telômeros já tendo sido relacionado a um pior prognóstico em pacientes com melanoma (IVANCICH et al., 2017; LABERTHONNIÈRE; MAGDINIER; ROBIN, 2019; LIN et al., 2019; RACHAKONDA et al., 2018).

**Figura 4: Estrutura do telômero e sua sequência de repetição G-Quadruplex (TTAGGG).**



Fonte: IVANCICH M, SCHRANK Z, WOJDYLA L, LEVISKAS B, KUCKOVIC A, SANJALI A, PURI N. Treating Cancer by Targeting Telomeres and Telomerase. *Antioxidants*. Vol. 6, n.1. p.15. 2017. Adaptado.

A enzima telomerase, que é uma transcriptase reversa responsável por executar a manutenção do comprimento dos telômeros, adiciona as repetições da sequência  $(TTAGGG)_n$  nas terminações dos telômeros. Essa enzima é formada por subunidades, hTERT, responsável pela catálise das reações de adição de repetições aos telômeros, e hTERC, uma subunidade de RNA que atua como modelo das repetições. Geralmente a telomerase não está expressa em células somáticas adultas, com muito baixa ou nenhuma atividade enzimática, o que permite que após um certo número de divisões, os telômeros se encurtem e as células entrem em senescência e/ou apoptose, como mencionado no parágrafo anterior. Quando volta a ser expressa, a telomerase permite o alongamento dos telômeros, como em células tumorais positivas para telomerase. A telomerase é anormalmente expressa em aproximadamente 85% dos tipos de cânceres, sendo considerada um evento tardio da transformação de células malignas, e estando altamente expressa em tumores com estadiamento mais avançado e em metástases (IVANCICH et al., 2017; LABERTHONNIÈRE; MAGDINIER; ROBIN, 2019; TRYBEK et al., 2020).

Além da sua atuação no alongamento dos telômeros, a telomerase pode executar outras funções, denominadas de funções não-canônicas, que podem estar relacionadas ao

processo de desenvolvimento de neoplasias e à elevada expressão de telomerase em cânceres, como participação na migração celular, promoção de crescimento celular e regulação gênica (CHUNG et al., 2019; PARKINSON; FITCHETT; CERESER, 2009; THOMPSON; WONG, 2020)

A expressão de telomerase pode ainda sofrer influências de SUV39H1, já que a metilação executada por ela atua também na modulação da transcrição da telomerase e auxilia na regulação do comprimento dos telômeros, podendo essas duas enzimas estarem relacionadas (GARCÍA-CAO et al., 2004).

Devido a suas características contrastantes em células somáticas e em células tumorais, além de suas funções não-canônicas, tanto os telômeros quanto a telomerase são potenciais alvos para terapias anticâncer e potenciais biomarcadores para o câncer.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Estima-se que os cânceres de boca e orofaringe são responsáveis por 5% de todos os novos casos de câncer no mundo (JIANG ET ALL., 2019). Mesmo com o vasto número de pesquisas que são desenvolvidas e publicadas todo ano sobre este assunto, o câncer de boca continua sendo um problema grave de saúde pública mundial, principalmente por muitos estudos não conseguirem ser aplicados de forma efetiva na prática clínica (PATEL et al., 2016). É importante que se descubram novos meios e estratégias de diagnóstico e tratamento aplicáveis ao manejo clínico do paciente com câncer de boca, pois ainda é uma doença diagnosticada tardiamente, o que implica em estágios avançados e um paciente já debilitado, dificultando uma melhor responsividade ao tratamento, muitas vezes invasivo, diminuindo sua efetividade e eficácia (OMS, 2020).

Enquanto há significativos avanços nas taxas de sobrevivência em cânceres como o câncer de colo de útero, câncer de mama e o câncer colorretal, o número de novos casos de câncer de boca continua aumentando, sem melhoras nas taxas de mortalidade, e com taxas de sobrevivência estagnadas, estando relacionadas à dificuldade de acesso a serviços de saúde e acesso a um diagnóstico precoce e acompanhamento profissional (OMS, 2018, 2020; WANG et al., 2016).

Entender e conhecer as vias moleculares que levam à carcinogênese e suas alterações após seu desenvolvimento abre oportunidades para possíveis novos alvos

terapêuticos e novas formas de diagnóstico, podendo contribuir para um melhor manejo da doença. É crescente o interesse nos métodos de diagnóstico moleculares pela possibilidade de se antecipar o desencadeamento da doença, já que as alterações moleculares ocorrem previamente às alterações histológicas, que costumam ser identificadas no tumor quando ele já é clinicamente visível para a coleta de material para biópsia (ANAND et al., 2018; BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, 2020).

A alteração na expressão de SUV39H1 já foi demonstrada em outros cânceres, como o adenocarcinoma de pulmão, carcinoma de células escamosas de esôfago e na doença crônica renal (WANG et al., 2018; ZHENG et al., 2018; ZHOU et al., 2019) e já foi usada como marcador proliferativo, com possível ligação com o prognóstico dessas doenças. Já se sabe também que a telomerase está alterada, apresentando níveis aumentados na maioria dos tipos de cânceres (IVANCICH et al., 2017) . Além disso, as duas enzimas podem possuir uma relação, já que foi relatado que na ausência de SUV39H1 a cromatina telomérica perde a sua característica de heterocromatina e a atividade de SUV39H1 pode ter influência na regulação do comprimento dos telômeros, por modular a transcrição gênica de hTERT pela sinalização realizada por metilação da região do promotor do gene de hTERT (GARCÍA-CAO et al., 2004; TRYBEK et al., 2020). Assim, este estudo busca melhorar o entendimento acerca do comportamento desses genes especificamente para a situação do câncer de boca, que ainda apresenta uma lacuna de entendimento nesta área, caracterizando o perfil de expressão do gene *SUV39H1* e do *hTERT*, além de uma possível associação entre eles, importantes mantenedores do material genético humano e sua possível associação com os dados clínicos destes pacientes, o que poderá trazer um maior entendimento do seu papel no desenvolvimento da carcinogênese e seu potencial para auxiliar no processo de diagnóstico ou prognóstico da doença.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Análise da expressão do gene *SUV39H1* e do gene *hTERT* da telomerase no contexto específico do câncer de boca e assim, juntamente com os dados das análises *in silico* feitas em bancos de dados de acesso público, fornecer evidências sobre o perfil molecular destes genes e sua provável atuação na carcinogênese da boca.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Análise do perfil de expressão do gene *SUV39H1* em amostras normais e tumorais, de pacientes diagnosticados com câncer de boca;
- b) Análise do perfil de expressão do gene *hTERT* (telomerase) em amostras normais e tumorais, de pacientes diagnosticados com câncer de boca;
- c) Análise *in silico* da expressão dos genes *SUV39H1* e *hTERT* em bancos de dados de acesso aberto;
- d) Análise comparativa dos dados obtidos, associando-os com os dados clínicos disponíveis nos prontuários dos pacientes.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. SUJEITOS**

As amostras cirúrgicas utilizadas neste estudo foram coletadas de pacientes do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), que concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, seguindo-se os padrões éticos e de acordo com a aprovação do Conselho de Ética e Pesquisa (CEP) local, sob o número de registro 9371/2003. Estas amostras, que foram avaliadas por exame histopatológico para serem classificadas como normais ou tumorais, integravam um banco de amostras do HCFMRP-USP, que por uma parceria foram cedidas para este estudo.

As amostras tumorais foram processadas em Ribeirão Preto e enviadas já como cDNA, enquanto as amostras normais foram enviadas para processamento em Brasília. Sendo assim, estas amostras normais podem ter sofrido degradação no transporte, e por serem amostras de margem tumoral, podem apresentar pouco conteúdo normal viável para análise. Por isso, as amostras normais, que inicialmente eram 42, foram reduzidas a 9, após diferentes análises de qualidade. As amostras tumorais utilizadas incluíram 42 amostras, não pareadas com as normais.

### **4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS, SÍNTESE DE cDNA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (qPCR)**



A análise da expressão gênica de *SUV39H1* e *hTERT* foi realizada usando-se a técnica já estabelecida de PCR quantitativa em tempo real, em que o material genético é amplificado usando-se a enzima polimerase em ciclos de temperaturas diferentes, onde o material genético se desnatura, as sondas se ligam a ele e então a enzima age, copiando a fita de material genético. A cada ciclo o material é aumentado pelo dobro, sendo feitos durante o ensaio, vários ciclos, repetidamente.

A preparação das amostras iniciou-se com a extração do RNA total, tanto das amostras tumorais como de suas margens normais, com o kit de extração AllPrep Universal Kit da empresa Qiagen (Germantown, Maryland, EUA). O RNA extraído foi então convertido em DNA complementar, usando-se a enzima transcriptase reversa e *primers* com calda poli T, componentes do kit Superscript II da empresa Invitrogen (Carlsbad, California, EUA).

As amostras foram analisadas em duplicata e cada poço da placa foi preenchido com uma diluição da amostra na proporção de 1:10. O experimento foi feito utilizando o equipamento StepOnePlus<sup>®</sup>, também da empresa Thermo Fisher (Foster City, Califórnia, EUA), que controla a variação de temperatura, correspondente aos ciclos da reação e interpreta a fluorescência liberada durante o seu decorrer. As sondas utilizadas foram *SUV39H1* (Hs00957892 m1), *β-actina* (Hs99999903\_m1) e *hTERT* (Hs00972656 m1) da Thermo Fisher (Foster City, Califórnia, EUA).

Ao final do processo, o ciclo de quantificação (*Cycle quantification, Cq*) é definido. A partir dele é calculada a quantificação relativa da expressão gênica das amostras, usando-se um gene de controle endógeno como normalizador e uma amostra normal como referência. Neste estudo foi usado o gene *β-actina* como gene endógeno e o cálculo matemático usado para a quantificação relativa foi o  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (PFAFFL, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

### 4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir da quantificação relativa da expressão gênica, obtida pelos ciclos de quantificação e cálculo matemático, foi realizada uma análise estatística, usando-se o teste para dados não paramétricos de Mann-Whitney, com o programa GraphPad Prism<sup>®</sup> versão 8, comparando-se o grupo de amostras normais com o grupo de amostras tumorais de boca.

Além disso, foi realizada uma análise estatística de correlação entre a expressão dos genes *SUV39H1* e *hTERT* pelo teste de Spearman. Também foi feito o Teste de Fischer, para avaliar frequências em categorias de variáveis qualitativas, para analisar a distribuição dos dados clínicos de acordo com a expressão dos genes nas amostras. Por último, foi analisada a expressão dos genes nas amostras tumorais de acordo com as características clínicas dos pacientes (gênero, idade, localização do tumor, estadiamento, metástase, recidiva e óbito) pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

#### 4.4. ANÁLISE *IN SILICO*

Para complementar os dados obtidos neste estudo, foi realizada uma análise com dados referentes aos genes *SUV39H1* e *hTERT* disponíveis em bases de dados de acesso aberto, que reúnem dados brutos de diferentes tipos de experimentos de alto rendimento, de estudos já realizados.

A busca nessas bases de dados ocorreu com os termos para os genes “*SUV39H1*” e “*TERT*”, especificamente para a espécie *Homo sapiens*, e “head and neck squamous cell carcinoma”. Foi feita a busca por informações sobre expressão gênica, dados clínicos como gênero, idade, localização do tumor, índices de mutações para os genes, sobrevivência, entre outras informações que poderiam ser relevantes para o estudo. Não foi possível fazer seleção da localização anatômica do câncer para filtrar e selecionar apenas as regiões da boca, para ficar mais semelhante ao sítio anatômico dos tumores das amostras usadas neste estudo.

**Tabela 1: Descrição das Bases de Dados utilizadas na pesquisa *in silico*.**

Bases de Dados	
Oncomine	<a href="https://oncomine.org">https://oncomine.org</a>
UALCAN	<a href="http://ualcan.path.uab.edu/">http://ualcan.path.uab.edu/</a>
The Cancer Genome Atlas (TCGA)	<a href="https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga">https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga</a>

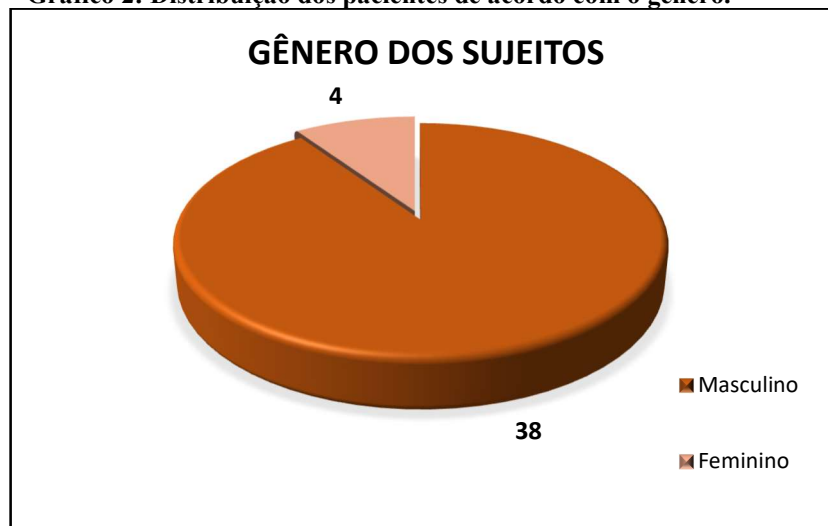
## 5. RESULTADOS

### 5.1. DADOS CLÍNICOS

Abaixo são apresentados os dados clínicos relativos aos pacientes com câncer de boca que participaram deste estudo, demonstrando as informações sobre gênero, idade,

localização anatômica, estadiamento dos tumores e dados relacionados à ocorrência ou não de recidiva, metástase e óbito. De acordo com os dados clínicos, há a predominância do gênero masculino, correspondendo a 90% das amostras e com a maioria dos sujeitos na faixa dos 36 aos 60 anos de idade. Já no quesito localização anatômica, a maioria dos tumores estava localizada no assoalho da boca em 42% das amostras e na língua em 44% das amostras. A maior parte das amostras se encontrava nas fases de estadiamento T2 e T4. Ainda, a maioria dos sujeitos apresentou recidiva do tumor e, até o último momento de acompanhamento realizado, a maioria não havia ido a óbito. É importante ressaltar que há dados faltantes sobre estadiamento, recidiva e óbito para muitos pacientes, o que interfere nos resultados destas análises realizadas.

**Gráfico 2: Distribuição dos pacientes de acordo com o gênero.**



**Gráfico 3: Distribuição dos pacientes de acordo com as faixas etárias.**

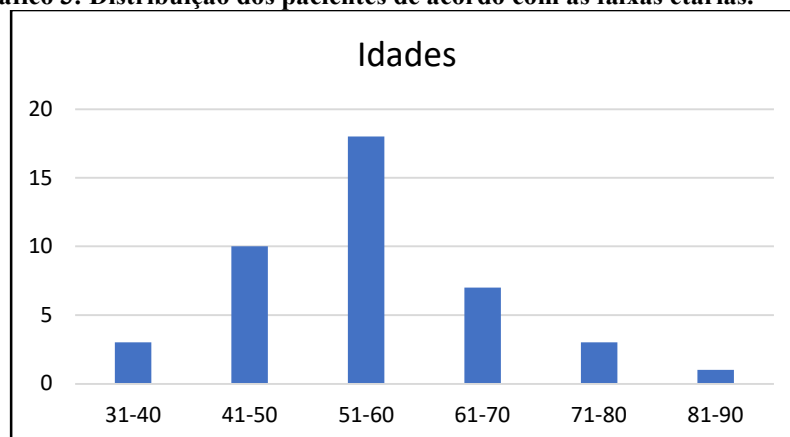


Gráfico 4: Distribuição dos pacientes de acordo com a localização anatômica dos tumores.



Gráfico 5: Distribuição dos pacientes de acordo com o estadiamento dos tumores.



Gráfico 6: Distribuição dos pacientes de acordo com a ocorrência de recidiva dos tumores.

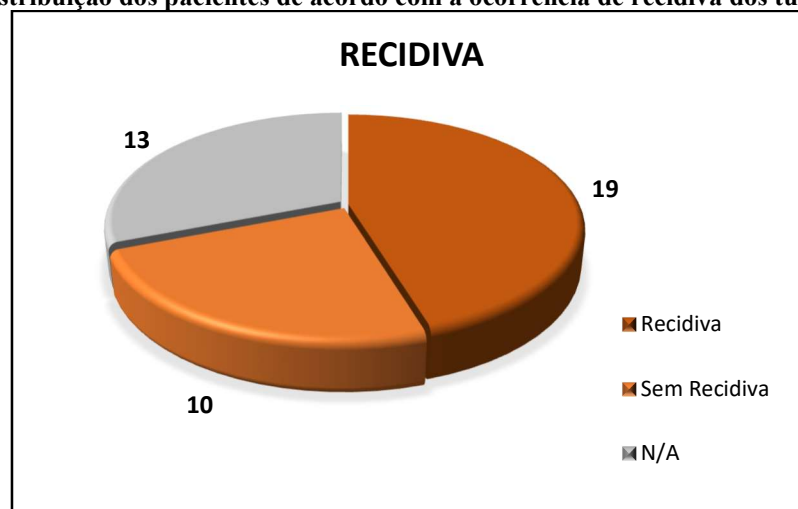
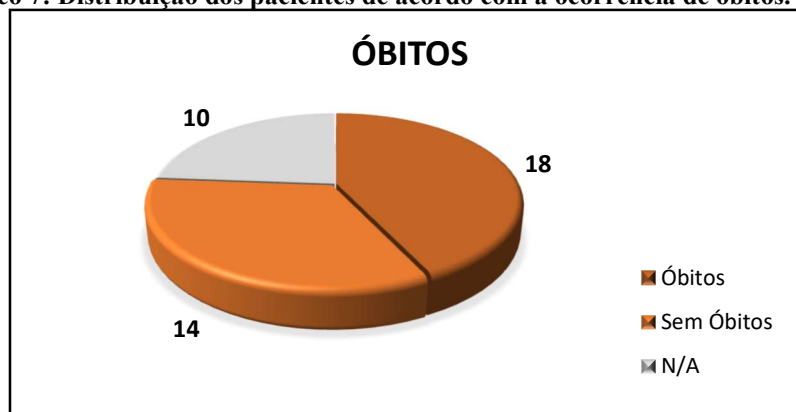


Gráfico 7: Distribuição dos pacientes de acordo com a ocorrência de óbitos.

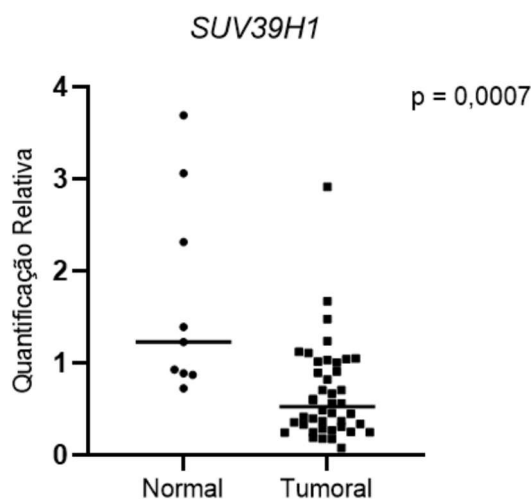


## 5.2. qPCR

### 5.2.1. *SUV39H1*

Observando-se os resultados da análise estatística que foi realizada a partir dos dados da quantificação relativa da expressão gênica é possível dizer que, houve uma maior expressão de *SUV39H1* em amostras normais quando comparada com a expressão em amostras tumorais, com significância estatística ( $p=0,0007$ ), como pode-se perceber pela mediana obtida de cada grupo (mediana da quantificação relativa (QR) das amostras normais  $QR(N)= 1,227$  e das amostras tumorais  $QR(T)= 0,5250$ ) e como é demonstrado visualmente no Gráfico 8.

Gráfico 8: Expressão de *SUV39H1* em amostras normais e tumorais pelo cálculo matemático  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

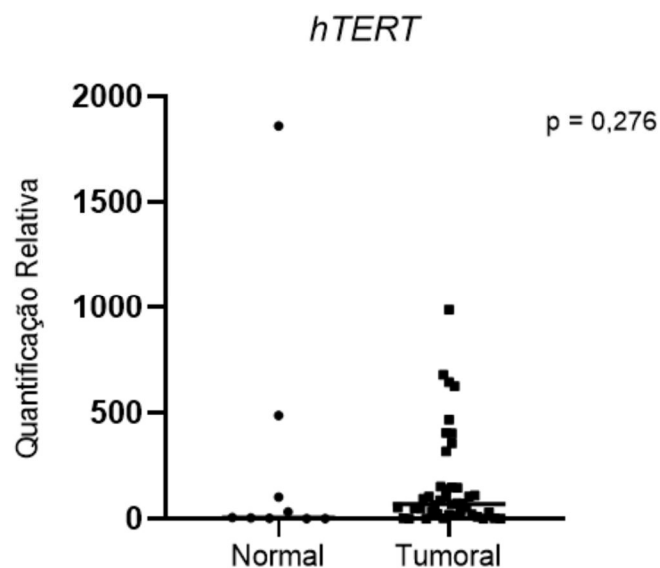


Medianas da Expressão	
Normal	Tumoral
1,227	0,5250

### 5.2.2. *hTERT* (TELOMERASE)

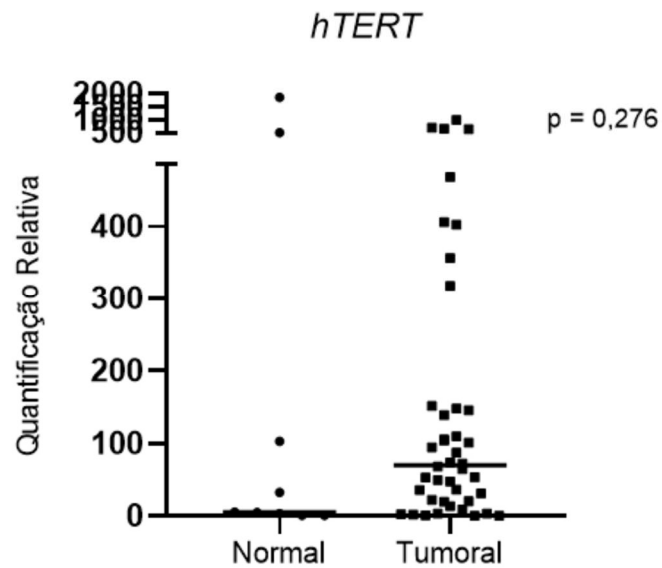
Observando-se os resultados da análise estatística que foi realizada a partir da quantificação relativa da expressão do gene *hTERT*, foi possível perceber uma expressão gênica maior nas amostras tumorais, quando comparada com a expressão gênica nas amostras normais, sem significância estatística ( $p=0,276$ ), como é possível perceber pela diferença entre as medianas das amostras normais e tumorais (mediana da quantificação relativa (QR) das amostras normais  $QR(N)= 5,179$  e das amostras tumorais  $QR(T)= 69,76$ ) e como é demonstrado visualmente no Gráfico 9. A diferença entre as medianas fica ainda mais clara quando observada no Gráfico 10, um gráfico seccionado que separa os outliers e permite uma melhor visualização dos dados.

Gráfico 9: Expressão do gene *hTERT* em amostras normais e tumorais pelo cálculo matemático  $2^{-\Delta\Delta Cq}$



Mediana da Expressão	
Normal	Tumoral
5,179	69,76

Gráfico 10 - Expressão do gene *hTERT* em amostras normais e tumorais em gráfico seccionado.

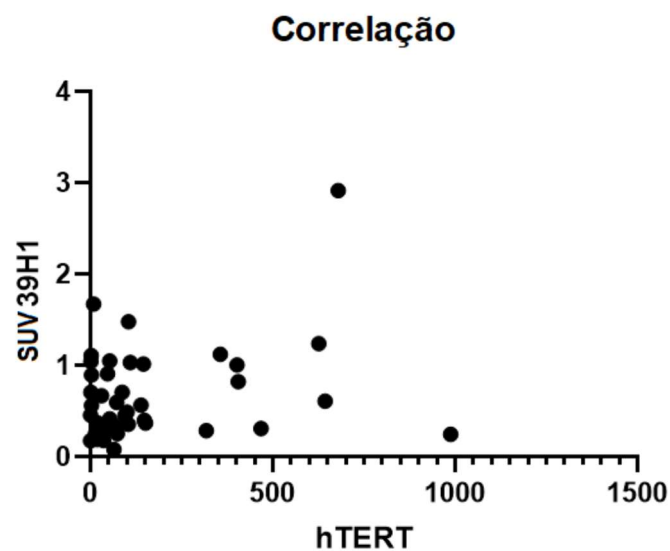


### 5.3. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

#### 5.3.1. CORRELAÇÃO ENTRE *hTERT* x *SUV39H1*

Com o teste de Spearman foi feita a análise para verificar se as expressões dos genes *hTERT* e *SUV39H1* possuem uma correlação. O coeficiente r foi de 0,151, sendo uma correlação positiva fraca, e com valor de p não estatisticamente significativo de 0,3399. O Gráfico 11, relativo à correlação, é demonstrado abaixo.

Gráfico 11: Correlação de Spearman entre a expressão dos genes *hTERT* e *SUV39H1*.



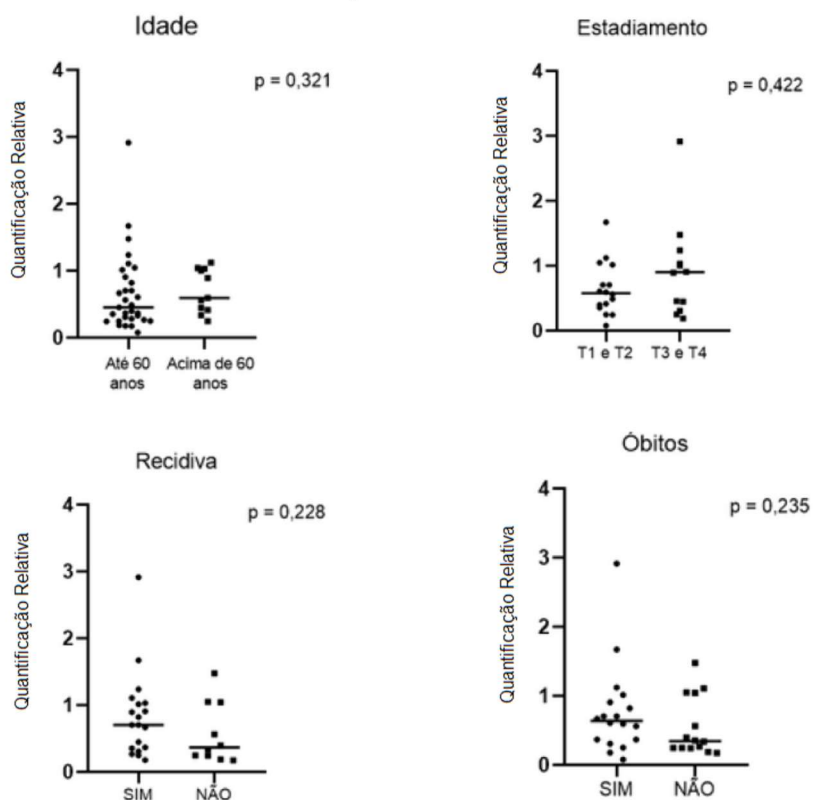
## 5.4. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES E OS DADOS CLÍNICOS

Para testar se havia diferença de expressão dos genes *SUV39H1* ou *hTERT* nas amostras tumorais, de acordo com as características clínicas dos pacientes, foi feita uma análise usando-se o teste de Mann-Whitney, estratificando-se cada dado clínico em dois grupos. Esta estratificação de cada característica clínica foi feita baseada em dados disponíveis na literatura. Não foi encontrada significância estatística nestas análises.

### 5.4.1. EXPRESSÃO DO GENE *SUV39H1* x DADOS CLÍNICOS

Na análise de associação de cada característica clínica estratificada em dois grupos e a expressão do gene *SUV39H1*, não houve resultado estatisticamente significativo (Figura 5).

Figura 5 - Gráficos da análise de associação entre a expressão de *SUV39H1* e os dados clínicos dos pacientes.

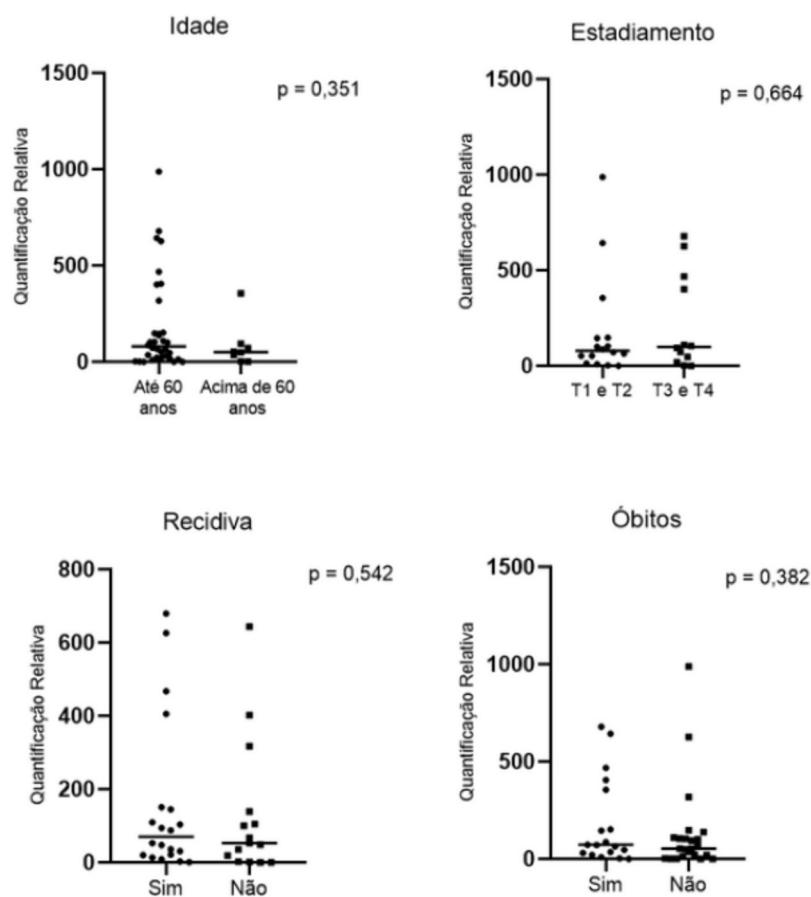




## 5.4.2. EXPRESSÃO DO GENE *hTERT* x DADOS CLÍNICOS

Na análise de associação de cada característica clínica estratificada em dois grupos e a expressão de *hTERT*, não houve resultado estatisticamente significativo (Figura 6).

Figura 6 - Gráficos da análise de associação entre a expressão do gene *hTERT* e os dados clínicos dos pacientes.



## 5.5. ANÁLISE DE CONTINGÊNCIA

Na análise de contingência, feita pelo Teste de Fischer, foram criadas tabelas 2x2 de acordo com a distribuição da expressão gênica e da categoria do dado clínico e então avaliadas as suas frequências. A estratificação da expressão gênica em alta e baixa foi feita considerando-se a mediana de expressão das amostras tumorais como ponto de corte. O resultado está disposto na Tabela 2. Não houve resultado com significância estatística para esta análise.

**Tabela 2: Análise de Contingência entre a expressão de *SUV39H1* e *hTERT* e os dados clínicos.**

Características	<i>SUV39H1</i>			<i>hTERT</i>		
	Baixa N (%)	Alta N (%)	P	Baixa N (%)	Alta N (%)	P
<b>Idade</b>						
Até 60	17 (54.84)	14 (45.16)	>0,9999	16 (47.06)	18 (52.94)	0,7092
Acima de 60	4 (36.36)	7 (63.64)		3 (37.50)	5 (62.5)	
<b>Gênero</b>						
Masculino	20 (52.63)	18 (47.37)	0,6060	17 (44.74)	21 (55.26)	>0,9999
Feminino	1 (25.0)	3 (75.0)		2 (50.0)	2 (50.0)	
<b>Estadiamento</b>						
T1 e T2	7 (43.75)	9 (56.25)	>0,9999	7 (43.75)	9 (56.25)	0,7047
T3 e T4	5 (41.67)	7 (58.33)		4 (33.33)	8 (43.75)	
<b>Recidiva</b>						
Sim	6 (37.5)	10 (62.5)	>0,9999	9 (56.25)	7 (43.75)	0,2108
Não	4 (44.44)	5 (55.56)		2 (25.0)	6 (75.0)	
<b>Óbitos</b>						
Sim	7 (41.18)	14 (41.18)	0,3375	8 (44.44)	10 (55.56)	>0,9999
Não	10 (60.87)	9 (39.13)		11 (47.83)	12 (52.17)	

## 5.6. ANÁLISE *IN SILICO*

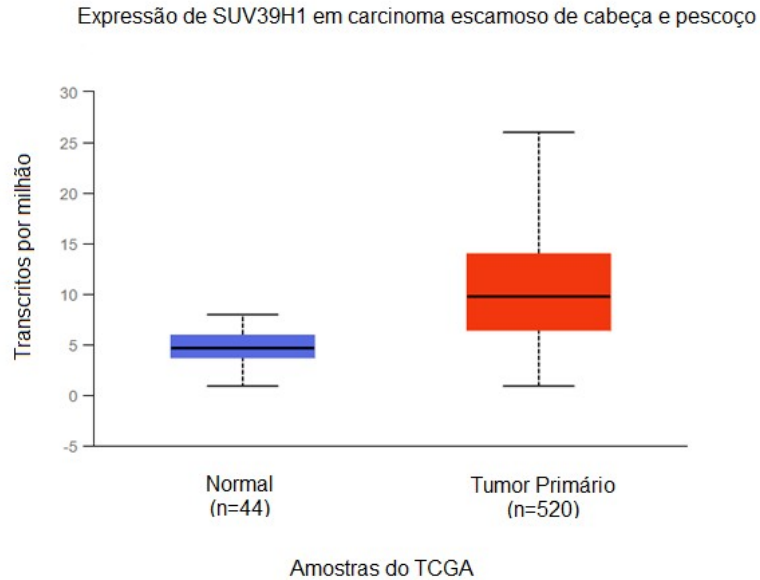
### 5.6.1. UALCAN

#### 5.6.1.1 *SUV39H1*

De acordo com o UALCAN, que fornece dados brutos do sequenciamento do transcriptoma de cânceres e tecidos normais, a expressão do gene *SUV39H1* é maior nas amostras tumorais de cabeça e pescoço do que nas amostras normais, sendo a mediana da expressão de *SUV39H1* em amostras tumorais de 9,764 TPM e a mediana em amostras normais de 4,726 TPM, com significância estatística ( $p < 0,05$ ). Esse banco de dados utiliza as amostras do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), sendo 520 amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e 44 amostras normais. A diferença

entre as medianas de expressão gênica foi de 5,038 TPM. A unidade TPM mede quantas moléculas tinham para cada milhão de moléculas de RNA no sequenciamento.

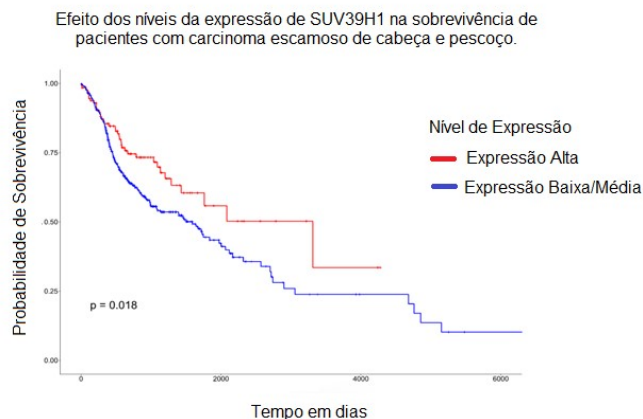
**Gráfico 12: Expressão do gene *SUV39H1* em amostras normais e tumorais de acordo com o banco de dados UALCAN. Adaptado.**



Expressão	
Normal	Tumoral
4,726	9,764

Ainda de acordo com este banco de dados, os pacientes que apresentam uma alta expressão do gene *SUV39H1* possuem uma menor sobrevida quando comparados com os pacientes que apresentam média ou baixa expressão do gene *SUV39H1*, com significância de  $p < 0,05$ .

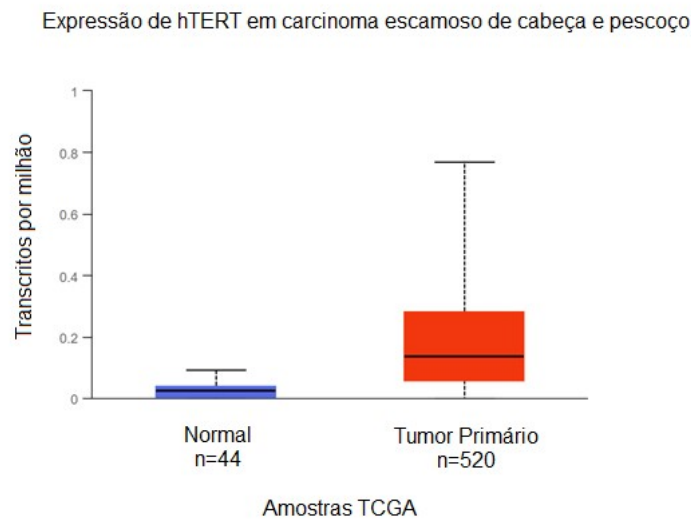
**Gráfico 13: Curva de sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com os níveis de expressão do gene *SUV39H1*. Adaptado.**



### 5.6.1.2. *hTERT*

De acordo com a busca realizada no banco de dados UALCAN, a expressão do gene *hTERT* é maior nas amostras tumorais do que nas amostras normais, sendo a mediana da expressão do gene *hTERT* em amostras tumorais de 0,091 TPM e a mediana em amostras normais de 0,008 TPM. Mesmo a expressão do gene nas amostras tumorais sendo maior, o banco de dados ressalta que são expressões baixas, abaixo de 0,2 TPM.

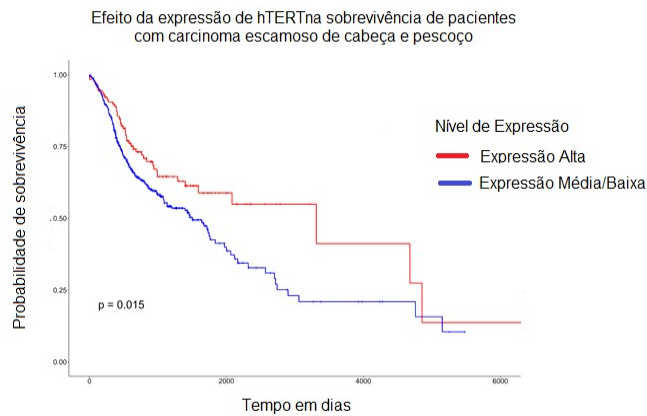
**Gráfico 14: Expressão do gene *hTERT* em amostras normais e tumorais de acordo com o banco de dados UALCAN. Adaptado**



Expressão	
Normal	Tumoral
0,008	0,091

Ainda de acordo com esse banco de dados, os pacientes que apresentam uma alta expressão do gene *hTERT* possuem uma maior sobrevida quando comparados com os pacientes que apresentam média ou baixa expressão do gene *hTERT*.

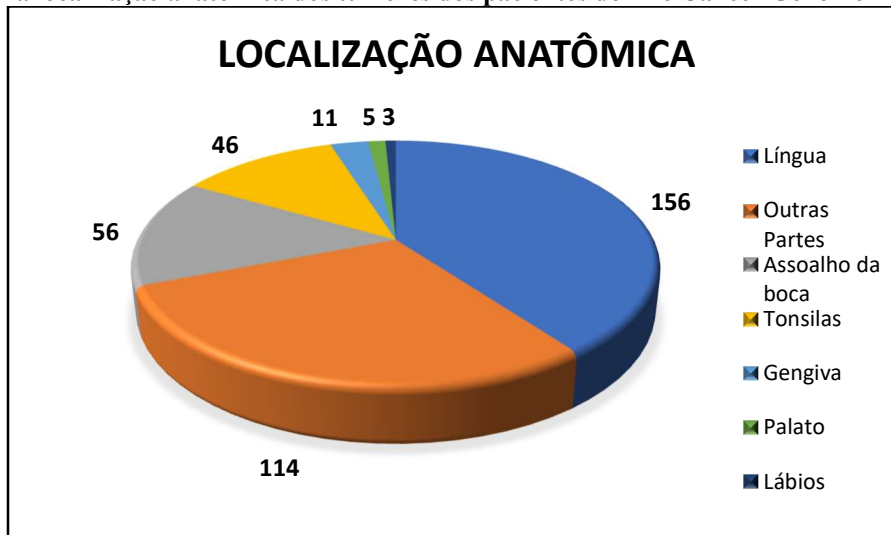
**Gráfico 15: Curva de sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com os níveis de expressão do gene *hTERT*. Adaptado.**



### 5.6.2. The Cancer Genome Atlas (TCGA)

No The Cancer Genome Atlas (TCGA), projeto sobre a genômica de vários cânceres, além de haver dados de genômica, transcriptômica e proteômica, é possível também extrair dados clínicos referentes aos pacientes das amostras, como mostrado abaixo em gráficos.

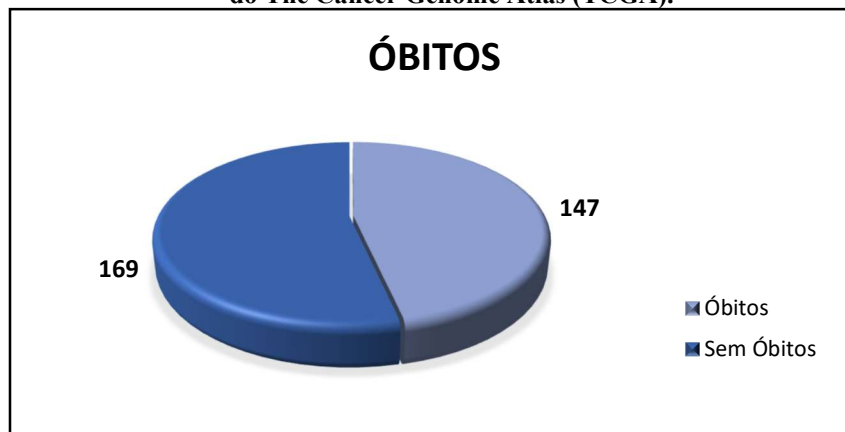
**Gráfico 16: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com a localização anatômica dos tumores dos pacientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA).**



**Gráfico 17: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o gênero dos pacientes do The Cancer Genome Atlas (TCGA).**



**Gráfico 18: Distribuição dos pacientes de acordo com a ocorrência de óbitos, segundo os dados clínicos do The Cancer Genome Atlas (TCGA).**

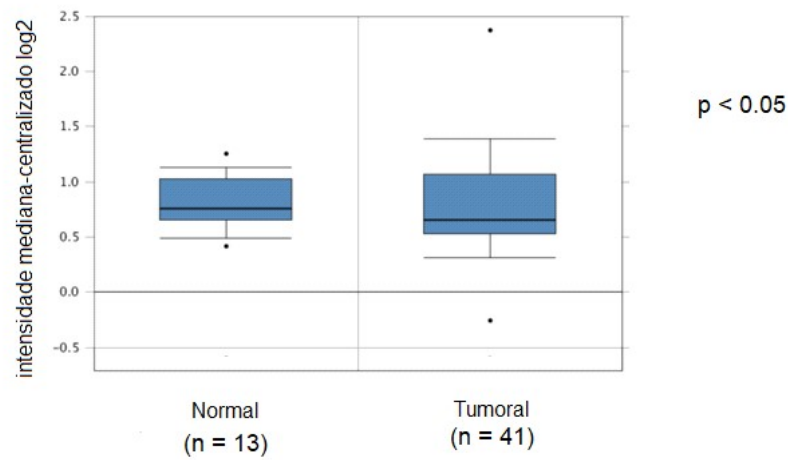


### 5.6.3. Oncomine

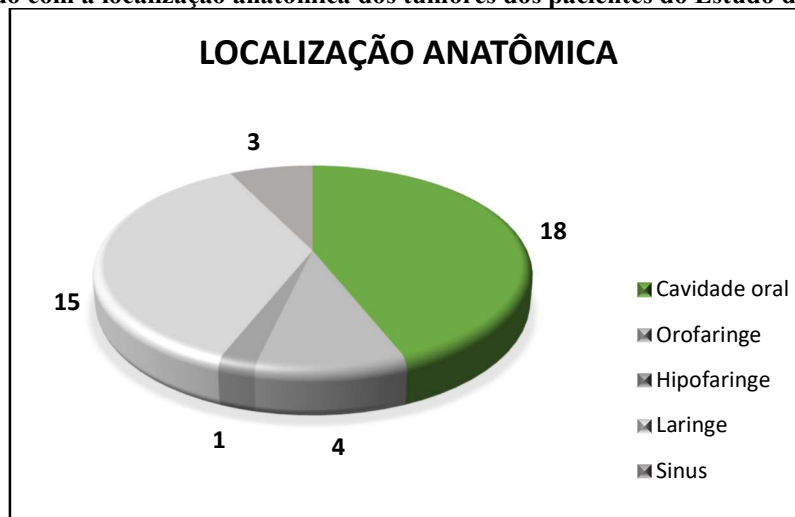
O Oncomine é uma base de dados que permite a busca de dados de expressão gênica de experimentos de microarranjos de DNA, realizados por vários estudos. De acordo com dados disponibilizados por um estudo nesta base de dados, a expressão de *SUV39H1* em amostras tumorais de cabeça e pescoço foi menor do que a expressão em amostras normais de pacientes saudáveis. Foi possível, ainda, obter os dados clínicos referentes aos pacientes desse estudo. Foram usadas 13 amostras de mucosa normal de pacientes saudáveis e 41 amostras de carcinoma de células escamosas de câncer de cabeça e pescoço.

**Gráfico 19: Expressão do gene *SUV39H1* em amostras normais e tumorais em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o banco de dados Oncomine. Adaptado.**

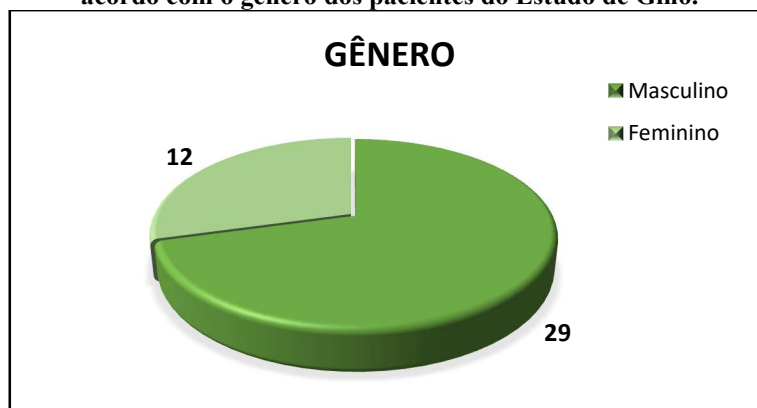
Estudo de Gino - Expressão de *SUV39H1* em carcinoma escamoso de cabeça e pescoço



**Gráfico 20: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com a localização anatômica dos tumores dos pacientes do Estudo de Gino.**



**Gráfico 21: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o gênero dos pacientes do Estudo de Gino.**



**Gráfico 22: Distribuição das amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de acordo com o estadiamento dos tumores dos pacientes do Estudo de Gino.**



## 6. DISCUSSÃO

No estudo apresentado, foi identificada uma baixa expressão do gene da metiltransferase *SUV39H1* em nossas amostras de carcinoma de células escamosas de boca quando comparadas com a expressão gênica de amostras de margem normal. Considerando-se as funções que essa enzima desempenha, principalmente sua atuação no reparo do DNA, manutenção do telômero e como supressor de tumor (JOHNSON et al., 2017; LU et al., 2019; ZHANG et al., 2019), seria compreensível a presença de uma baixa expressão nas amostras tumorais, pois com os baixos níveis da enzima haveria uma atenuação destas funções descritas, o que favoreceria o ambiente para a sobrevivência e multiplicação das células tumorais.

Esse resultado é consoante com resultado encontrado na análise em bancos de dados do Estudo de Matthew A. Ginos, que analisou o transcriptoma de amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço pela técnica de microarranjo de cDNA. Este estudo realizou uma análise abrangente da expressão de centenas de genes, visando identificar aqueles que teriam uma expressão diferencial, nos casos de câncer com invasão e metástase. Esse grande número de dados brutos foi disponibilizado para análise de bioinformática em plataformas de acesso aberto, onde a análise *in silico* da expressão de *SUV39H1* foi realizada (GINOS et al., 2004). Este estudo apresenta semelhanças com o nosso, como o número de amostras utilizadas, tanto normais como tumorais, a região anatômica das amostras (mesmo com presença de amostras da laringe e faringe, a maior parte é proveniente da região da boca), a maioria pertencente ao gênero masculino e por



fim o perfil de expressão encontrado, que é semelhante ao achado nesse estudo, mostrando a expressão de *SUV39H1* menor em tumores quando comparada com amostras normais.

Entretanto, quando procuramos informações acerca da expressão do gene *SUV39H1* em outro banco de dados, como o UALCAN, que usa os dados disponíveis das amostras do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), encontramos como resultado que a expressão gênica em amostras tumorais é maior do que em amostras normais, divergindo, portanto, do resultado encontrado neste estudo.

A divergência persiste quando analisamos outros estudos sobre outros cânceres. Em carcinoma de cólon, por exemplo, *SUV39H1* apresentou alto nível de expressão gênica nas células tumorais (LU et al., 2019), participando do controle da progressão do ciclo celular desse tumor (LU et al., 2020). Em células dos vasos sanguíneos, principalmente na camada muscular chamada neointima, a elevada expressão de *SUV39H1* demonstrou influenciar na hiperplasia da região, após a ocorrência de lesão vascular (ZHANG et al., 2019). Em estudo que realizou o *knockdown* de *SUV39H1*, com uma redução nos níveis de H3K9me3 em histonas, foi observada uma maior migração celular em células de tumor de colo do útero quando comparadas com células que possuíam maiores níveis da trimetilação realizada por *SUV39H1* na lisina 9 (RODRIGUES et al., 2019). *SUV39H1* apresenta alta expressão também em câncer de estômago, câncer de fígado e câncer colorretal (SAHA; MUNTEAN, 2021). Já em rhabdomiossarcoma, *SUV39H1* apresenta uma baixa expressão (YANG et al., 2010).

Essa heterogeneidade nos resultados de expressão do gene *SUV39H1* talvez possa ser explicada por alguns fatores, como a influência de alterações genéticas e epigenéticas da população estudada, já que tanto este estudo quanto o de Ginos usaram amostras de populações bem estritas e regionalizadas, enquanto o projeto TCGA, além de possuir um número bem mais expressivo de amostras, não fica restrito a uma única localidade. Os tipos e locais das alterações gênicas encontradas em diferentes cânceres podem influenciar de diferentes maneiras esta enzima, sendo uma das possíveis explicações para a heterogeneidade na expressão de *SUV39H1*. Por exemplo, enquanto reprime a transformação maligna em células cancerígenas no câncer de mama, promove proliferação celular e metástase no carcinoma colorretal (SAHA; MUNTEAN, 2021). Assim, *SUV39H1* aparenta ter diferentes padrões a depender da localização anatômica, tipo de tumor e outras especificidades, como quais vias de sinalização são ativadas ou não,

demonstrando a relevância de se caracterizar sua função especificamente para o câncer de boca. Outro ponto a ser considerado é que cada estudo usa uma técnica diferente de análise. Enquanto nesse estudo foi usada uma análise por PCR quantitativa em tempo real, que é um método mais direto e considerado padrão ouro para análises de expressão gênica, o estudo de Ginos fez uma análise de microarranjo e o TCGA, de sequenciamento de RNA, técnicas de alto rendimento e menor acurácia para quantificação gênica. Ainda, nossas amostras possuem um perfil diferenciado, apresentando um grupo amostral mais jovem. Além disso, há a diferença da localização dos tumores, já que apenas esse estudo mostra um resultado que é específico para amostras provenientes somente da região anatômica da boca. São necessários mais estudos para que se possa dirimir essa questão.

Há diferentes padrões de distribuição do câncer de boca entre as várias regiões do globo, já que o organismo sofre influência das vivências, do meio ambiente e de hábitos, que são diferentes em cada cultura e população, diferenciando os fatores de risco que mais influenciam na chance de cada população vir a ter uma alteração que possa desencadear um processo de carcinogênese. Um exemplo é a maior incidência do câncer de boca em populações asiáticas, que aumentou nos últimos 30 anos, passando a uma taxa de 4,9 a cada 100.000 habitantes. Nessa população há a influência de hábitos regionais como o consumo de várias formas de tabaco, do *betel-quit* e castanha areca. Essas demonstrações ressaltam a importância de se estudar populações específicas, para conseguir entender melhor a relação entre as alterações genéticas e epigenéticas na carcinogênese da boca (CONCHING; THAYER, 2019; SHRESTHA et al., 2020; XIE; SHANG, 2022).

Ainda de acordo com resultados encontrados na análise *in silico* realizada, pacientes que apresentaram maior expressão do gene *SUV39H1* teriam uma menor sobrevida, tendo um efeito negativo no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Esse resultado converge com a análise realizada em um estudo, onde foi investigado se a alta expressão de *SUV39H1* tinha correlação com a sobrevida dos pacientes, e, na maioria dos cânceres, a alta expressão ficou relacionada com uma menor sobrevida (RODRIGUES et al., 2019).

Já em relação ao gene da parte catalítica da telomerase, *hTERT*, este estudo identificou uma tendência de aumento na expressão deste gene nas amostras tumorais quando comparada com as amostras de margem normal, sendo relevante destacar a expressiva diferença encontrada entre as medianas da expressão das amostras tumorais e

das amostras normais. Na análise *in silico* realizada neste estudo, observou-se também uma maior expressão do gene *hTERT* em amostras tumorais quando comparada com amostras normais. Esses resultados vão de encontro aos resultados descritos na literatura, que relatam haver baixa ou quase nenhuma expressão de telomerase em células normais, enquanto em células tumorais a telomerase se encontra elevada em muitos casos. Isso ocorre porque, em células normais, com a progressão da vida celular, há o encurtamento dos telômeros. Quando o encurtamento chega ao seu limite, com risco de causar danos ao material genético, a célula para de se replicar e se prepara para a apoptose ou senescência, impedindo a proliferação anormal da célula, evento comum na carcinogênese. Assim, a telomerase presente na célula permite que o alongamento dos telômeros sempre ocorra, levando as células a uma proliferação ilimitada, a chamada imortalização celular, explicando porque no câncer a expressão aumentada de telomerase é vantajosa para o tumor. Ainda, como mencionado na introdução, 85% dos cânceres apresentam a telomerase aumentada, mas não são todos, sendo esse resultado importante para caracterizar que no câncer de boca ela está aumentada (MIZUKOSHI; KANEKO, 2019; XI; CECH, 2014).

Por estar aumentada, e possuir as funções não-canônicas como aumentar a proliferação celular, a telomerase é um potencial alvo farmacológico para terapia anti-câncer, como inibidores da telomerase, com a possibilidade de serem mais seletivos que os outros tratamentos tradicionais (BEREI et al., 2020; CHEN; ZHANG, 2016).

De acordo também com os resultados encontrados na análise *in silico* realizada, pacientes com câncer de cabeça e pescoço que apresentaram maior expressão gênica de *telomerase (hTERT)* teriam uma maior sobrevida, indicando esta alta expressão como tendo um efeito positivo no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Esse resultado encontrado é, em um primeiro momento, contraditório, já que a alta atividade de telomerase está associada ao câncer. Entretanto, já foi visto em um estudo de câncer de bexiga que mutações no promotor do gene TERT, especificamente o polimorfismo rs2853669, podem influenciar a sobrevida de pacientes com câncer, podendo a maior sobrevida não estar associada diretamente com a presença da enzima, mas com fatores que não foram analisados nesse trabalho, como a atividade da enzima em si, ou fatores como mutações. Em outro estudo, foi relatada a possível associação do polimorfismo <sup>-1327</sup>T/C *hTERT* da telomerase com a sobrevida de uma população, sendo

que essa relação sofre diferenças de acordo com fatores como gênero e idade, e a relação desse polimorfismo com a mortalidade não foi influenciada pela presença de doenças como o câncer. Esse conjunto de fatores e suas possíveis associações podem ser uma das explicações para o resultado inicialmente controverso na sobrevida de pacientes que apresentam alta expressão da telomerase no câncer de cabeça e pescoço, mas é uma temática ainda em discussão (KALPOUZOS et al., 2016; RACHAKONDA et al., 2013).

É importante ressaltar ainda que, algumas amostras de margem normal deste estudo apresentaram certa tendência de expressão de telomerase (hTERT), quando o resultado esperado seria não haver expressão gênica (IVANCICH et al., 2017). Esse acontecimento poderia ser explicado pelo fenômeno de cancerização de campo, onde alterações moleculares de transformação maligna ocorrem em toda uma área que foi exposta aos mesmos fatores carcinogênicos, mesmo que a mucosa apresente uma aparência normal, sem qualquer mudança de cunho histológico, tratando-se de um processo molecular que demoraria para ser visualizada microscopicamente. Ainda, há a possibilidade de podermos relacionar esse acontecimento com a presença de um infiltrado de linfócitos na amostra normal, que podem estar presentes como resposta do sistema imune ao câncer, e quando estão na sua forma ativada possuem maior atividade da enzima telomerase (BRAAKHUIS et al., 2003; DOTTO, 2014; NAKASHIMA et al., 2017; PATRICK; WENG, 2019; SLAUGHTER; SOUTHWICK; SMEJKAL, 1953).

Nossas amostras de margem normal, para que pudessem ser incluídas no estudo como amostras normais, foram analisadas por um patologista. Entretanto, por serem células da margem tumoral, poderiam já ter iniciado um processo molecular de transformação cancerosa, como explicado anteriormente, possivelmente justificando esse comportamento não esperado de algumas amostras de margem normal para a expressão de *hTERT*. Esse achado enfatiza a importância dos estudos moleculares em células cancerosas, pois é a chance de identificar mudanças significativas quando a célula ainda se apresentaria com morfologia normal em uma biópsia tecidual, tendo-se a chance de intervir de forma mais precoce e possivelmente menos danosa para o paciente.

Mesmo estando descrita na literatura uma relação entre as enzimas SUV39H1 e a telomerase (hTERT), já que SUV39H1 atua nas áreas mais condensadas do cromossomo, que são os telômeros e centrômeros, regulando o estado de condensação do material genético e sua estabilidade, tendo sido relatado que na ausência de SUV39H1 a cromatina

telomérica perde a sua característica de heterocromatina e ainda, que a atividade de *SUV39H1* também influencia na regulação do comprimento do telômero, por modular a transcrição gênica de *hTERT* (GARCÍA-CAO et al., 2004; JOHNSON et al., 2017; TRYBEK et al., 2020), na análise realizada entre as expressões destes genes nas amostras tumorais ficou demonstrada relação sem significância estatística, não tendo aparentemente uma influência de *SUV39H1* sobre *hTERT* nas nossas amostras de câncer de boca.

Os dados clínicos dos pacientes revelaram que das 42 amostras tumorais, 38 correspondiam ao gênero masculino, sendo 90% do total de casos. No estudo de Ginos (GINOS et al., 2004). e de acordo com os dados clínicos do TCGA, também foi predominante a ocorrência do câncer de boca e de cabeça e pescoço no gênero masculino, com 71% e 70% respectivamente, corroborando com os dados clínicos dos pacientes deste estudo.

As idades dos pacientes desse estudo estavam entre 36 e 83 anos, demonstrando uma grande amplitude na faixa etária, mas a maioria das amostras se concentraram na faixa de 36 a 60 anos, abaixo da habitualmente descrita como prevalente na literatura para pacientes com câncer de boca. Quanto ao estadiamento, grande parte das amostras que possuíam essa informação disponível se encontravam nos estágios iniciais T1 e T2, enquanto, para o Estudo de Ginos (GINOS et al., 2004), a maioria dos casos estava nos estágios mais avançados T3 e T4, mostrando que esta parcela dos pacientes do nosso estudo, possivelmente, foi diagnosticada em um estágio mais precoce. A princípio, este perfil, ressaltando que há bastante dados faltantes de pacientes, não teve influência positiva nas taxas de recidiva e óbito.

Quanto aos óbitos ocorridos, 14 não tiveram óbito até o último momento de acompanhamento dos pacientes e 18 vieram a óbito. Em relação a recidiva, 19 pacientes tiveram o retorno do carcinoma de células escamosas, enquanto 10 não tiveram recidiva após a cirurgia e 13 pacientes não possuíam informação disponível sobre esse dado. Já em relação à metástase, em 33 pacientes não foi possível avaliar sua presença, tendo apenas 4 pacientes com dado conclusivo da ausência de metástase (M0) e 5 com a presença de metástase (M1).

Em relação à localização anatômica dos tumores, estas foram predominantes nas regiões da língua, em 44% das amostras, e assoalho da boca, em 42% das amostras. O

mesmo ocorre nos dados clínicos obtidos do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), quando avaliada apenas a região de boca, excluindo-se laringe e faringe, com 39,9% das amostras localizadas na língua e 14,32% das amostras localizadas no assoalho da boca. Já no Estudo de Ginos (GINOS et al., 2004), não há a separação da localização em sub-regiões da boca, mas a maioria das amostras são de cavidade oral, correspondendo a 44% das amostras usadas no estudo. É possível perceber, de modo geral, que os casos se dão em sua maioria na macrorregião da boca, e quando fragmentamos essa região em sub-regiões, a língua e o assoalho da boca são os locais de maior incidência do carcinoma de células escamosas de boca.

Por fim, há dificuldades quando se trabalha com dados clínicos, pela dificuldade de continuidade no acompanhamento dos pacientes para coleta de dados, já que, principalmente no serviço público, muitos descontinuam o tratamento ou há a perda do contato com o paciente e assim, não é possível coletar os dados ao longo do processo do acompanhamento. Falta ainda uma padronização para o processo de coleta de dados entre os estudos na área, já que cada estudo apresenta apenas alguns dados, sendo difícil achar uma homogeneidade quanto às categorias, e principalmente, é difícil achar informações relativas ao consumo de etanol e tabaco. Os dados clínicos são importantes para pesquisas como essa pois podem ajudar a caracterizar sinais de alerta para os profissionais e agentes de saúde e também contribuir para o maior entendimento da doença.

É importante também salientar que essa pesquisa foi desenvolvida durante o período da pandemia do SARS-CoV-2, o que trouxe maiores desafios para sua execução e finalização.

## **7. CONCLUSÃO**

Este estudo é o primeiro a caracterizar a expressão do gene *SUV39H1* no câncer de boca, tendo sido encontrado uma baixa expressão quando comparada com a expressão em tecidos normais. Este é um resultado de suma importância, principalmente devido a heterogeneidade que a expressão do gene *SUV39H1* apresenta em diversos cânceres. São necessários ainda estudos complementares sobre o comportamento deste gene, com um maior número amostral, e estudos da enzima e do seu produto, a metilação de histonas, para que seja possível dizer de fato se *SUV39H1* pode ser usada como um marcador

molecular para o câncer de boca. Já para *hTERT*, foi possível determinar que ela possui uma tendência de aumento da expressão no câncer de boca, sem ter uma associação com *SUV39H1*. Ainda, os dados clínicos das amostras mostraram ser consistentes com aqueles presentes na literatura e aqueles achados na análise *in silico*, apontando para uma boa representatividade da nossa amostra e havendo a possibilidade de serem usados como sinais de alerta para a detecção do câncer de boca, como em casos de exames de rotina ou aparecimento de lesões na região da boca.

Como o panorama para o câncer de boca se encontra estagnado, sem novas estratégias de manejo desta doença, e por ser pelos biomarcadores moleculares que há a possibilidade de se identificar alterações celulares mais profundas e de maneira mais precoce, fatores que contribuem para uma maior efetividade na luta contra o câncer, mesmo que ainda não seja conclusivo, este estudo abre o caminho para que se tenha dados específicos, até então não disponíveis na literatura científica, sobre a expressão destes genes no câncer de boca, buscando a precocidade da identificação desta doença e melhores perspectivas para os pacientes.

Como disse Alan Watts em seu livro “A palavra agora indica que algo teve de vir antes” (ALAN WATTS, 2009), assim como para a ciência e a pesquisa evoluírem, tem-se de começar por algum ponto. Assim, esta pesquisa aqui descrita inicia o caminho para colaborar no progresso dos estudos sobre os genes *SUV39H1* e *hTERT* no câncer de boca.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAGOZ, M. et al. SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 16, p. 7931–7944, 18 set. 2015.

ALAN WATTS. O que é zen? Campinas: *Editora Verus*, 2009.

ANAND, A. et al. Yoga as an integrative approach for prevention and treatment of oral cancer. *International Journal of Yoga*, v. 11, n. 3, p. 177, 2018.

BANIEBRAHIMI, G.; MIR, F.; KHANMOHAMMADI, R. Cancer stem cells and oral cancer: Insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Cancer Cell International*. *BioMed Central Ltd.*, , 7 abr. 2020.

BENEVENTO, M. et al. The role of chromatin repressive marks in cognition and disease: A focus on the repressive complex GLP/G9a. *Neurobiology of Learning and Memory*. *Academic Press Inc.*, , 1 out. 2015.

- BEREI, J. et al. Potential Telomere-Related Pharmacological Targets. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 6, p. 458–484, 13 abr. 2020.
- BRAAKHUIS, B. J. M. et al. A Genetic Explanation of Slaughter's Concept of Field Cancerization: Evidence and Clinical Implications. *Cancer Research*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/63/8/1727/2513415/ch0803001727.pdf>>.
- CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C. H.; ALMEIDA, L. O. Epigenetic modifications and head and neck cancer: Implications for tumor progression and resistance to therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, , 12 jul. 2017.
- CAVALLI, G.; HEARD, E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature* , 25 jul. 2019.
- CHEN, Y. W. et al. Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, v. 119, n. 24, p. 4259–4267, 15 dez. 2013.
- CHEN, Y.; ZHANG, Y. Functional and mechanistic analysis of telomerase: An antitumor drug target. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 163, p. 24–47, jul. 2016.
- CHUNG, S. S. et al. A novel curcumin analog inhibits canonical and non-canonical functions of telomerase through STAT3 and NF- $\kappa$ B inactivation in colorectal cancer cells. *Oncotarget* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.oncotarget.com](http://www.oncotarget.com)>.
- CONCHING, A. K. S.; THAYER, Z. Biological pathways for historical trauma to affect health: A conceptual model focusing on epigenetic modifications. *Social Science and Medicine*, v. 230, p. 74–82, 1 jun. 2019.
- DOTTO, G. P. Multifocal epithelial tumors and field cancerization: stroma as a primary determinant. *Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 4, p. 1446–1453, 1 abr. 2014.
- D'SOUZA, W.; SARANATH, D. Clinical implications of epigenetic regulation in oral cancer. *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, , 1 dez. 2015.
- ELJABO, N. et al. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 47, n. 8, p. 976–982, ago. 2018.
- ERNANI, V.; SABA, N. F. Oral Cavity Cancer: Risk Factors, Pathology, and Management. *Oncology*, v. 89, n. 4, p. 187–195, 2015.
- FARDI, M.; SOLALI, S.; FARSHDOUSTI HAGH, M. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review. *Genes & Diseases*, v. 5, n. 4, p. 304–311, dez. 2018.
- GARCÍA-CAO, M. et al. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nature Genetics*, v. 36, n. 1, p. 94–99, jan. 2004.
- GINOS, M. A. et al. Identification of a Gene Expression Signature Associated with Recurrent Disease in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Cancer Research*, v. 64, n. 1, p. 55–63, 1 jan. 2004.



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil.

IVANCICH, M. et al. Treating cancer by targeting telomeres and telomerase. *Antioxidants*. MDPI, , 1 mar. 2017.

JELTSCH, A.; BROCHE, J.; BASHTRYKOV, P. Molecular Processes Connecting DNA Methylation Patterns with DNA Methyltransferases and Histone Modifications in Mammalian Genomes. *Genes*, v. 9, n. 11, p. 566, 21 nov. 2018.

JOHNSON, D. E. et al. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. Nature Research, , 1 dez. 2020.

JOHNSON, W. L. et al. RNA-dependent stabilization of SUV39H1 at constitutive heterochromatin. *eLife*, v. 6, 1 ago. 2017.

KALPOUZOS, G. et al. Telomerase Gene ( *hTERT* ) and Survival: Results From Two Swedish Cohorts of Older Adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 71, n. 2, p. 188–195, fev. 2016.

KUMAR, M. et al. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 12, n. 2, p. 458, 2016.

LABERTHONNIÈRE, C.; MAGDINIER, F.; ROBIN, J. D. Bring it to an end: Does telomeres size matter? *Cells*. , 1 jan. 2019.

LI, B.; ZHENG, Y.; YANG, L. The oncogenic potential of SuV39H2: A comprehensive and perspective view. *Journal of Cancer*., , 2019.

LIN, C.-Y. et al. Translocation Breakpoints Preferentially Occur in Euchromatin and Acrocentric Chromosomes. *Cancers*, v. 10, n. 1, p. 13, 8 jan. 2018.

LIN, J. et al. Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design. *PsychoneuroendocrinologyElsevier Ltd*, , 1 jan. 2019.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Cancer Etiology: Variation in Cancer Risk among Tissues is Poorly Explained by the Number of Gene Mutations. 2017.

LU, C. et al. SUV39H1 Represses the Expression of Cytotoxic T-Lymphocyte Effector Genes to Promote Colon Tumor Immune Evasion. *Cancer Immunology Research*, v. 7, n. 3, p. 414–427, 1 mar. 2019.

LU, C. et al. SUV39H1 regulates human colon carcinoma apoptosis and cell cycle to promote tumor growth. *Cancer Letters*, v. 476, p. 87–96, abr. 2020.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 25 set. 2015.

MIZUKOSHI, E.; KANEKO, S. Telomerase-Targeted Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 8, p. 1823, 12 abr. 2019.

MOHAN, M.; JAGANNATHAN, N. Oral field cancerization: an update on current concepts. *Oncology Reviews*, 30 jun. 2014.

- NAKASHIMA, T. et al. Promotion of cell proliferation by the proto-oncogene *DEK* enhances oral squamous cell carcinogenesis through field cancerization. *Cancer Medicine*, v. 6, n. 10, p. 2424–2439, out. 2017.
- NAKAYAMA, R.; ARIKAWA, K.; BHAWAL, U. K. The epigenetic regulation of CXCL14 plays a role in the pathobiology of oral cancers. *Journal of Cancer*, v. 8, n. 15, p. 3014–3027, 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Report of the Global mOralHealth Workshop: 10-12 October 2018.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.
- PARKINSON, E. K.; FITCHETT, C.; CERESER, B. Dissecting the non-canonical functions of telomerase. *Cytogenetic and Genome Research*, fev. 2009.
- PATEL, J. et al. Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 12, n. 2, p. 447, 2016.
- PATRICK, M.; WENG, N. Expression and regulation of telomerase in human T cell differentiation, activation, aging and diseases. *Cellular Immunology*, v. 345, p. 103989, nov. 2019.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 9, p. 45e–445, 1 maio 2001.
- PODOLSKIY, D. I.; GLADYSHEV, V. N. Intrinsic Versus Extrinsic Cancer Risk Factors and Aging. *Trends in Molecular Medicine*, v. 22, n. 10, p. 833–834, out. 2016.
- RACHAKONDA, P. S. et al. TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, n. 43, p. 17426–17431, 22 out. 2013.
- RACHAKONDA, S. et al. Telomere length and survival in primary cutaneous melanoma patients. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- RAO, V. K.; PAL, A.; TANEJA, R. A drive in SUVs: From development to disease. *Epigenetics*, v. 12, n. 3, p. 177–186, 4 mar. 2017.
- RIVERA, C. et al. Methylation of histone H3 lysine 9 occurs during translation. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. 19, p. 9097–9106, 30 out. 2015.
- RODRIGUES, C. et al. A SUV39H1-low chromatin state characterises and promotes migratory properties of cervical cancer cells. *Experimental Cell Research*, v. 378, n. 2, p. 206–216, maio 2019.
- SAHA, N.; MUNTEAN, A. G. Insight into the multi-faceted role of the SUV family of H3K9 methyltransferases in carcinogenesis and cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 1 jan. 2021.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 5 jun. 2008.

- SHIN, K.-H.; KIM, R. H. An Updated Review of Oral Cancer Stem Cells and Their Stemness Regulation. *Critical Reviews in Oncogenesis*, v. 23, n. 3–4, p. 189–200, 2018.
- SHIRAI, A. et al. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *eLife*, v. 6, 1 ago. 2017.
- SHRESTHA, A. D. et al. Prevalence and incidence of oral cancer in low- and middle-income countries: A scoping review. *European Journal of Cancer Care*. Blackwell Publishing Ltd, , 1 mar. 2020.
- SLAUGHTER, D. P.; SOUTHWICK, H. W.; SMEJKAL, W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, v. 6, n. 5, p. 963–968, set. 1953.
- THOMPSON, C. A. H.; WONG, J. M. Y. Non-canonical Functions of Telomerase Reverse Transcriptase: Emerging Roles and Biological Relevance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 6, p. 498–507, 31 jan. 2020.
- TRYBEK, T. et al. Telomeres and telomerase in oncogenesis (review). *Oncology Letters*. 1 ago. 2020.
- WANG, J. et al. Functional Role of SUV39H1 in Human Renal Tubular Epithelial Cells Under High-glucose Ambiance. *Inflammation*, v. 41, n. 1, p. 1–10, 29 fev. 2018.
- WANG, Y. et al. The histone demethylase LSD1 is a novel oncogene and therapeutic target in oral cancer. *Cancer Letters*, v. 374, n. 1, p. 12–21, abr. 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Cancer Maps* WHO.
- XI, L.; CECH, T. R. Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT. *Nucleic Acids Research*, v. 42, n. 13, p. 8565–8577, 29 jul. 2014.
- XIE, L.; SHANG, Z. Burden of oral cancer in Asia from 1990 to 2019: Estimates from the Global Burden of Disease 2019 study. *PLoS ONE*, v. 17, n. 3 March, 1 mar. 2022.
- YANG, Y.-J. et al. The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3 K9 methylation for cyclin D1 repression. *Nucleic Acids Research*, v. 38, n. 2, p. 382–390, jan. 2010.
- ZHANG, J. et al. Suv39h1 downregulation inhibits neointimal hyperplasia after vascular injury. *Atherosclerosis*, v. 288, p. 76–84, set. 2019.
- ZHENG, Y. et al. Identification of SUV39H2 as a potential oncogene in lung adenocarcinoma. *Clinical Epigenetics*, v. 10, n. 1, p. 129, 22 dez. 2018.
- ZHOU, M. et al. H3K9me3, H3K36me3, and H4K20me3 Expression Correlates with Patient Outcome in Esophageal Squamous Cell Carcinoma as Epigenetic Markers. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 64, n. 8, p. 2147–2157, 20 ago. 2019.