



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

FÁBIO WILLIAN MARTINS DA SILVA

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA *SETD* EM CÂNCER DE BOCA

BRASÍLIA-DF

2022

FÁBIO WILLIAN MARTINS DA SILVA

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA *SETD* EM CÂNCER DE BOCA

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

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

BRASÍLIA-DF
2022

FÁBIO WILLIAN MARTINS DA SILVA

ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DA FAMÍLIA *SETD* EM CÂNCER DE BOCA

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Doralina do Amaral Rabello Ramos (Presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. João Nunes de Matos Neto
Cettro – Centro de Câncer de Brasília

Profa. Dra. Andrea Barretto Motoyama (Suplente)
Universidade de Brasília - UnB

Dedico esse trabalho aos meus filhos Erick e Evelin, a minha esposa Alice, por me apoiarem nessa caminhada, ao meu grupo de pesquisa, aos meus amigos, aos pacientes que precisam de tratamento contra o câncer, a Deus.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela família que tenho.

A todos os professores e alunos do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer, onde aprimorei meus conhecimentos.

Especialmente a minha orientadora Prof. Dr. Doralina, pelo conhecimento repassado, toda paciência, apoio, incentivo, dedicação, confiança e ensinamentos que levarei comigo todos os dias.

À Universidade de Brasília, ao Laboratório de Patologia por fornecerem toda infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Especialmente a minha esposa Alice que sempre esteve comigo nessa jornada sempre me apoiando e confiando em mim quando eu achava que não daria conta, aos meus filhos Evelin e Erick por estarem sempre comigo.

Agradeço aos pacientes que gentilmente consentiram em participar deste estudo.

Muito obrigado.

Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

Introdução. O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo de câncer que mais afeta a cavidade oral, correspondendo a 90% das neoplasias orais. O câncer da cavidade oral e orofaringe é um grande problema de saúde pública mundial, principalmente em países em desenvolvimento, e com frequência é diagnosticado em estágios avançados, o que implica na diminuição de sobrevida dos pacientes e dificulta as estratégias de tratamento. Apesar dos avanços tecnológicos e científicos dos últimos anos, o câncer oral ainda não tem os seus mecanismos moleculares completamente elucidados e nem marcadores que possam ser usados para um melhor manejo clínico destes pacientes. Dentre as mudanças epigenéticas estudadas no câncer oral, destaca-se a metilação de DNA em promotores de genes, além da metilação de histonas e os RNAs não codantes. A metilação de histonas é mediada por diversas famílias de enzimas metiltransferases (HMTases) e vem se mostrando como um importante mecanismo na regulação da transcrição gênica, em células saudáveis e em doenças como o câncer. A família *SETD* de metiltransferases desempenha um papel importante na manutenção da cromatina e na transcrição gênica, embora o seu papel na regulação das funções celulares normais e na carcinogênese ainda não tenha sido completamente caracterizado. **Objetivo.** Analisar a expressão dos genes da família *SETD* de metiltransferases de histonas no câncer oral, buscando identificar possíveis novos alvos terapêuticos e potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos. **Métodos.** Foi realizada Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) quantitativa em tempo real para avaliar a expressão dos 10 genes da família *SETD* em linhagens celulares de câncer oral (SCC3, SCC9, SCC25 e Cal 27) e amostras clínicas de pacientes, incluindo amostras tumorais e margens de tecido normal. Foi feita análise de associação da expressão gênica com os dados clínicos dos pacientes, além de análises *in Silico* utilizando as plataformas UALCAN (TCGA), Oncomine (Thermo Fischer) e The Human Protein Atlas. **Resultados.** Dentre os 10 genes da família *SETD*, o *SETD5* e o *SETMAR* apresentaram-se alterados para amostras tumorais orais. O *SETD5* apresentou expressão aumentada em tecidos tumorais, quando comparados a tecidos normais, e o gene *SETMAR* apresentou expressão diminuída em tecidos tumorais. Na análise de associação com os dados clínicos, os genes *SETD4* e *SETD5* mostraram expressão aumentada nos pacientes mais idosos. Na análise *in silico*, foram encontradas as mesmas alterações de expressão dos genes *SETD5* e *SETMAR*, confirmando os resultados do presente estudo. Quanto às linhagens celulares, a expressão dos 10 genes apresentou-se muito heterogênea. **Conclusão:** A alta expressão de *SETD5* no câncer oral, em amostra de pacientes brasileiros, parece ter um papel oncogênico na carcinogênese, considerando que este gene parece levar à desregulação da via de sinalização *PI3K/AKT/mTOR*. *SETMAR*, com sua baixa expressão no câncer oral pode desencadear uma instabilidade genômica, parecendo exercer papel de supressor tumoral. Até o momento, este é o primeiro trabalho a identificar

alterações da família *SETD* no câncer oral e este entendimento pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Palavras-Chave: Câncer oral, família *SETD*, expressão gênica, epigenética, metiltransferases de histonas, PCR em tempo real, análise *in silico*.

ABSTRACT

Introduction. Squamous cell carcinoma (SCC) is the type of cancer that most affects the oral cavity, accounting for 90% of all oral neoplasms. Cancer of the oral cavity and oropharynx is a major public health problem worldwide, especially in developing countries, and it is often diagnosed in advanced stages, which implies a decrease in patient survival and makes treatment more difficult. Despite the technological and scientific advances in recent years, oral cancer still does not have its molecular mechanisms fully elucidated nor markers that can be used for better clinical management of these patients. Among the epigenetic changes studied in oral cancer, DNA methylation in gene promoters stands out, in addition to histone methylation and non-coding RNAs. Histone methylation is mediated by several families of methyltransferase enzymes (HMTases) and has been shown to be an important mechanism in the regulation of gene transcription, in normality and in diseases such as cancer. The SETD family of methyltransferases plays an important role in chromatin maintenance and gene transcription, although their role in regulating cell functions in normality and in carcinogenesis has not yet been fully characterized.

Objective. To analyze the expression of the genes of the *SETD* family of histone methyltransferases in oral cancer, aiming to identify possible new therapeutic targets and potential diagnostic and prognostic markers. **Methods.** Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed to evaluate the expression of the 10 genes of *SETD* family in oral cancer cell lines (SCC3, SCC9, SCC25, and Cal 27) and clinical samples from patients, including tumor tissue and normal margins. Association analysis of gene expression with clinical data of patients was carried out, in addition to *in Silico* analyses using the UALCAN (TCGA), Oncomine (Thermo Fischer), and The Human Protein Atlas platforms. **Results.** Among the 10 genes of the *SETD* family, *SETD5* and *SETMAR* were altered for oral tumor samples. *SETD5* showed increased expression in tumor tissues when compared to normal tissues, and the *SETMAR* gene showed decreased expression in tumor tissues. In the association analysis with clinical data, the *SETD4* and *SETD5* genes showed increased expression in the older patients. In the *in silico* analyses, the same expression alterations of the *SETD5* and *SETMAR* genes were found, confirming our results. Considering the cell lines, the expression of the 10 genes was very heterogeneous. **Conclusion:** The high expression of *SETD5* in oral cancer, in a sample of Brazilian patients, seems to have an oncogenic role in the carcinogenesis, considering that this gene seems to lead to dysregulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *SETMAR*, with its low expression in oral cancer, might trigger genomic instability and seems to have a tumor suppressor role. So far, this is the first study to identify alterations in the *SETD* family in oral cancer and this understanding can contribute to the development of new diagnostic, prognostic, and treatment strategies.

Key-words: Oral cancer, *SETD* family, gene expression, epigenetics, histone methyltransferases, real-time PCR, *in silico* analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos subsítios da cavidade oral	19
Figura 2. As oitos capacidades adquiridas do câncer propostas por Hanahan e Weinberg, em 2011	22
Figura 3. Representação esquemática das diferentes camadas da regulação epigenética	24
Figura 4. Modelo esquemático da organização estrutural do nucleossomo	25
Figura 5. Análises de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD5</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> , <i>SETD8</i> e <i>SETMAR</i> , utilizando qPCR em 4 diferentes linhagens de células de câncer oral, comparando com a expressão de Hacat (Controle)	37
Figura 6. Expressão Relativa de <i>SETD5</i> entre amostras de tecido normal e tumoral	38
Figura 7. Expressão Relativa de <i>SETMAR</i> entre amostras de tecido normal e tumoral	39
Figura 8. Expressão Relativa de <i>SETD1A</i> , <i>SETD1B</i> , <i>SETD2</i> , <i>SETD3</i> , <i>SETD4</i> , <i>SETD6</i> , <i>SETD7</i> e <i>SETD8</i> entre amostras de tecido normal e tumoral	39
Figura 9. Expressão Relativa de <i>SETD4</i> associado a idade dos pacientes	42
Figura 10. Expressão Relativa de <i>SETD5</i> associado a idade dos pacientes	42
Figura 11. Correlação de expressão dos genes <i>SETD4</i> e <i>SETD5</i> em paciente com idade mais avançada (acima de 60 anos).....	43
Figura 12. Expressão Gênica de <i>SETD5</i> entre amostras de tecido normal e tumoral	45
Figura 13. Expressão Gênica de <i>SETMAR</i> entre amostras de tecido normal e tumoral	45
Figura 14. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier com o gene <i>SETD5</i> utilizando teste de Logrank	46
Figura 15. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier com o gene <i>SETMAR</i> utilizando teste de Logrank	47
Figura 16. Expressão gênica de <i>SETD5</i> em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes estágios	48
Figura 17. Expressão gênica de <i>SETMAR</i> em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes estágios	49

Figura 18. Expressão gênica de <i>SETD4</i> em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes faixas de idade.....	50
Figura 19. Expressão gênica de <i>SETMAR</i> em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes faixas de idade.....	51
Figura 20. Expressão gênica de <i>SETD5</i> em tecidos normais e tumorais.	52
Figura 21. Expressão gênica de <i>SETMAR</i> em tecidos normais e tumorais.	52
Figura 22. Imuno-histoquímica <i>SETD5</i> : tecido normal e tecido de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço – The Human Protein Atlas	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características biológicas das linhagens celulares	31
Tabela 2. Características clínico-patológicas dos 42 pacientes com câncer oral	36

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Perfil dos genes da família <i>SETD</i>	27
Quadro 2. Ensaio para análise da expressão gênica por qPCR	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CAL27	Adenosquamous Cell Carcinoma 27
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
cDNA	DNA Complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH3	Grupo Metil
CLDN1	Claudin 1
CO ₂	Gás Carbônico
Cq	<i>Quantification Cycle</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles's Medium
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	<i>Enhancer of Zeste 2 Polycomb repressive complex 2 subunit</i>
FPK	<i>Fragments Per Kilobase of Exon Per Million Fragments Mapped</i>
GTE _x	<i>The Genotype Tissue Expression</i>
H1	Histona 1
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H3K27	Lisina 27 da Histona 3
H3K27me3	Trimetilação da Lisina 27 da Histona 3
H3K36	Lisina 36 da Histona 3
H3K4	Lisina 4 da Histona 3
H3K4Me2	Dimetilação da Lisina 4 da Histona 3
H3K4me3	Trimetilação da Lisina 4 da Histona 3
H3K79	Lisina 79 da Histona 3
H3K9	Lisina 9 da Histona 3
H4	Histona 4
H4K20	Lisina 20 da Histona 4
HACAT	Célula humana de Queratinócito Normal de pele
HCFMRS	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HMTases	Enzimas metiltransferases de histona
MTases	Enzimas Metiltransferases
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HUB	Hospital Universitário de Brasília
F11R	F11 Receptor
Ki-67	Marker of proliferation Ki-67
KMTases	Enzimas Metiltransferases de lisinas
mRNA	RNA Mensageiro
N	Número Amostral
P16/CDKN2A	Proteína 16/Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
PNUD	Programa das Nações Unidas
pRb	RB Transcriptional corepressor
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
QR	Quantificação Relativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA

SAM	S-adenosil metionina
SCC25	<i>Squamous Cell Carcinoma of Oral Cavity 25</i>
SCC3	<i>Squamous Cell Carcinoma of Oral Cavity 3</i>
SCC9	<i>Squamous Cell Carcinoma of Oral Cavity 9</i>
SET	<i>Supressor-Enhancer- of Zeste Thithorax</i>
SETD1A	<i>SET Domain Containing 1A, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SETD1B	<i>SET Domain Containing 1B, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SETD2	<i>SET Domain Containing 2, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SETD3	<i>SET Domain Containing 3, Actin Histidine Methyltransferase</i>
SETD4	<i>SET Domain Containing 4</i>
SETD5	<i>SET Domain Containing 5</i>
SETD6	<i>SET Domain Containing 6, Protein Lysine Methyltransferase</i>
SETD7	<i>SET Domain Containing 7, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SETD8	<i>SET Domain Containing 8, Histone Lysine Methyltransferase</i>
SETMAR	<i>SET domain and mariner transposase fusion gene</i>
SUV39H1	<i>SUV39H1, Histone Lysine Methyltransferase</i>
TCGA	<i>The Cancer Genoma Atlas</i>
TP53	Tumor Protein p53
ΔCq	Diferença entre o Cq médio do gene de interesse e o Cq médio do gene endógeno
$\Delta\Delta Cq$	Diferença do ΔCq da amostra de interesse normalizada e o ΔCq da amostra controle normalizada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 CÂNCER DE BOCA.....	19
1.1.1 Epidemiologia	19
1.1.2 Diagnóstico e Prognóstico.....	20
1.1.3 Patogênese do Câncer.....	21
1.2 Metilação de Histonas	23
1.3 Família SETD.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4. SUJEITOS E MÉTODOS	31
4.1 Sujeitos.....	31
4.2 Métodos.....	31
4.2.1 Cultivo Celular	31
4.2.2 Extração do RNA Total e Síntese de DNA Complementar.....	32
4.2.3 PCR em Tempo Real	32
4.2.4 Pesquisa in Sílico.....	34
4.2.5 Análise Estatística	34
4.2.5.1 Associação Entre a Expressão Gênica e os Dados Clínicos dos Pacientes.....	35
4.2.5.2 Correlação Entre a Expressão Gênica e os Dados Clínicos dos Pacientes.....	35
5. RESULTADOS.....	35
5.1 Características Clínico-Patológicas dos Pacientes	35
5.2 Expressão Relativa dos Genes da Família <i>SETD</i> em Linhagens Celulares de Câncer de Oral	36
5.3 Expressão Relativa dos Genes da Família <i>SETD</i> em Amostras de Tecidos Tumorais de Pacientes com Câncer Oral Comparada com Amostras de Tecidos Normais.....	38
5.4 Expressão Gênica associada aos dados clínicos dos pacientes	41
5.4.1 Idade.....	41

5.4.1.1 <i>SETD4</i> e <i>SETD5</i> hiperexpressos em tumores de pacientes com idade acima de 60 anos	41
5.4.1.2 Correlação de expressão dos genes <i>SETD4</i> e <i>SETD5</i> em tumores de pacientes com idade acima de 60 anos	43
5.4.4 Recidiva	43
5.4.5 Metástase	43
5.4.6 Estadiamento	44
5.5 Análises <i>in Silico</i>	44
5.5.1 Análise de Dados do UALCAN	44
5.5.1.1 Análise de expressão gênica.....	44
5.5.1.2 Análise de sobrevida	46
5.5.1.3 Análise de expressão gênica em diferentes estágios do tumor.....	47
5.5.1.4 Análise de expressão gênica baseada na idade dos pacientes	49
5.5.2 Análise de Dados no Oncomine	51
5.5.3 Análise de Dados no The Human Protein Atlas.....	53
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer de boca

1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo de câncer que mais afeta a cavidade oral, correspondendo a 90% das neoplasias orais (1,2). O câncer da cavidade oral e orofaringe é um grande problema de saúde pública mundial, principalmente em países em desenvolvimento, e com frequência é diagnosticado em estágios avançados, o que implica na diminuição de sobrevida dos pacientes e dificulta as estratégias de tratamento. Os índices de desenvolvimento humano também estão associados a incidência do câncer oral, e segundo os índices do Programa das Nações Unidas para o desenvolvimento (PNUD), a taxa de mortalidade deste câncer é maior nos países em desenvolvimento, devido às desigualdades sociais (3,4,5).

A definição de câncer de cabeça e pescoço é relacionada às bases anátomo-topográficas e tem como finalidade a descrição de tumores malignos na região superior do trato aerodigestivo que inclui a cavidade oral, a orofaringe, a faringe e a laringe. O câncer oral é um destes subgrupos dos carcinomas de cabeça e pescoço, e é uma neoplasia maligna que tem a sua origem nas mucosas da boca e dos lábios, base da língua, língua, região sublingual, assoalho bucal, palato duro e mole, região alveolar, e trígono retromolar (Figura 1) (6,7).

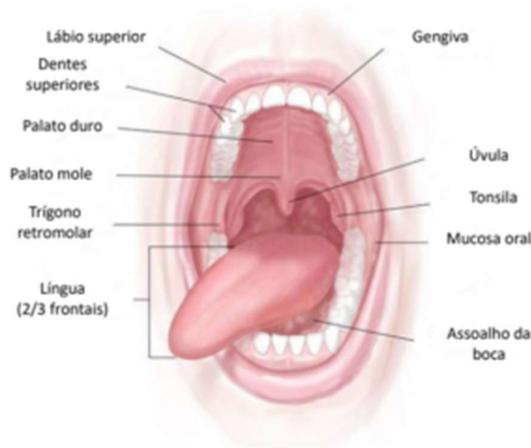


Figura 1: Representação esquemática dos subsítios da cavidade oral. Adaptado de Wong (8).

No triênio de 2020-2022, a cada ano no Brasil, a estimativa é de 15.190 novos casos de câncer da cavidade oral, sendo 11.180 em homens e 4.010 em mulheres, apresentando um risco estimado de 10,69 novos casos a cada 100 mil homens, ocupando assim a 5^o posição entre os cânceres mais

comuns, e 3,71 para cada 100 mil mulheres, ocupando a 12ª posição dos cânceres mais comuns (9).

Nos EUA, estimou-se para 2020 53.260 novos casos de câncer oral e faringe, com taxas de incidência 2 vezes maior em homens e com 10.750 óbitos estimados (10).

Estão associados à ocorrência de câncer nos lábios e cavidade oral, o uso excessivo de álcool e de qualquer forma de uso do tabaco, doenças virais como o HPV, imunodeficiência, exposição excessiva ao sol e condições socioambientais (11). O álcool e o tabaco são considerados os principais fatores de risco e estão presentes em aproximadamente 90% dos casos, apresentando efeito sinérgico. O tabaco é responsável por milhões de óbitos associados ao câncer, com estudos que mostraram a relação das substâncias encontradas no tabaco com o surgimento e desenvolvimento de tumores na cavidade oral, causando mutações e comprometimento de replicação do DNA (12,13).

No Brasil, ocorre uma maior incidência de câncer oral em pessoas com vulnerabilidade socioeconômica, devido a não terem acesso aos serviços de saúde em sua totalidade, e à falta de informação e conhecimento da população sobre os fatores de risco da doença (14,15). Sugere-se que os profissionais de saúde necessitam de melhor treinamento para o diagnóstico precoce. Além disso, ressalta-se que é necessário o melhoramento dos programas de saúde visando a prevenção, com mais investimento nos programas de educação em saúde, mais atenção à saúde primária e mais políticas públicas, todas essas medidas que ajudariam no diagnóstico precoce, prevenção e redução da mortalidade pelo câncer oral (16).

1.1.2 Diagnóstico e prognóstico

Praticamente a metade dos casos de câncer oral tem o seu diagnóstico realizado em estágios avançados e, no entanto, o diagnóstico precoce do câncer oral e de orofaringe (CCE) é essencial para se ter um melhor prognóstico, tratamentos menos agressivos e diminuição no número de óbitos (17,18).

Para se obter o diagnóstico do câncer oral é necessária uma biópsia do tumor, realizada por um cirurgião bucomaxilofacial, que fará o estadiamento pelo sistema TNM, que se baseia no tamanho do tumor em centímetros (T), em linfonodos regionais afetados pelo tumor (N), e na ausência ou presença de metástases (M). Essas características podem ser observadas por imagens de tomografia computadorizada, ressonância magnética ou ultrassom, e diante disso, o estadiamento TNM e o local da lesão se torna de grande importância na tomada de decisão multiprofissional para o tratamento do paciente (8,19).

Para se obter um prognóstico para o câncer oral e de orofaringe são utilizados alguns critérios estabelecidos pelo sistema TNM, além da idade, gênero, grau histológico e a expressão dos marcadores p16, pRb e Ki-67, que auxiliam no entendimento da progressão do tumor (20). O câncer oral é mais predominante em homens, tem maior incidência na faixa de idade 50-60 anos, apesar que nos últimos anos a incidência em pacientes mais jovens vem aumentando (21).

A presença do HPV vem sendo associada à progressão do câncer oral, principalmente em pacientes do sexo masculino e com idade abaixo de 45 anos, que não fazem uso do álcool e do tabaco e estes pacientes têm mostrado melhor prognóstico (22,23).

A American Joint Committee on Cancer (AJCC), em sua publicação mais recente de 2018, na oitava edição, mostra como importantes fatores para determinar o prognóstico do carcinoma espinocelular da cavidade oral, o critério de profundidade de invasão (DOI) e o de extensão extranodal patológica (pENE). Estudos mostram que o critério DOI associado com o tamanho do tumor são úteis para definição de prognóstico, e que o critério pENE está fortemente relacionado a uma menor sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular da cavidade oral (24,25,26). O câncer oral apresenta uma taxa alta de recorrência, além disso, apresenta com muita frequência metástases linfonodais. Mesmo com todos os avanços na área de oncologia, o câncer oral ainda apresenta um mau prognóstico, com uma taxa de sobrevida de aproximadamente 5 anos (27).

Considerando esses desafios, os pesquisadores têm buscado biomarcadores para o câncer oral, que possam ser detectados por meios não invasivos e indolores para os pacientes através de uma associação clínica com dados moleculares, para um melhor entendimento da doença que ajudará no desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamentos (28,29).

1.1.3 Patogênese do câncer

Câncer é um termo que abrange um conjunto de mais de 100 doenças diferentes, apresentando como característica principal o crescimento descontrolado e autônomo das células malignas, que podem apresentar diferentes graus de diferenciação até a completa indiferenciação celular. É uma doença que apresenta ampla complexidade, incluindo diferentes células do microambiente que interagem entre si e com as células cancerígenas (30).

Vários estudos foram realizados ao longo de quase três décadas de muitos avanços na pesquisa do câncer (31,32,33,34,35,36,37,38), e com o objetivo de simplificar e sintetizar estes vários trabalhos, Hanahan e Weinberg publicaram no ano de 2000, um grande e importante trabalho sobre a origem e a manutenção do câncer, denominado *hallmarks* do câncer. Este trabalho apresenta seis características biológicas que são adquiridas no desenvolvimento de tumores malignos: 1) Manutenção da sinalização proliferativa, desencadeando a proliferação

continuada e desenfreada das células cancerígenas; 2) Inibição de supressores de crescimento; 3) Resistência à morte celular; 4) Imortalidade replicativa; 5) Indução da angiogênese; e 6) Ativação de invasão e metástase (39).

Após a publicação do artigo em 2000, os estudos continuaram avançando sobre o câncer, e em 2011, Hanahan e Weinberg publicaram outro trabalho adicionando mais duas novas características: 1) Reprogramação do metabolismo energético; e 2) Escape do sistema imunológico. Além disso, eles sugeriram que a instabilidade genômica, mutação e a inflamação provocada pelo tumor são fatores que ajudam na definição das 8 características do câncer (30) (Figura 2).



Figura 2: As capacidades adquiridas do câncer e os fatores facilitadores propostos por Hanahan e Weinberg, em 2011 (30).

Os fatores de risco e carcinogênicos envolvidos no câncer oral desencadeiam alterações genéticas e epigenéticas que atuam promovendo o desenvolvimento do tumor e modificando os seus processos celulares como apoptose e ciclo celular. Essas mudanças estão associadas a

mutações e mudanças na expressão de muitos genes, como o receptor do fator de crescimento epidérmico EGFR, o TGF- β , os fatores de crescimento fibroblástico FGF-BP, MMK6, além dos genes CDKN2A, TP53, SYNE1, NOTCH1 e PIK3CA, entre outros (40,41).

No decorrer da progressão do carcinoma de células escamosas oral (CCEO), aproximadamente em 80% dos casos ocorre a inativação do gene *TP53*. Mutações nos genes *CDKN2A*, *CCND1*, *PIK3CA*, *PTEN* e *HRAS* estão relacionadas à desordem do ciclo celular, imortalidade e progressão do carcinoma de células escamosas oral (42).

Estudos mostram que a inflamação, considerada uma característica no decorrer da carcinogênese, também está presente no carcinoma de células escamosas orais e que alguns genes ligados ao processo inflamatório estão associados à progressão e iniciação deste câncer, como a citocina IL-6, que promove a iniciação do tumor e desencadeia alterações epigenéticas como a ativação de genes oncogênicos, além dos genes *STAT1*, *LYN*, *BDNF*, *C3*, *CD274*, *PDCD1*, *LG2* e *CXCL10* que se mostram com expressão aumentada no câncer oral (43,44).

1.2 Metilação de histonas

As diversas modificações genéticas e epigenéticas do câncer normalmente trabalham juntas afetando múltiplas vias celulares que estão relacionadas com a carcinogênese e progressão tumoral, como o controle da proliferação celular, os mecanismos de reparo do DNA e a apoptose (45,46).

A epigenética consiste em alterações químicas na cromatina que não envolvem uma mudança na sequência dos nucleotídeos de DNA. As mais importantes são metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação) e os RNA não-codificantes (Figura 3). Estes mecanismos regulam a expressão gênica, a manutenção da transcrição gênica e o desenvolvimento de algumas doenças, como o câncer. Por serem alterações reversíveis, os processos epigenéticos são alvos interessantes para o desenvolvimento de novos métodos de tratamento e podem ser usados como biomarcadores moleculares em diferentes tipos de câncer (47,48,49).

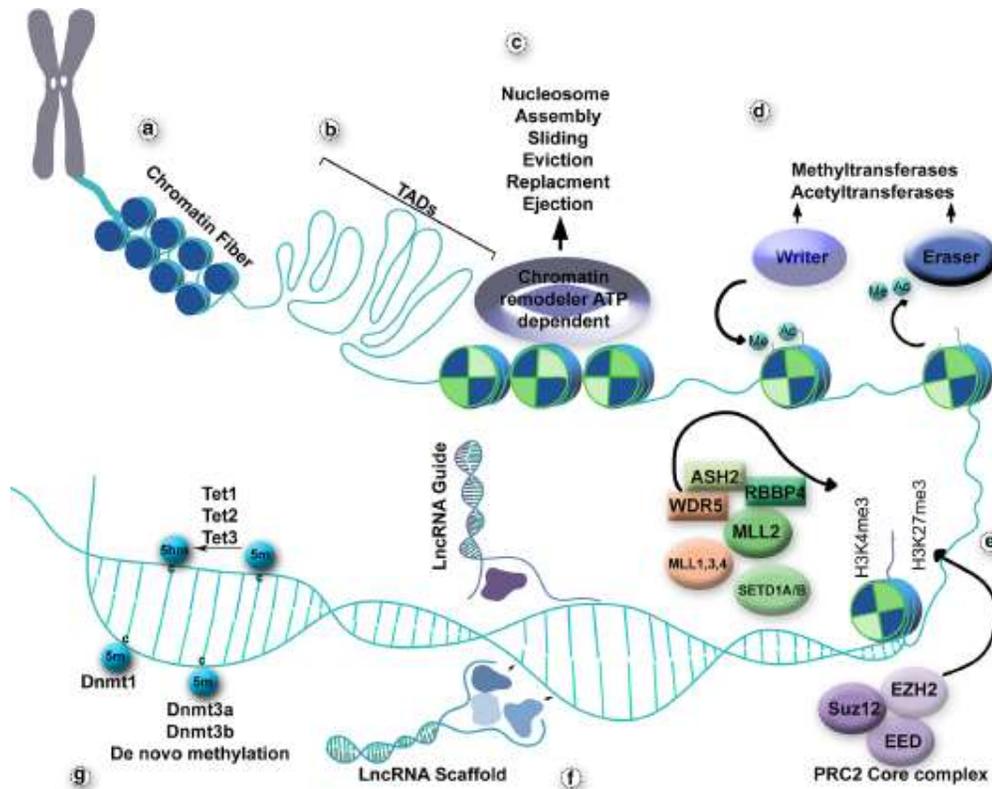


Figura 3: Representação esquemática das diferentes camadas da regulação epigenética. “a- A cromatina dobrada é considerada a primeira camada de regulação da transcrição, quando os nucleossomos são montados e formam as fibras. b- Os domínios de associação TADs são regiões genômicas consideradas unidades regulatórias e estruturais definidas. c- Ligação de remodeladores de cromatina dependentes de ATP expõem locais para regulação da transcrição. d- Caudas de histonas submetidas a diferentes modificações covalentes principalmente em seus resíduos de lisina. Enzimas conhecidas como “escritoras” (metiltransferases e acetiltransferases), enquanto “apagadores” (Desmetilases e desacetilases) as removem. e- Várias proteínas e complexos de proteínas estão envolvidos no estabelecimento de marcas de histonas bivalentes. f- Os lncRNAs ajustam a expressão gênica de várias maneiras, como guiando proteínas para um local específico no genoma ou atuando como um andaime para outros componentes regulatórios. g- DNA metiltransferases, tais como Dnmt1, Dnmt3a e Dnmt3b adicionam ou mantêm grupos metil em resíduos de citosina (5-metilcitosina), enquanto membros da família de translocação dez-onze (Tet) catalisam a oxidação de 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina, que pode então ser posteriormente convertida em outros intermediários ou removida para desmetilar o DNA” (50).

Nas células de seres eucariontes o DNA fica bem compactado em forma de cromatina e suas unidades funcionais são denominadas de nucleossomos. Estes são compostos por um octâmero com quatro histonas (H3, H4, H2A e H2B), que estão envolvidas por 147 pares de bases de DNA (Figura 4). A histona H1 é denominada histona ligante e tem a capacidade de ligar os nucleossomos com o DNA. A transcrição gênica está associada às modificações de histonas e às enzimas que têm papel na compactação da cromatina. Quando ocorre a desregulação destes componentes, altera-se a expressão gênica, o que é regularmente observado no câncer (51,52).

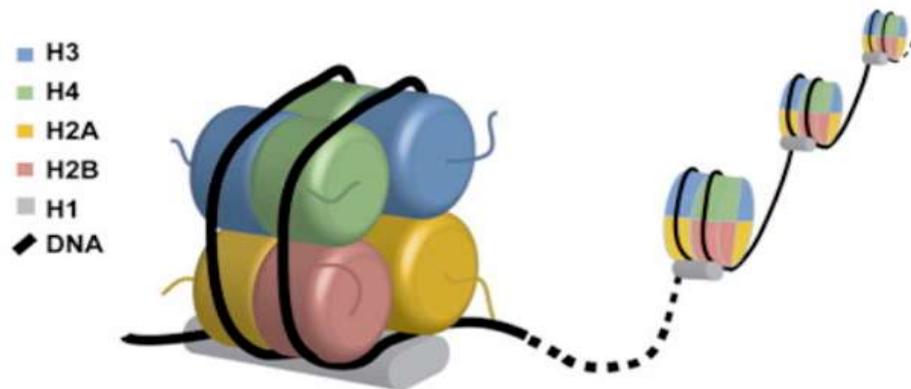


Figura 4: Modelo esquemático da organização estrutural do nucleossomo: Representado por H3, H4, H2A, H2B e H1. Em preto tem-se o DNA (53).

Dentre as mudanças epigenéticas mais estudadas no câncer oral, destaca-se a metilação de DNA em promotores de genes, como o *TFP12*, *SOX17* e *GATA4*, *PI4ARF* e *LATS2*, que se encontram hipermetilados. A supressão destes genes por metilação do DNA e por modificações das proteínas histonas alteram vários processos celulares facilitando a carcinogênese, o que indica que esses genes podem desempenhar um papel de supressores tumorais (54,55).

A metilação de histonas é mediada por diversas famílias de enzimas metiltransferases (HMTases) e vem se mostrando como um importante mecanismo na regulação da transcrição gênica, nas células saudáveis e em doenças como o câncer (56,57). As principais alterações que podem acontecer em relação à metilação de histonas no câncer são a perda ou ganho de função dos genes envolvidos, ocasionados por hipermetilação do promotor destes genes, translocação cromossômica e mutação nos genes que codificam as histonas ou as enzimas modificadoras de histonas, além de outras alterações nas proteínas associadas à cromatina (58). Atualmente são utilizados modelos genéticos, como por exemplo, silenciamento em modelo animal e estudos farmacológicos utilizando inibidores moleculares, mostrando a importância da metilação de histonas no desenvolvimento de células embrionárias e na carcinogênese. A metilação de histonas controla a expressão gênica, o splicing de RNA e os processos de dano e reparo no DNA, e caso desregulada pode desencadear a oncogênese. Portanto, a metilação nas histonas vem se mostrando como um alvo terapêutico interessante em algumas doenças, incluindo o câncer (58,59).

Metiltransferases proteicas são enzimas que transferem grupos metil (CH_3) da S-adenosil metionina (SAM) para resíduos de arginina ou lisina no lado nucleofílico da cadeia de proteínas. A metilação pode tanto compactar a cromatina, impedindo a transcrição, quanto descompactá-la, permitindo a atividade gênica. O domínio SET está presente em famílias de proteínas que metilam resíduos de lisinas em histonas. Originalmente este domínio foi identificado como um domínio compartilhado por três proteínas de *Drosophila melanogaster* envolvidas em processos epigenéticos: supressor de variação [suppressor of variegation -

Su(var)3-9 -, em inglês], potenciador de zeste [enhancer of zeste - E(z) -, em inglês] e tritorax (trithorax, em inglês) – formando com as iniciais dessas proteínas o acrônimo SET. Assim, tal domínio catalisa a adição de grupos metil à resíduos de aminoácidos (60,61). Todas as metiltransferases de lisinas de histona (KMTases), com uma exceção, catalisam a transferência do grupo metil por meio deste domínio conservado de aminoácidos SET. Nos seres humanos a metilação ocorre na histona H3: H3K4, H3K27, H3K36 e H3K79, e na histona 4: H4K20 (58). A metilação em resíduos de lisina distintos nas histonas está relacionada a estados distintos de expressão. A metilação das lisinas H3K9, H3K27 e H4K20 leva ao silenciamento gênico enquanto a metilação de H3K4, H3K36 ou H3K79 leva à transcrição gênica (62,63).

A classe de HMTases SET é capaz de mono, di, ou trimetilar resíduos de lisina nas histonas. Inicialmente, pensou-se que sua atividade catalítica era específica para as lisinas, sendo promovida pela presença do domínio conservado SET nessas proteínas. Porém, observou-se que a maioria das proteínas contendo domínio SET nem sempre atua com atividade de metiltransferases em histonas, desempenhando também funções essenciais em substratos não histonas. Alguns exemplos são a metilação de SOX2, p53, HIF-1a e b-catenina por SETD7, com funções na regulação e estabilidade do genoma e atividades de localização subcelular. Outras metiltransferases como EZH2, G9a, SMYD2 e SMYD3 também apresentam a capacidade de metilar proteínas não histonas, e dentre estas, algumas agem em fatores de transcrição, supressores tumorais e vias de sinalização diversas.

As alterações provocadas pela metilação e outras modificações das histonas estão ligadas com a biologia de lesões cancerígenas, sendo que as modificações das histonas têm alta complexidade e atuam na regulação da transcrição gênica, processo conhecido como “código das histonas”. Portanto, elucidar esses processos que envolvem as modificações das histonas nos permitirá entender melhor como os genes são expressos em pessoas saudáveis e doentes, como por exemplo, em pacientes com câncer (57,64,65).

Em relação à epigenética, no CCEO ocorre um alto nível de H3K27me3 que tem papel na progressão tumoral e influência na sobrevida livre da doença. Também foi observada H3K4me3 com níveis diminuídos e H3K4me2 com níveis elevados. Ademais, foi relatado que as modificações das histonas têm relação com a família Polycomb-group (PcG) que atua na remodelação da cromatina e regulação da transcrição, e o gene *EZH2* que faz parte desta família, foi observado com expressão aumentada em linhagens celulares de CCEO quando comparado com linhagens celulares normais. Por fim, também foi observada uma alta expressão do gene *SUV39H1*, que juntamente com o aumento de *EZH2* estão associados a uma menor sobrevida, mostrando potencial para serem usados como marcadores prognósticos no carcinoma de células escamosas oral (66). Porém, ainda é necessário um maior entendimento do papel das metiltransferases de histonas na patogênese do câncer oral.

1.3 Família SETD

A família *SETD* de metiltransferases desempenha um papel importante na manutenção da cromatina e na transcrição gênica, embora o seu papel na regulação das funções celulares normais e na carcinogênese ainda não tenha sido completamente caracterizado. Os 10 genes que constituem a família *SETD* que codificam proteínas com domínio SET, são: *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR*. Estudos têm mostrado desregulação desses genes nos cânceres de próstata, adenocarcinoma ductal pancreático, câncer de mama e câncer de pulmão (64,67). O quadro 1 traz de forma resumida os 10 genes da família *SETD*, com suas localizações cromossômicas, ações enzimáticas conhecidas, provável função, alguns alvos e mecanismos conhecidos, as alterações encontradas em alguns cânceres e as referências.

Quadro 1 – Perfil dos genes da família *SETD*.

GENE	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	AÇÃO ENZIMÁTICA	PROVÁVEL FUNÇÃO	ALVOS E MECANISMOS	ALTERAÇÕES NO CÂNCER	REFERÊNCIAS
<i>SETD1A</i>	16p11.2	H3K4me1,2,3	Gene Oncogênico. Modula proliferação, invasão e migração celular.	Regula FOXM, miR205, ZEB1, Ki67, HIF1 (promovendo glicólise).	Expressão de mRNA aumentada no câncer de próstata, carcinoma hepatocelular e no câncer de pulmão.	68,69,70
<i>SETD1B</i>	12q24.31	H3K4me3	Gene Supressor Tumoral. Regula transcrição gênica. Remodelação da cromatina.	Interage com p53. É regulado pelo gene ZEB1.	Mutações somáticas e expressão de proteína diminuída em pacientes com câncer neuroendócrino hepático primário. Expressão de mRNA aumentada em câncer colorretal.	71,72

SETD2	3p21.31	H3K36me1,2,3	Gene Supressor Tumoral. Associado ao prognóstico.	Via de sinalização MAPK, PI3K-Akt, Ras, Rap1, HIF1, Wnt, AMPK, Fox0, ErbB, P53, JAK-STAT.	Expressão de mRNA perdida no câncer de mama e de orofaringe. Mutação e perda da função nos cânceres: renal, gastrointestinal, pulmonar e pancreático.	73,74,75
SETD3	14q32.2	H3K4, H3K36	Gene Oncogênico no câncer renal e câncer de mama. Supressor Tumoral no câncer de cólon. Possível marcador no diagnóstico do câncer renal e subtipos específicos de câncer de mama.	Regulação do ciclo celular, da apoptose, e danos no DNA. Interage e ativa o gene <i>TP53</i> . Regula o gene β - <i>Actina</i> , metilação FOXM1.	Expressão de mRNA aumentada no câncer renal e de mama, porém, no câncer de mama sua alta expressão está associado a melhor sobrevida do paciente. No câncer de cólon apresenta-se com expressão de mRNA diminuída.	76,77,78
SETD4	21q22.13	H4K20me3	Gene Oncogênico Regulação da estrutura da cromatina, expressão gênica, catalisando a metilação de proteínas histonas e com papel na proliferação celular.	Fusão oncogênica com <i>TMPRSS2</i> no câncer de próstata, <i>FTCD</i> em carcinoma ductal invasivo, <i>KIAA1958</i> em câncer de ovário e <i>B4Galt6</i> em câncer escamoso do pulmão. Auxilia na formação da heterocromatina na via de catálise H3K20me3. É importante na quiescência em células tronco cancerígenas.	Exclusão de <i>SETD4</i> em camundongos aumenta a sobrevivência nos linfomas T induzidos por radiação. Expressão elevada em células tronco quiescentes de câncer de mama.	79,80,81
SETD5	3p25.3	H3k36me3	Gene Oncogênico	Associação com <i>KRAS</i> , regulação da cromatina, regulação via de sinalização MAPK, <i>GSTT1</i> e <i>PDK4</i> .	Expressão aumentada de mRNA e proteína em adenocarcinoma ductal pancreático, levando à resistência à terapia. Alta taxa de mutação, e superexpressão gênica parece associada ao câncer colorretal acompanhando câncer gástrico	82,83
SETD6	16q21	H2AK5, H3K14me1, H4K5, H4K12.	Gene Oncogênico. Progressão do câncer, migração,	Associação com <i>VIM</i> , que regula doenças mesenquimais de	Apresenta expressão aumentada em câncer de mama.	84,85

		H4K16 H4K31	e adesão e sinalização celular e metástase.	transição. Interage e metila o gene <i>PAK4</i> e ativa a via Wnt/ β -catenina, inibindo a adesão celular. Aumentação a migração celular.		
SETD7	4q28	H3K4me1	Gene Supressor Tumoral. No câncer de bexiga inibe progressão da doença e metástase. Gene Oncogênico no adenocarcinoma de pulmão, propiciando a proliferação, migração e invasão do tumor.	Interage com o gene <i>KLF4</i> . É regulado por miR-641. Regula o lncRNA LINC01194.	Expressão de mRNA diminuída no câncer de bexiga. Expressão de mRNA aumentada no adenocarcinoma de pulmão.	86,87
SETD8	12q24.31	H4K20me1	Gene Oncogênico. Aumenta a proliferação celular e inibe a apoptose. Promove proliferação no câncer de pâncreas, além de regular a transcrição gênica, progressão do ciclo celular e manutenção do genoma e interagir com STAT3. Progressão e ciclo celular, replicação e reparo do DNA no câncer de pulmão.	Inibe p53 por metilação no câncer de ovário. Inibe a via de sinalização <i>p-ERK1/2</i> devido a metilação do promotor de <i>DUSP10</i> .	Expressão elevada de mRNA e proteína no carcinoma seroso de ovário de alto grau. Expressão aumentada de mRNA no adenocarcinoma pancreático. Expressão aumentada de mRNA no câncer de pulmão.	88,89,90
SETMAR	3p26.1	H3K4me2, H3K27me3, H3K36me2	Gene Oncogênico no Glioblastoma. Gene Supressor Tumoral no câncer de bexiga. Reparo de DNA, induz apoptose e suprime a metástase no câncer de bexiga	Regulação e reparo de junção de extremidade não-homóloga (NHEJ). É regulado pelo gene <i>NONO</i> .	Expressão elevada de mRNA no glioblastoma, onde knockdown genético gera senescência irreversível em células resistentes a radiação, evitando a recorrência do glioblastoma. Apresenta expressão de mRNA diminuída no câncer de bexiga.	91,92

2. JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços na área de oncologia, a incidência e prevalência do câncer oral continuam elevadas e com uma taxa de sobrevida de 5 anos. Nos últimos anos, não teve uma melhora significativa nestas taxas, devido ao diagnóstico em estágios avançados, o que leva a um prognóstico desfavorável e dificulta o tratamento.

Ainda não foi possível definir marcadores moleculares para o câncer oral, que possibilitem prever o comportamento de uma lesão maligna ou detectar precocemente uma lesão com potencial de malignização ou a resposta de um tumor a determinada terapia. Como o uso de biomarcadores pode ser uma ferramenta útil no manejo clínico dos pacientes com câncer oral, esta é uma área de pesquisa que tem recebido muita atenção

Considerando a evidência da expressão desregulada de enzimas metiltransferases de histona em diversos tipos de câncer, espera-se com este estudo encontrar modificações no padrão de expressão das metiltransferases proteicas *SETD*, que ainda não foram descritas no câncer oral. O achado de novas alterações possibilitará a avaliação de uma eventual importância na determinação diagnóstica, prognóstica ou terapêutica dos pacientes, bem como na própria patogênese do câncer oral, podendo levar ao desenvolvimento de estratégias inovadoras para o manejo clínico destes pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a expressão dos genes da família *SETD* de metiltransferases de histonas no câncer oral, buscando identificar possíveis novos alvos terapêuticos e potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de expressão dos 10 genes da família *SETD* em amostras tumorais cirúrgicas frescas de pacientes com câncer oral, comparando-as com amostras de tecido adjacente normal;
- Determinar o perfil de expressão dos 10 genes da família *SETD* em linhagens celulares de câncer oral e comparar com a expressão das amostras dos pacientes com câncer oral.
- Correlacionar o perfil de expressão gênica com características específicas dos pacientes,

como: idade, recidivas, metástases e estadiamento do tumor;

- Determinar por análise *in silico* o perfil de expressão dos 10 genes e proteínas da família *SETD* em dados disponíveis em plataformas online.

4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 Sujeitos

Foram utilizadas 87 amostras cirúrgicas frescas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), seguindo os padrões éticos e de acordo com a aprovação do CEP local, sob o número de registro 9371/2003.

Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB para apreciação e aprovado sob o número de registro 24/12.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo celular

As linhagens celulares de carcinoma oral SCC3, SCC9, SCC25 e Cal27 e a linhagem celular de queratinócitos normais humanos HacaT foram cultivadas no meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium – Sigma) suplementado com soro fetal bovino 10% e penicilina e estreptomicina (1%). Todas as linhagens foram mantidas na estufa umidificada com CO₂ a 5% e temperatura de 37°C. As características biológicas dessas linhagens celulares estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características biológicas das linhagens celulares (93).

LINHAGENS	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS				OBSERVAÇÕES
	Sítio	Idade	Sexo	Estadio TNM	
SCC3	Metástase Linfonodal	64	M	-	Obtida do Japan Health Science Research Resources Bank (Tóquio). O tumor primário era na língua, com metástase linfonodal. Tratava-se de um CCE moderadamente diferenciado.
SCC9	Língua	25	M	T2N1	O paciente que deu origem a essa linhagem não realizou tratamento previamente à biópsia (NRT). Comparada à SCC25, SCC4 e Cal27, essa linhagem demonstrou maior

					resistência a cisplatina. Morfologia de célula epitelial; fracas colônias.
SCC25	Língua	70	M	T1N1M0	NRT. Comparada à SCC15, essa linhagem possui um maior potencial de invasão. Morfologia de células epiteliais; colônias densas.
CAL27	Língua	56	M	-	NRT, isolada de paciente com CCE pobremente e/ou não diferenciado
HACAT	Pele	-	-	-	<i>Human adult low calcium high temperature cells (HaCaT) é uma linhagem celular de queratinócitos aneuploides imortais, espontaneamente transformados, derivada de pele de adulto humano que possui características de queratinócitos da epiderme basal. É uma linhagem atualmente utilizada como controle não tumoral.</i>

4.2.2 Extração do RNA total e síntese de DNA complementar

As amostras clínicas de pacientes foram maceradas com o auxílio do equipamento ULTRA-TURRAX® modelo T10B (IKA – EUA). Após a maceração completa da amostra, foi feita a extração de RNA total utilizando o kit AllPrep DNA/RNA (Qiagen), conforme orientações do fabricante. A extração de RNA total das linhagens celulares foi feita com o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

A quantificação e o grau de pureza dos RNAs extraídos foram determinados por espectrometria, utilizando-se o aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare - Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido) com o intuito de, posteriormente, garantir qualidade da amostra para uma síntese eficiente de DNA complementar. A quantificação foi realizada no comprimento de onda de 260nm e expressa em µg/µL.

A transcrição reversa do RNA para síntese do cDNA foi realizada utilizando 1µg de cada RNA, tratado com DNase I (Sigma-Aldrich - St. Louis, MO, EUA), de acordo com protocolo do fabricante, a fim de eliminar qualquer resíduo de DNA genômico. Imediatamente após este tratamento, o RNA foi utilizado para síntese de cDNA com o kit *The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.3 PCR quantitativa em tempo real

Para a análise da expressão dos genes *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD5*, *SETD6*, *SETD7*, *SETD8* e *SETMAR*, o cDNA das amostras foi submetido à técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

Os ensaios (iniciadores e sondas) utilizados para tais genes e para o gene constitutivo β -actina são ensaios inventoriados com o sistema Taqman® (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) (Quadro 2) e foram testados e padronizados, usando-se o termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA). O gene endógeno β -actina foi usado para a normalização das amostras.

Quadro 2. Ensaios para análise da expressão gênica por qPCR.

Gene	Ensaio
<i>SETD1A</i>	Hs00322315_m1
<i>SETD1B</i>	Hs00902716_m1
<i>SETD2</i>	Hs01014784_m1
<i>SETD3</i>	Hs01119427_m1
<i>SETD4</i>	Hs00213731_m1
<i>SETD5</i>	Hs00216962_m1
<i>SETD6</i>	Hs00227507_m1
<i>SETD7</i>	Hs00363902_m1
<i>SETD8</i>	Hs00360662_m1
<i>SETMAR</i>	Hs00538177_m1
β -actina	Hs99999903_m1

Para cada reação de qPCR em tempo real, utilizou-se 2,5µL de água ultrapura, 5µL de MasterMix Universal Taqman® (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), 0,5µL do ensaio (iniciadores e sonda) (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA) e 2µL de amostra de cDNA, totalizando 10µL de volume final. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems - Life Technologies - Carlsbad, CA, EUA), em duplicata para cada amostra. As condições foram: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

Para fazer as análises utilizando os dados brutos da qPCR em tempo real, os dados gerados pelo equipamento foram organizados em uma tabela utilizando o programa Excel, com o objetivo de determinar o $\Delta\Delta Cq$ conforme o modelo matemático de Pfaffl (2001) (94), sendo que o Cq (*Quantification Cycle*) representa o ciclo da reação de PCR em que a amplificação do produto está na fase exponencial. A média dos Cq s para os genes *SETD* de cada amostra, tumorais e normais, foi calculada e normalizada por subtração do valor da média dos Cq s para o gene endógeno (β -actina) co-amplificado, gerando o valor de ΔCq (Cq gene de interesse – Cq gene endógeno). O ΔCq de cada amostra foi subtraído do ΔCq das medianas das amostras normais (referência normal), gerando o valor de $\Delta\Delta Cq$. A quantidade do gene-alvo, normalizada com um

gene endógeno e relativa ao calibrador (referência normal) foi convertida em quantificação relativa (QR) pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$.

4.2.4 Análise *in Silico*

Todas as plataformas de acesso livre aqui descritas foram utilizadas para explorar dados online para comparar com os resultados deste estudo. Foi realizada a pesquisa apenas dos genes que apresentaram alguma alteração de expressão em algum contexto clínico deste estudo.

A plataforma The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>), é uma base de dados de acesso livre utilizada para encontrar, dentre outras informações, identificação da localização subcelular da proteína e o perfil de expressão de proteínas pela técnica de imuno-histoquímica, dentre variados tecidos humanos normais e de câncer.

Também foi acessada a plataforma UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>), um recurso interativo que facilita a consulta e análise de diversos dados brutos disponibilizados no The Cancer Genoma Atlas (TCGA). Esta plataforma usa dados de 31 tipos de câncer oriundos de experimentos de RNA-seq, auxiliando analisar a expressão relativa de um gene em amostras normais e tumorais, em diferentes subgrupos do tumor, associados aos estágios do câncer e características clínicas, além de avaliar o efeito da expressão gênica e características clínico-patológicas dos pacientes na sobrevida (95).

Foi acessada a plataforma Oncomine (<https://www.oncomine.org>), da Thermo Fisher Scientific, Ann Arbor, MI, EUA, que utiliza dados de expressão gênica de microarranjo. Para o acesso dos dados, foram utilizados os seguintes parâmetros de pesquisa: “*SETD5*” e “*SETMAR*” (gene), “cancer vs. normal analysis” (para tipo de análise) e “Head and Neck Cancer” (tipo de câncer), “mRNA” (Tipo de Dado).

4.2.5 Análise estatística

Para a análise de dados da quantificação relativa (QR), quanto à distribuição normal utilizou-se o teste Shapiro-Wilk, e após realizou-se o teste estatístico de Mann-Whitney para amostras não paramétricas e independentes (amostras normais x tumorais). Tanto para a análise estatística como para a criação dos gráficos foi utilizado o programa *GraphPad Prism*® versão 8.0.2, considerando-se o resultado do teste estatisticamente significativo quando o valor de $p < 0,05$.

4.2.5.1 Associação entre a expressão gênica e os dados clínicos dos pacientes

Foi realizada a associação dos dados clínicos dos pacientes com o resultado da expressão gênica. Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários de cada paciente após a coleta das amostras. Dados como: idade, gênero, tratamento, estágio da doença, localização anatômica e presença ou ausência de recidiva e metástase do tumor, foram associados com o nível de expressão dos genes para cada paciente analisado. Foi usado o teste estatístico de Mann-Whitney para amostras não paramétricas e independentes (amostras tumorais).

4.2.5.2 Correlação entre expressão gênica

Foi realizada a correlação da expressão dos genes *SETD4* e *SETD5*, pois ambos se apresentaram com a expressão aumentada nos pacientes acima de 60 anos. Foi usado o teste estatístico de Correlação de *Spearman* para amostras não paramétricas e independentes (amostras tumorais).

5 RESULTADOS

5.1 Características clínico-patológicas dos pacientes

Inicialmente foram coletadas 42 amostras de câncer de boca e 45 amostras normais de pacientes diferentes, totalizando 87 amostras. Porém foram excluídas 36 amostras normais, e os principais motivos foram: quantidade insuficiente de RNA e/ou a não expressão do gene endógeno (*β -actina*) no ensaio de expressão gênica, o que indica possível degradação das amostras.

As informações com as características clínicas e patológicas dos participantes do estudo, incluindo gênero, idade, tratamento, estágio da doença, localização anatômica e presença ou ausência de recidiva e metástase do tumor estão resumidas na tabela 3.

A idade média dos pacientes foi de 55 anos, com o paciente mais novo apresentando 36 anos e o mais idoso 83 anos. A maioria dos pacientes era homem (N=38), e apenas 4 eram mulheres. Com base nos prontuários, observou-se que 18 pacientes realizaram a cirurgia e a radioterapia, 15 pacientes fizeram apenas a cirurgia e 9 pacientes realizaram a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Em relação ao estadiamento do tumor, os estágios II e IV foram os mais representativos, com 26,19% e 23,8%, respectivamente, e com 14 pacientes sem dados disponíveis. Quanto a localização anatômica do tumor, o assoalho da boca e a língua foram as áreas mais representativas, correspondendo a 45,23% e 40,47%, respectivamente. Analisando

presença e ausência de recidiva, observou-se que 20 pacientes apresentaram recidiva, 16 pacientes não tiveram recidiva e 6 pacientes perderam o acompanhamento. Também analisou-se a presença e ausência de metástase, com 20 pacientes com a presença de metástase, 16 pacientes com ausência de metástase e 6 pacientes que perderam o acompanhamento (Tabela 2).

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos 42 pacientes com câncer oral.

Variáveis	Classificação	Nº de Pacientes	Porcentagem (%)
Gênero	Masculino	38	86,36
	Feminino	4	13,64
Idade			
Média	55		
Faixa	36-83		
	36 a 46 anos	7	16,66
	47 a 57 anos	20	47,61
	58 a 68 anos	11	26,19
	69 a 79 anos	3	7,14
	80 a 83 anos	1	2,38
Tratamento	Somente cirurgia	15	35,71
	Cirurgia e radioterapia	18	42,85
	Cirurgia, radioterapia e quimioterapia	9	21,42
Estágio da Doença	Estágio I	5	11,9
	Estágio II	11	26,1
	Estágio III	2	4,7
	Estágio IV	10	23,8
	N/A*	14	33,3
Localização	Assoalho da boca	19	45,23
	Língua	17	40,47
	Gengiva	3	7,14
	Outros	3	7,14
Recidiva	Sim	20	47,61
	Não	16	38,09
	N/A*	6	14,28
Metástase	Sim	20	47,61
	Não	16	38,09
	N/A*	6	14,28

*N/A, Não Avaliado

5.2 Expressão relativa dos genes da família *SETD* em linhagens celulares de câncer oral

Foi avaliada a expressão dos 10 genes da família *SETD* nas seguintes linhagens celulares humanas: Hacat (células de queratinócitos normais) e em 4 linhagens de câncer oral, SCC3, SCC9, SCC25 e Cal27. As características biológicas dessas linhagens celulares estão descritas na Tabela 1. Observou-se que todos os genes estavam expressos em todas as linhagens, porém mostrando um perfil de expressão gênica bastante heterogêneo.

Para os genes *SETD1A*, *SETD1B* e *SETD2*, as linhagens SCC3 e SCC9 apresentaram expressão gênica diminuída em comparação ao queratinócito normal (Hacat), e as linhagens SCC25 e Cal27 apresentaram expressão aumentada em comparação com a Hacat (Figura 5).

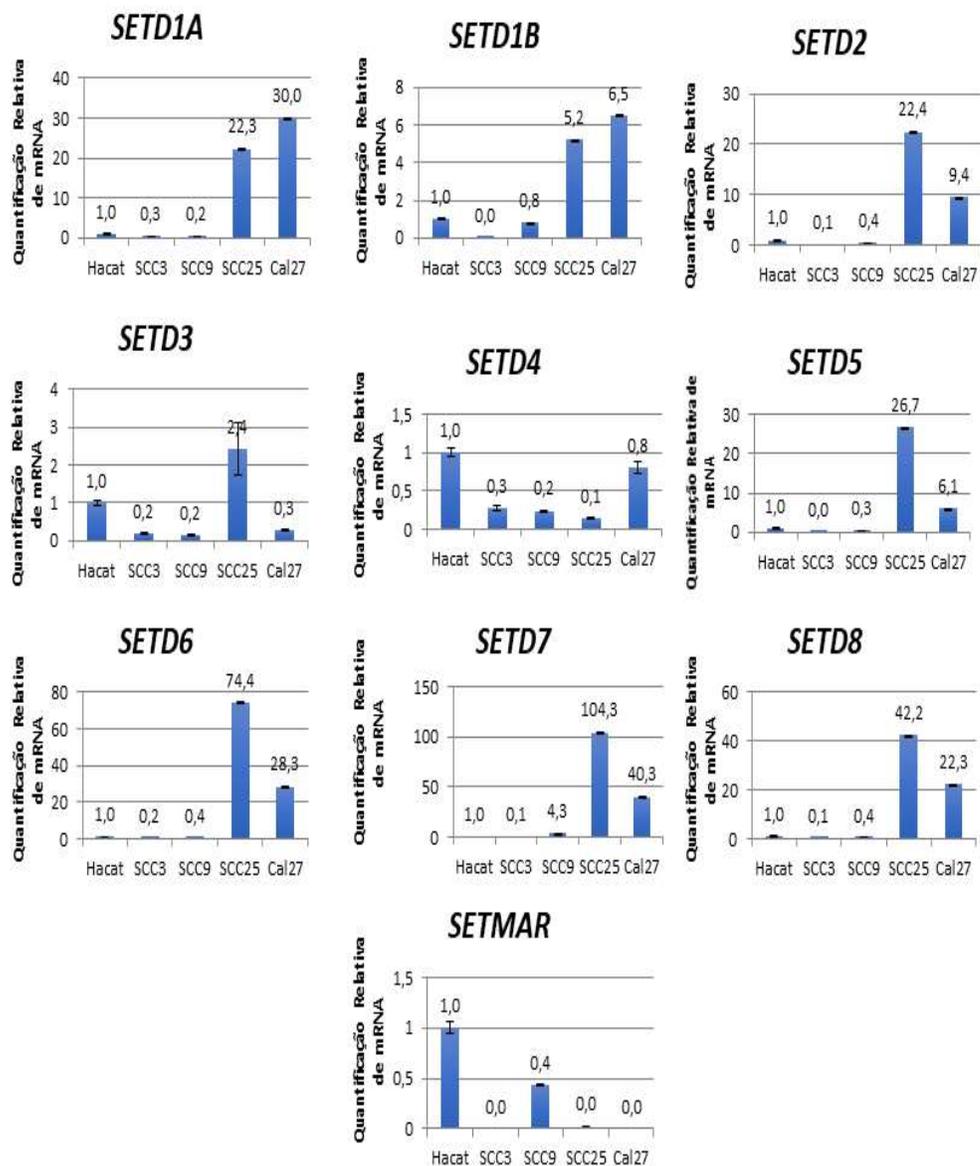


Figura 5: Análise da família SETD, utilizando qPCR em 4 diferentes linhagens de células de câncer oral, comparando com a expressão de Hacat (Controle) (Média das replicatas e desvio padrão).

Para o gene *SETD3*, as linhagens SCC3, SCC9 e CAL27 apresentaram expressão gênica diminuída em comparação ao queratinócito normal (Hacat), no entanto SCC25 apresentou maior expressão em comparação com a Hacat. Para o gene *SETD4*, as linhagens celulares SCC3, SCC9 e SCC25 estavam com expressão diminuída e a CAL27 não apresentou diferença de expressão. Os genes *SETD5* e *SETD6* apresentaram expressão diminuída nas linhagens SCC3 e SCC9 e

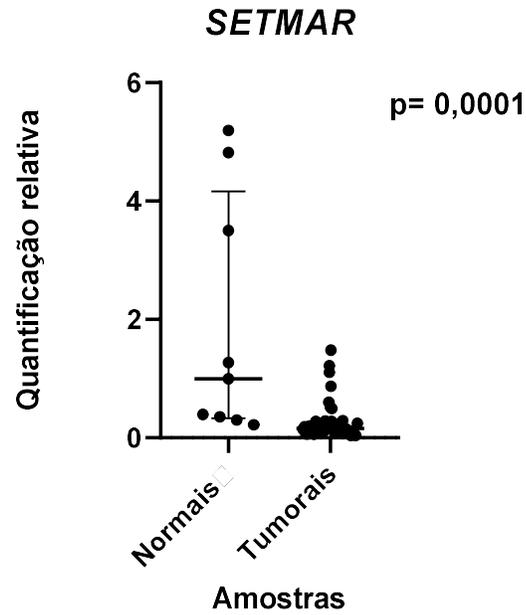
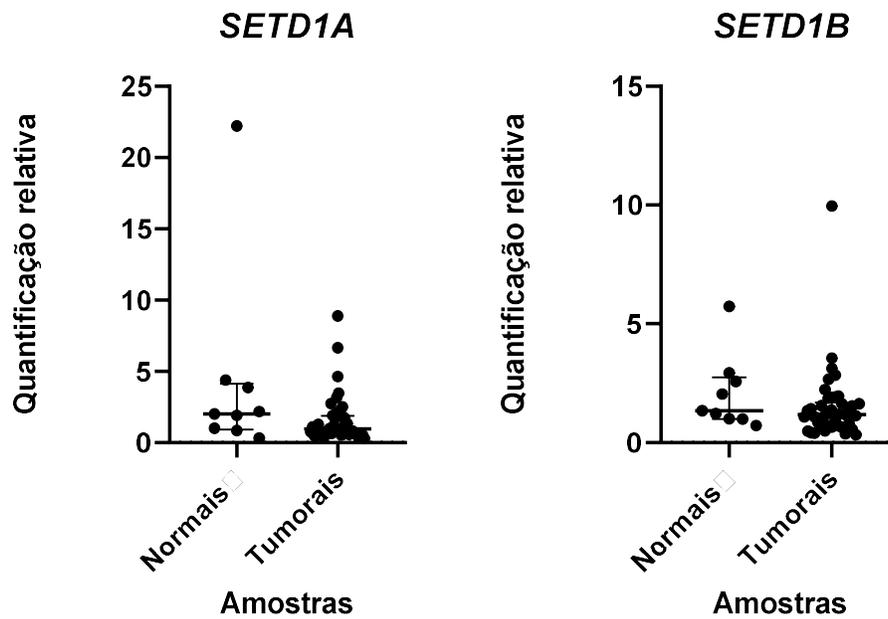
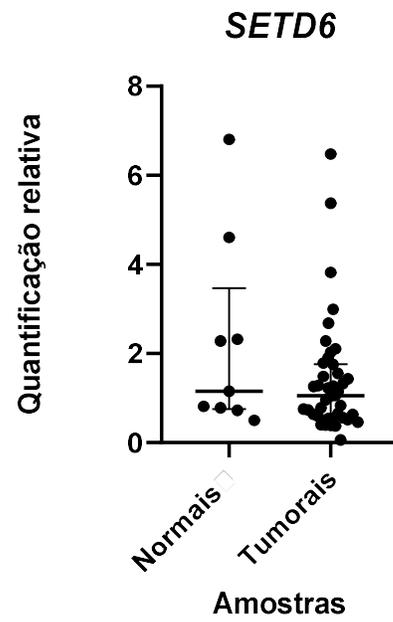
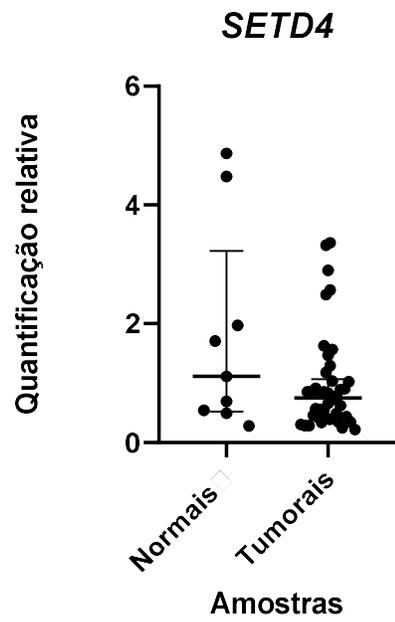
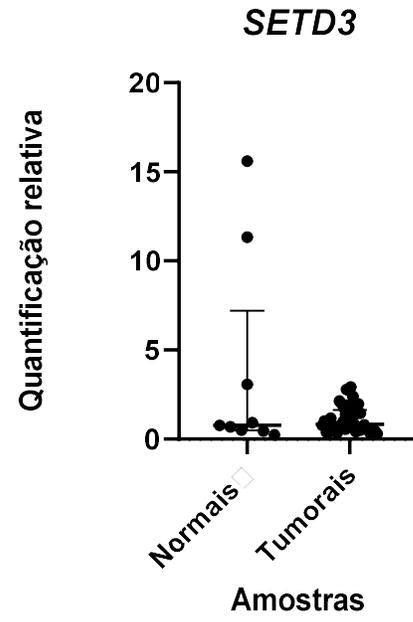
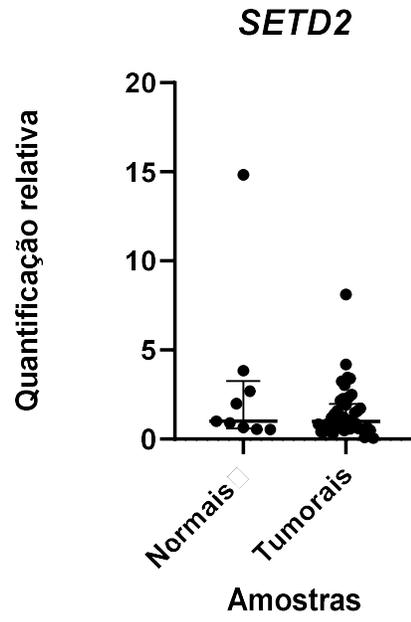


Figura 7: Expressão de *SETMAR* entre tecido normal e tumoral. Os intervalos estão representados pela mediana com seus respectivos intervalos interquartílicos. Teste de Mann-Whitney, $p=0,0001$.

Os genes *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD6*, *SETD7* e *SETD8* não apresentaram expressão com diferenças significativas entre as amostras tumorais e normais (Figura 8).





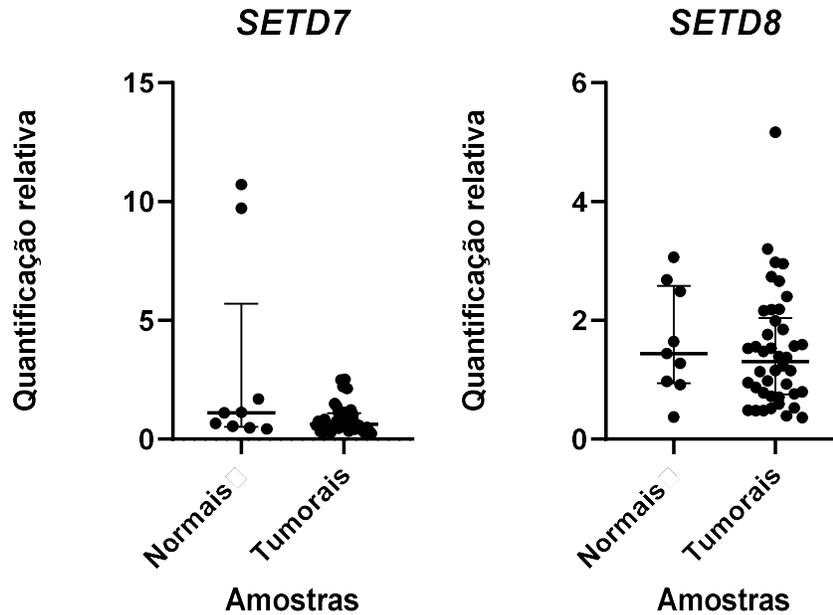


Figura 8: Expressão de *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD6*, *SETD7* e *SETD8* entre tecido normal e tumoral. Os intervalos estão representados pela mediana com seus respectivos intervalos interquartílicos. Teste de Mann-Whitney.

5.4 Expressão gênica associada aos dados clínicos dos pacientes

5.4.1 Idade

5.4.1.1 *SETD4* e *SETD5* hiperexpressos em tumores de pacientes com idade acima de 60 anos

As amostras tumorais foram estratificadas em dois grupos, pacientes de até 60 anos e os acima de 60 anos, baseado em estudos que relatam que no câncer oral a idade média para o diagnóstico é acima de 60 anos (104). Analisou-se a expressão gênica da família *SETD* comparando esses dois grupos. Observou-se que existe uma diferença de expressão para os genes *SETD4* e *SETD5*, ambos com expressão aumentada nos pacientes acima de 60 anos quando comparados com pacientes de até 60 anos (Figuras 9 e 10).

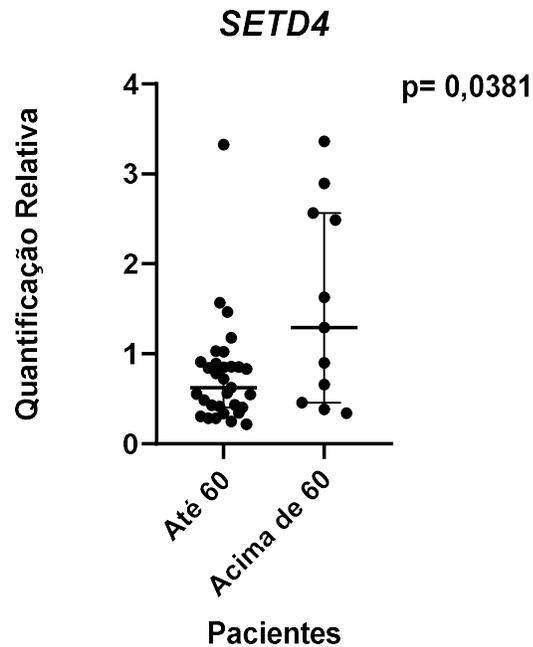


Figura 9: Expressão de *SETD4* associada à idade dos pacientes, (N= 31) pacientes até 60 anos, (N=11) pacientes acima de 60 anos. Os intervalos estão representados pela mediana com seus respectivos intervalos interquartílicos. Teste de Mann-Whitney, $p=0,0381$.

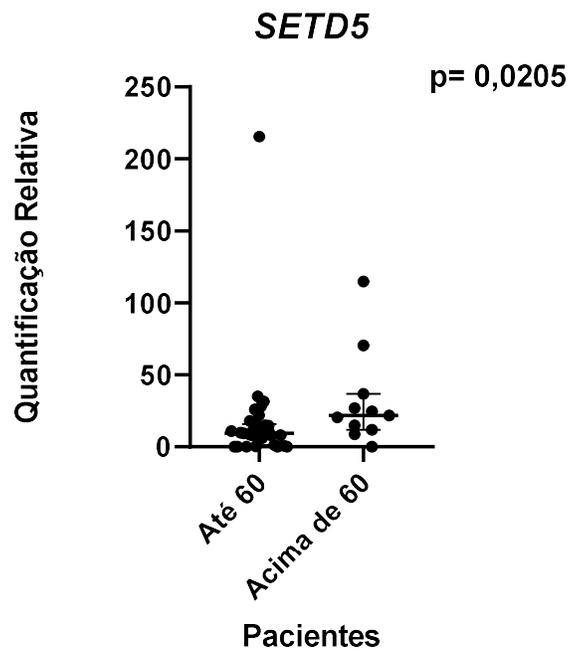


Figura 10: Expressão de *SETD5* associada à idade dos pacientes, (N= 31) pacientes até 60 anos, (N=11) pacientes acima de 60 anos. Os intervalos estão representados pela mediana com seus respectivos intervalos interquartílicos. Teste de Mann-Whitney, $p=0,0205$.

Em relação aos outros genes da família *SETD*, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos na comparação de idade dos pacientes de até 60 anos e os acima de 60 anos.

5.4.1.2 Correlação de expressão dos genes *SETD4* e *SETD5* em tumores de pacientes com idade acima de 60 anos

Foi realizada uma análise de correlação dos genes *SETD4* e *SETD5*, que se apresentaram com expressão aumentada nos pacientes acima de 60 anos. Observou-se que há uma correlação positiva moderada entre a expressão de *SETD4* e *SETD5* em pacientes com idade mais avançada (acima de 60 anos) com câncer oral (Figura 11).

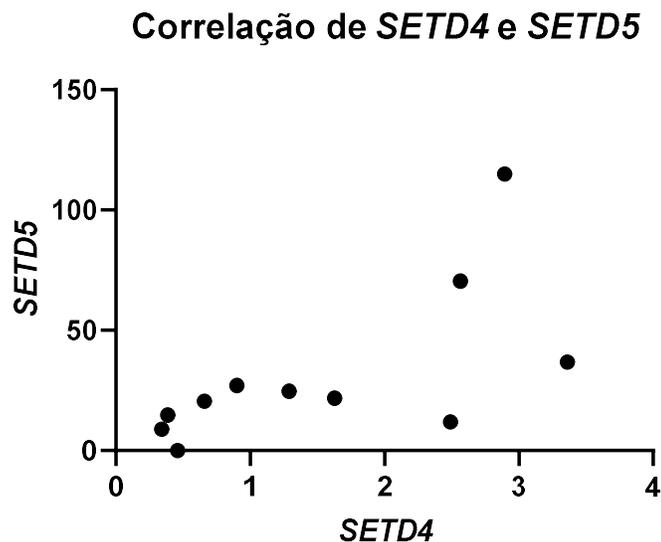


Figura 11: Correlação de expressão dos genes *SETD4* e *SETD5* em pacientes com idade mais avançada (acima de 60 anos), (N=11). Correlação de *Spearman*. Coeficiente de Correlação = 0,7636. P=0,0086.

5.4.2 Recidiva

As amostras tumorais foram divididas em 2 grupos, um que apresentava recidiva e o outro que não apresentava. Analisou-se a expressão gênica da família *SETD* comparando esses dois grupos, porém não foram encontrados resultados estatisticamente significativos.

5.4.3 Metástase

As amostras tumorais foram divididas em 2 grupos, um que apresentava metástase e o outro que não apresentava. Analisou-se a expressão gênica da família *SETD* comparando esses dois grupos, porém não foram encontrados resultados estatisticamente significativos.

5.4.4 Estadiamento

Avaliou-se a expressão gênica da família *SETD* associando-a com o grau de estadiamento dos tumores. As amostras foram separadas em 2 grupos, o primeiro grupo com os estádios até T3 que incluem (T0, T1, T2 e T3), e o segundo grupo com estádios maiores que T3 (T4a, T4b, T4c), que são considerados os estágios mais avançados da doença. Nenhum dos 10 genes analisados apresentou diferença de expressão estatisticamente significativa.

5.5 Análises *in silico*

5.5.1 Análise de dados no UALCAN

5.5.1.1 Análise de expressão gênica

Foi utilizada a plataforma UALCAN, que facilita o acesso aos dados do TCGA, para analisar a expressão dos genes *SETD5* e *SETMAR* entre amostras tumorais de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) e amostras de tecidos normais. Os genes *SETD5* e *SETMAR* apresentaram-se diferencialmente expressos, sendo que o *SETD5* mostrou expressão aumentada nos tecidos tumorais (N=520) em comparação aos tecidos normais (N=44) (Figura 12), e o *SETMAR* mostrou expressão diminuída nas amostras tumorais em comparação às normais (Figura 13).

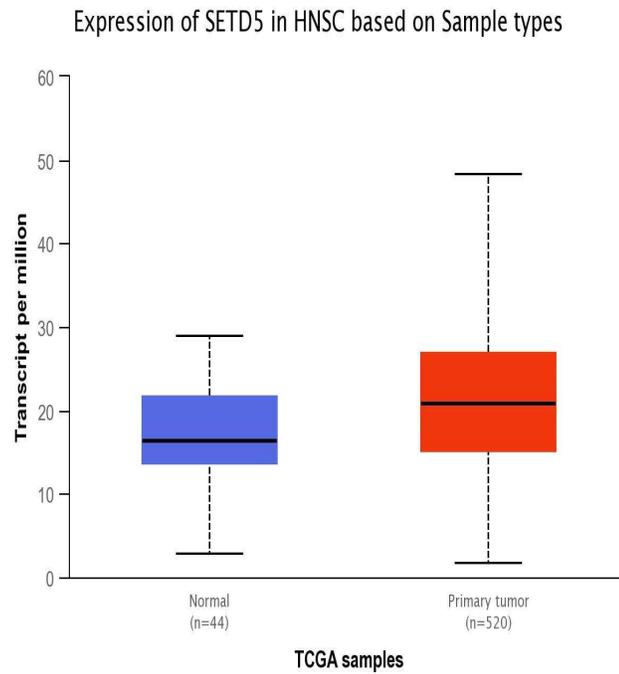


Figura 12: Expressão gênica de *SETD5* entre amostras de tecido normal e tumoral. Mediana das normais 16.325, mediana das tumorais 20.958, $p < 0,0001$ (96).

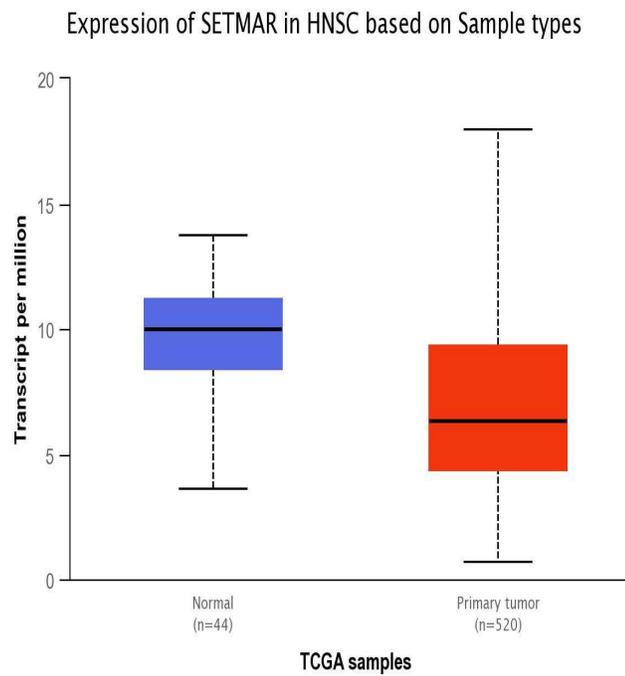


Figura 13: Expressão gênica de *SETMAR* entre amostras de tecido normal e tumoral. Mediana das normais 9.974, mediana das tumorais 6.305, $p < 0,0001$ (97).

5.5.1.2 Análise de sobrevida

Foi realizada análise de sobrevida, comparando-se os níveis de expressão gênica (alto ou baixo) apresentados pelos pacientes, utilizando o método de Kaplan-Meier que permite a visualização da sobrevida ao longo do tempo. A sobrevida, de acordo com a expressão do gene *SETD5* não apresentou diferença significativa (Figura 14), mas para o gene *SETMAR*, a sobrevida dos pacientes foi menor no grupo de baixa expressão, apresentando diferença significativa (Figura 15).

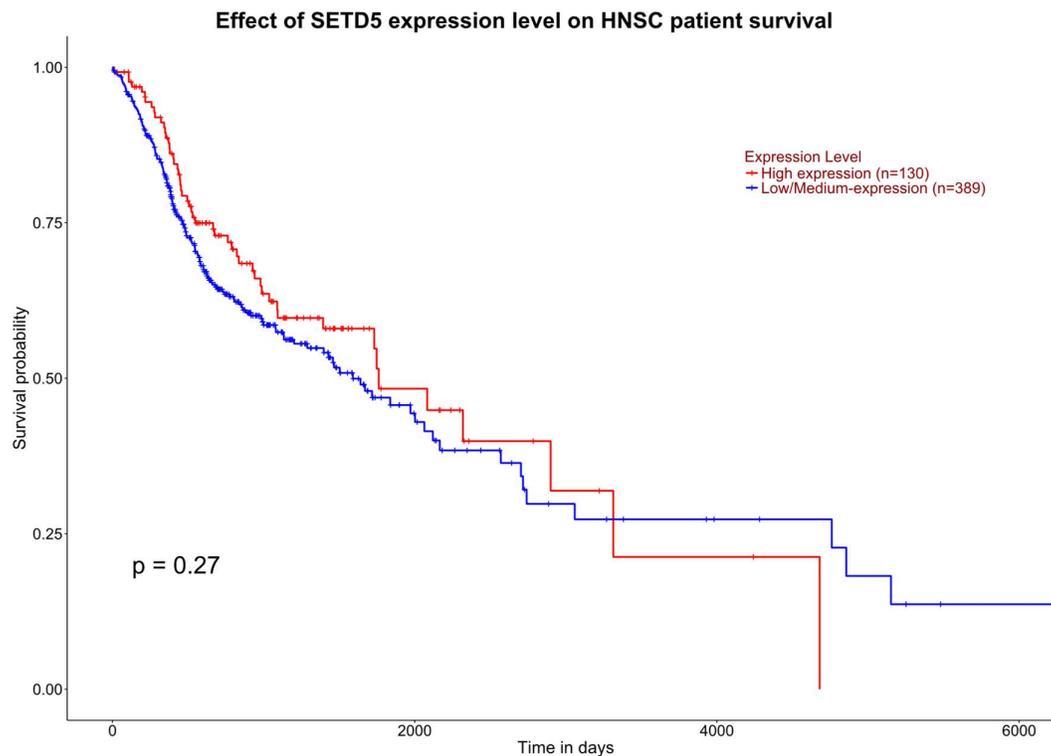


Figura 14: Curva de sobrevida de Kaplan-Meier de acordo com a expressão do gene *SETD5* utilizando o teste de Log-rank (98).

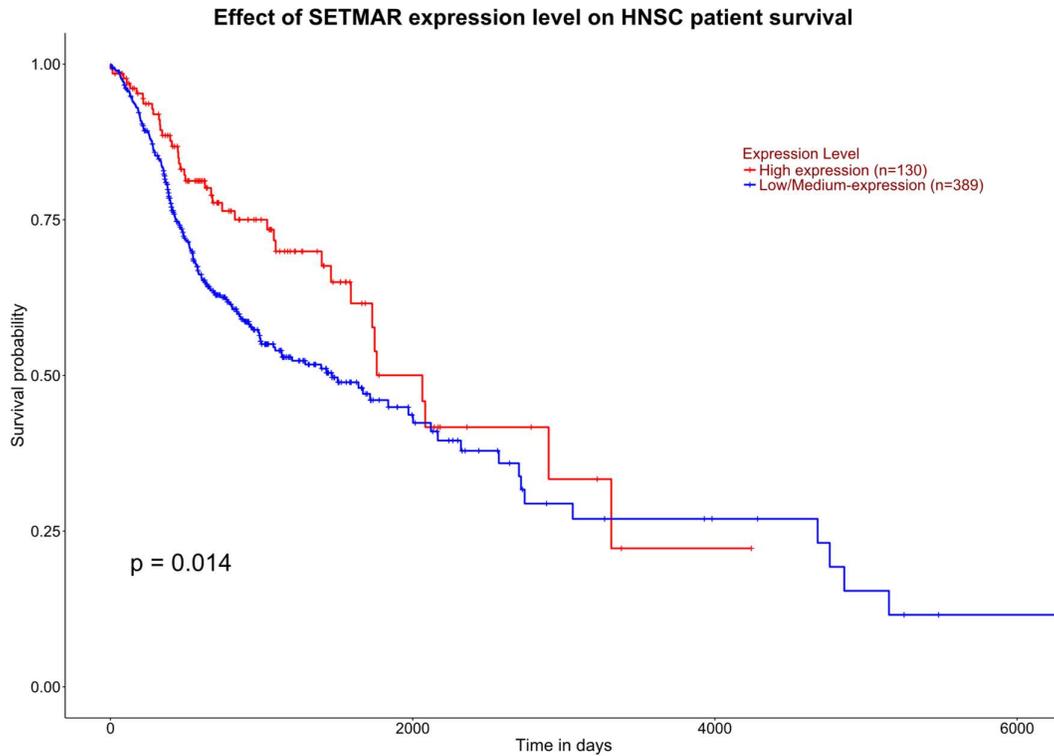


Figura 15: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de acordo com a expressão do gene *SETMAR* utilizando o teste de Log-rank (99).

5.5.1.3 Análise de expressão gênica em diferentes estágios do tumor

Foi analisada a expressão gênica de *SETD5* baseada nos estágios do tumor, e observou-se que o *SETD5* encontra-se com expressão aumentada significativamente nos estágios 1, 2, 3 e 4 do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, em comparação aos tecidos normais. Analisando a expressão gênica entre os diferentes estágios, não foram encontrados resultados significativos (Figura 16).

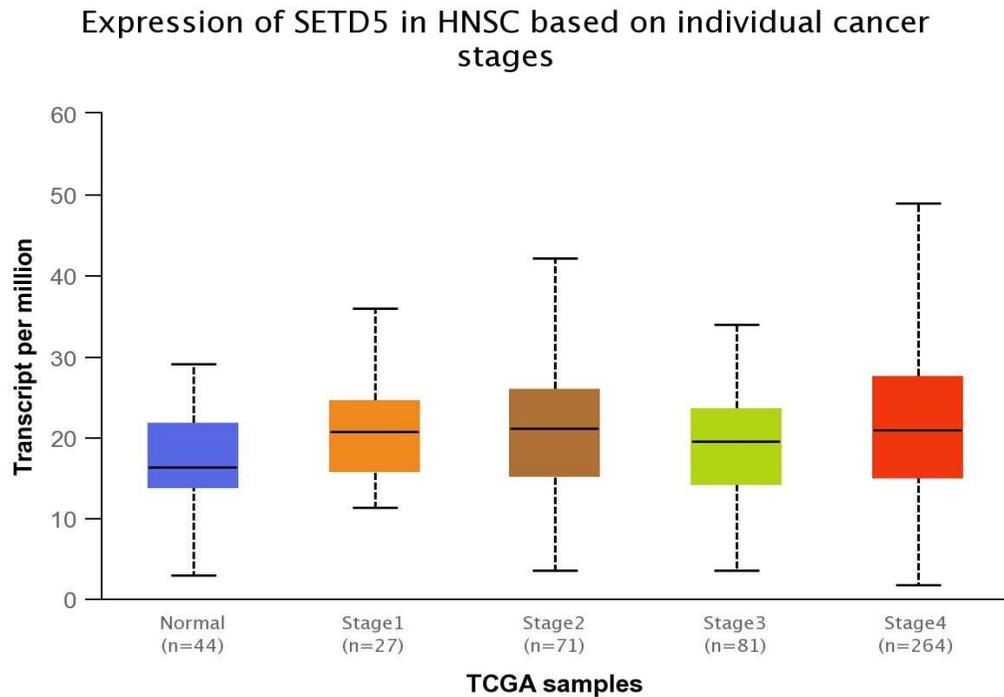


Figura 16: Expressão gênica de *SETD5* em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes estágios. Mediana das normais: 16.325, mediana do estágio 1: 20.667, mediana do estágio 2: 21.065, mediana do estágio 3: 19.596 e mediana do estágio 4: 20.968. Normal vs estágio 1, $p=0,0126$, normal vs estágio 2, $p=0,0005$, normal vs estágio 3, $p=0,0095$ e normal vs estágio 4, $p<0,0001$ (100).

A expressão gênica de *SETMAR* baseada nos estágios do tumor também foi analisada, e observou-se que *SETMAR* encontra-se com expressão diminuída significativamente nos estágios 1, 2, 3 e 4 do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, em comparação aos tecidos normais. Analisando a expressão gênica entre os diferentes estágios não foram encontrados resultados significativos (Figura 17).

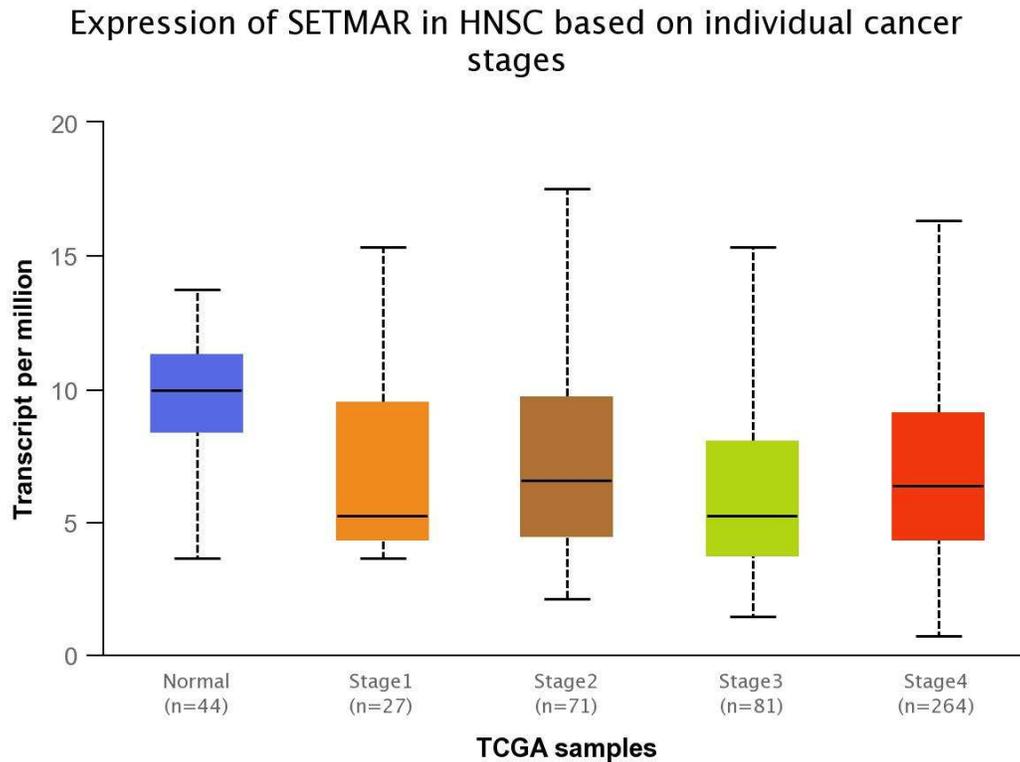


Figura 17: Expressão gênica de *SETMAR* em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes estágios. Mediana das normais: 9.974, mediana do estágio 1: 5.261, mediana do estágio 2: 6.573, mediana do estágio 3: 5.218 e mediana do estágio 4: 6.348. Normal vs estágio 1, $p=0,0045$, normal vs estágio 2, $p<0,0001$, normal vs estágio 3, $p<0,0001$ e normal vs estágio 4, $p<0,0001$ (101).

5.5.1.4 Análise de expressão gênica baseada na idade dos pacientes

A expressão gênica de *SETD4* baseada na idade dos pacientes foi analisada, e observou-se que o *SETD4* encontra-se com expressão aumentada, significativamente, nas faixas de 41-60 e 61-80 anos no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, em comparação aos tecidos normais, não apresentando resultado significativo nas faixas de 21-40 e 81-100 anos. Analisando a expressão gênica entre as diferentes faixas de idade, foram encontrados resultados significativos na comparação das faixas de 41-60 vs 61-80 anos e 41-60 vs 81-100 anos. Entre as outras faixas de idade não foram encontrados resultados significativos (Figura 18).

Expression of SETD4 in HNSC based on patient's age

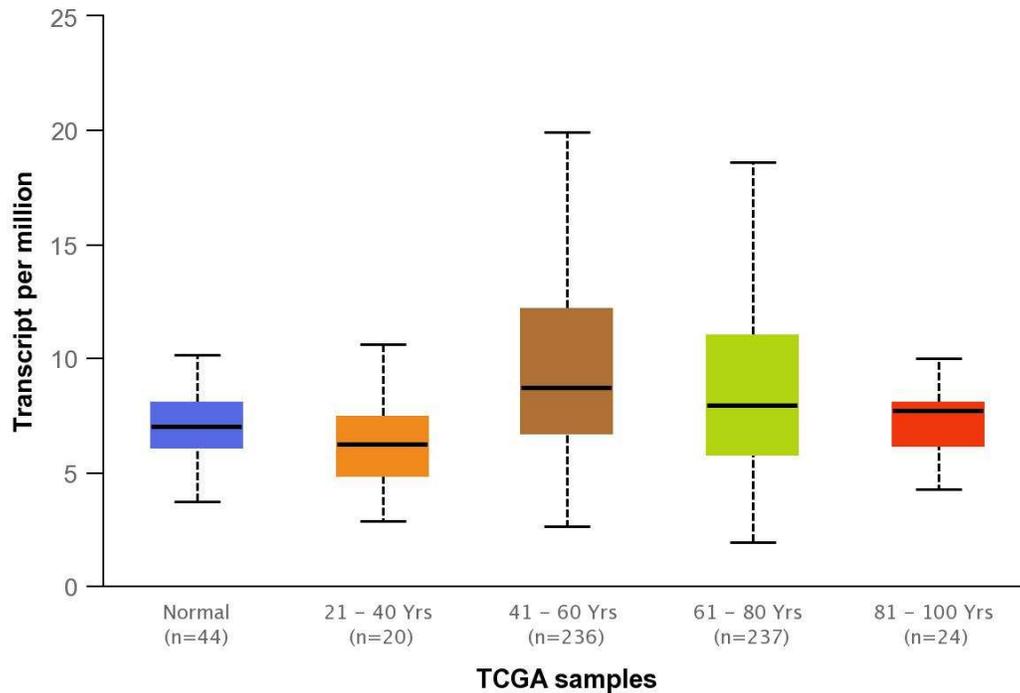


Figura 18: Expressão gênica de *SETD4* em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes faixas de idade. Mediana das normais: 6.95, mediana idade 21-40: 6.23, mediana idade 41-60: 8.701, mediana idade 61-80: 7.932 e mediana idade 81-100: 7.651. Normal vs idade 21-40, $p=0,2656$, normal vs idade 41-60, $p<0,0001$, normal vs idade 61-80, $p<0,0001$ e normal vs idade 81-100, $p=0,2288$ (102).

A expressão gênica de *SETD5* baseada na idade dos pacientes foi analisada, e observou-se que *SETD5* encontra-se com expressão aumentada, significativamente, nas faixas de 41-60, 61-80 e 81-100 anos no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, em comparação aos tecidos normais, não apresentando resultado significativo na faixa de 21-40 anos. Analisando a expressão gênica entre as diferentes faixas de idade não foram encontrados resultados significativos (Figura 19).

Expression of SETD5 in HNSC based on patient's age

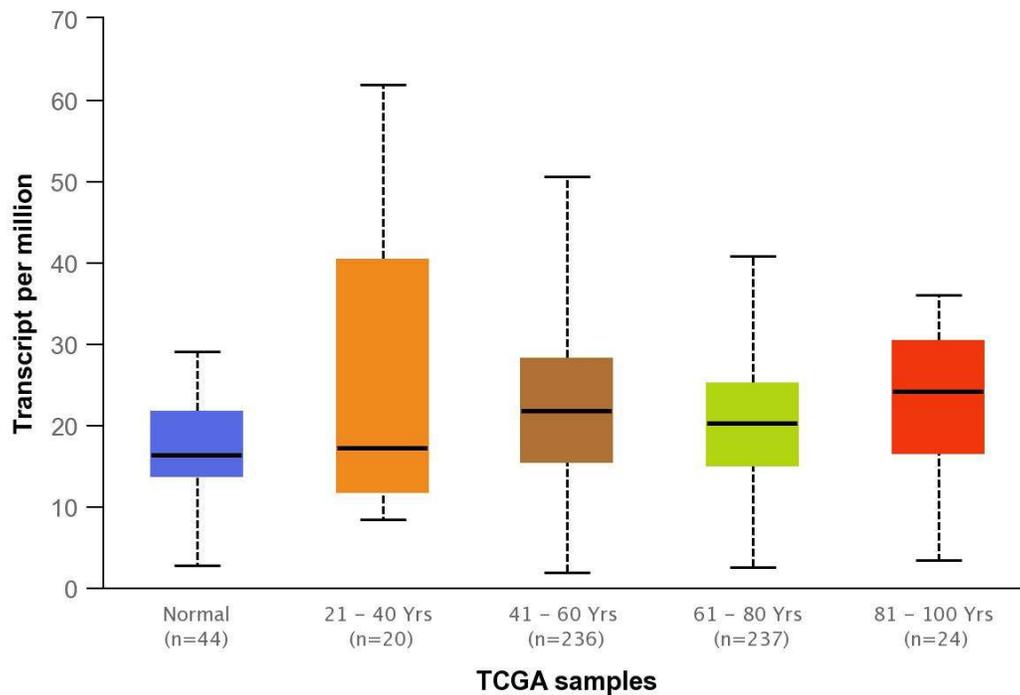


Figura 19: Expressão gênica de *SETD5* em tecidos tumorais de cabeça e pescoço em diferentes faixas de idade. Mediana das normais: 16.325, mediana idade 21-40: 17.227, mediana idade 41-60: 21.812, mediana idade 61-80: 20.11 e mediana idade 81-100: 24.075. Normal vs idade 21-40, $p=0,054$, normal vs idade 41-60, $p=0,0001$, normal vs idade 61-80, $p=0,0001$ e normal vs idade 81-100, $p=0,001$ (103).

5.5.2 Análise de dados no Oncomine

A expressão gênica utilizando a plataforma Oncomine, que faz interface com o banco de dados do (TCGA), foi analisada, salientando-se que nessa plataforma é possível fazer uma análise específica utilizando apenas amostras de câncer oral. Analisando o transcrito do gene *SETD5*, observou-se que houve diferença significativa de expressão, com o gene apresentando expressão mais elevada no carcinoma de células escamosas orais ($N=57$) do que em tecidos normais ($N=22$), com fold change de 1.11 (Figura 20).

Expressão de SETD5

p= 0,042

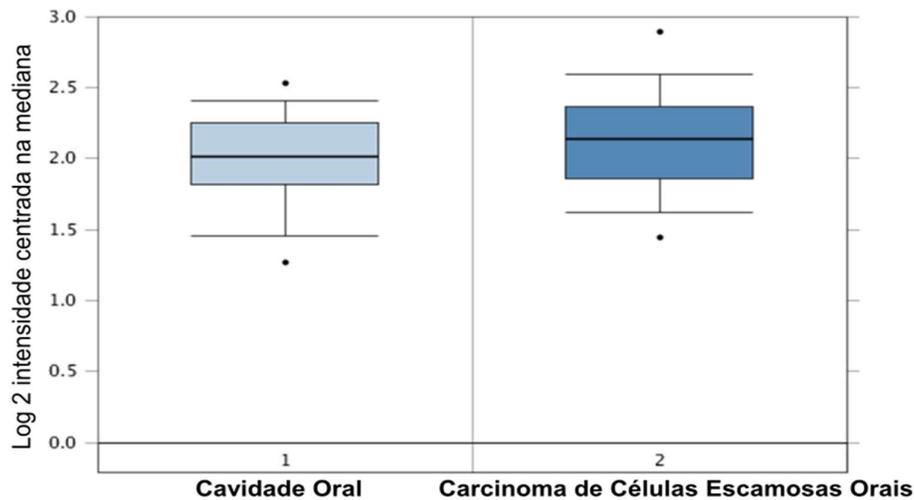


Figura 20: Expressão gênica de *SETD5* em tecidos normais e tumorais de câncer oral. Mediana das normais: 2.016, mediana das tumorais: 2.132, p= 0,042. Oncomine (104).

O gene *SETMAR* não apresentou diferença significativa de expressão nesta análise, porém é possível notar uma tendência de expressão diminuída no câncer oral quando comparado com tecidos normais. (Figura 21).

Expressão de SETMAR

p= 1,000

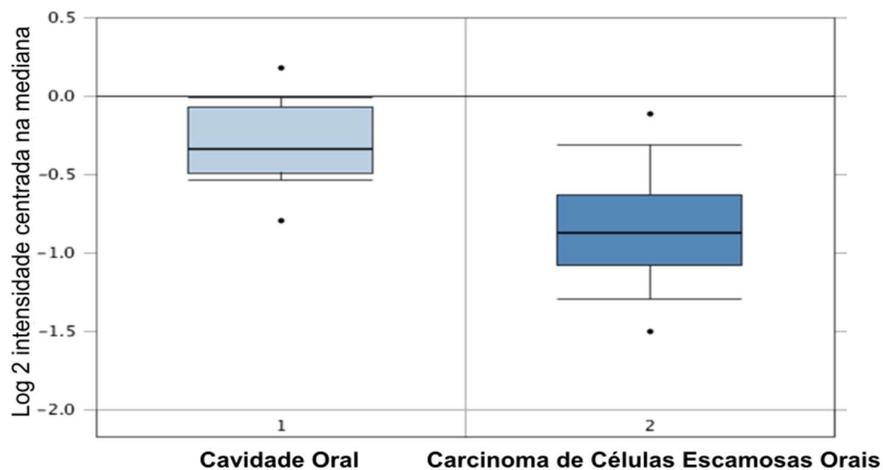


Figura 21: Expressão gênica de *SETMAR* em tecidos normais e tumorais de câncer oral. Mediana das normais: -0.337, mediana das tumorais: -0.871, $p = 1.000$. Oncomine (104).

5.5.3 Análise de dados no The Human Protein Atlas

A expressão e distribuição tecidual das proteínas codificadas pelos genes *SETD5* e *SETMAR* foram analisadas em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço de 8 pacientes no banco de dados online The Human Protein Atlas, que utiliza dados de imunohistoquímica.

Para o *SETD5*, que tem sublocalização nuclear, em 5 pacientes houve expressão mediana, em 2 pacientes expressão baixa e em 1 paciente não houve expressão (Figura 22). Em diversas linhagens celulares humanas, o *SETD5* mostrou expressão abundante, porém não foram encontradas informações para linhagens celulares orais.

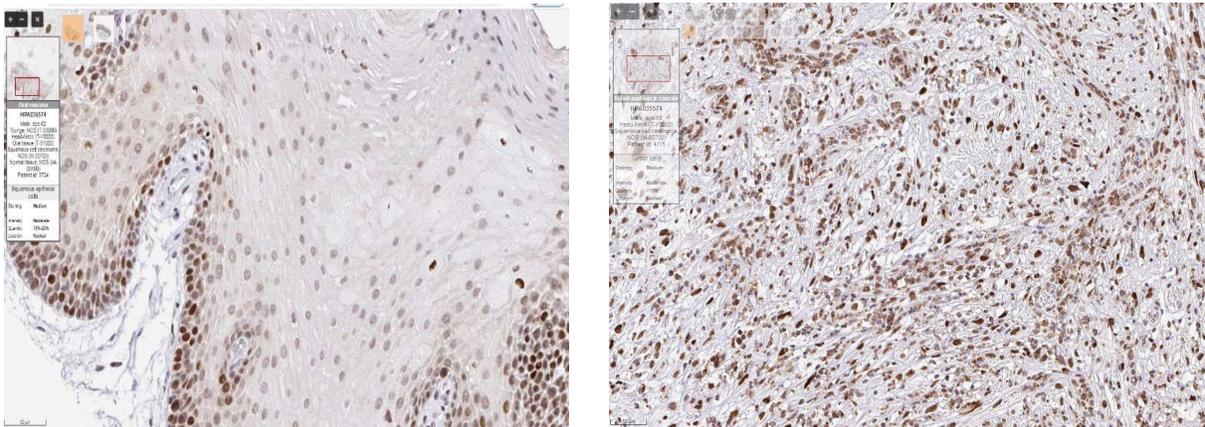


Figura 22: Imuno-histoquímica de SETD5 em tecido normal (à esquerda) e tecido de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (à direita) – The Human Protein Atlas (105).

Para a proteína SETMAR não há dados de expressão para o câncer de cabeça e pescoço, porém é possível observar que SETMAR é amplamente expressa em diferentes linhagens celulares, mas sem informação sobre a expressão em linhagens celulares orais.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, estudos sobre as modificações epigenéticas associadas ao câncer vêm ganhando destaque, mostrando essas alterações em diferentes tipos de câncer e enfatizando a importância das desregulações das metiltransferases na carcinogênese. Portanto, essa alteração epigenética, que é reversível, mostra-se como potencial alvo terapêutico, sendo responsável por diversos mecanismos na formação e progressão do câncer, como o estresse na replicação de DNA que dificulta o seu reparo, proliferação das células cancerígenas, angiogênese e metástase (106,107).

As desregulações epigenéticas envolvidas no câncer oral ainda não são totalmente conhecidas, e sendo assim, buscou-se com este estudo elucidar se os genes da família *SETD*, responsáveis pela metilação das histonas e importantes na regulação gênica e epigenética, estão com expressão alterada no câncer oral. Os genes da família *SETD* estão alterados em diferentes tipos de câncer, como já demonstrado no Quadro 1. Nossas análises mostraram que dos 10 genes estudados, o *SETD5* e o *SETMAR* estão alterados nas amostras clínicas de câncer oral. Além disso, na associação com os dados clínicos dos pacientes, houve expressão alterada dos genes *SETD4* e *SETD5* com a variável idade. Nas análises *in silico*, os genes *SETD5* e *SETMAR* também se apresentaram alterados, confirmando as alterações encontradas no presente estudo.

Primeiramente, a análise dos dados clínico-patológicos dos pacientes mostrou que a maioria é do sexo masculino (N=38), representando 86,36% e apenas 4 são mulheres (13,64%). Estes resultados condizem com vários estudos que mostram uma maior incidência do câncer oral em homens. Acredita-se que essa diferença esteja associada ao estilo de vida e exposição aos fatores de riscos, como o uso do tabaco e a ingestão de bebida alcoólica, que ainda são mais predominantes no sexo masculino (108,109,110). No entanto, esta tendência vem diminuindo em decorrência da mudança de hábitos, e alguns estudos já mostram que a representatividade de mulheres com câncer oral vem crescendo, quando elas consomem álcool e tabaco concomitantemente (111,112). A avaliação da localização anatômica dos tumores mostrou que as áreas mais representativas são assoalho da boca (45,23%) e língua (40,47%), resultados semelhantes a outros estudos que mostram ainda que essas regiões estão associadas a estágios mais avançados e a um pior prognóstico para os pacientes (113,114). Por fim, avaliou-se a presença ou ausência de recidiva e de metástase, com a maior parte dos pacientes apresentando recidiva (44,6%) e metástase (44,6%). Estes dados corroboram os de outros estudos que mostram uma alta taxa de recorrência, metástase de linfonodos cervicais e distais, que são fatores complicadores para se conseguir a cura total desses pacientes (115,116).

Em seguida, foi realizada a análise da diferença de expressão de mRNA nos 10 genes da família *SETD* em linhagens celulares de câncer oral, comparando-as com a linhagem de queratinócito normal (Hacat). Observou-se uma heterogeneidade de expressão dos 10 genes *SETD* nas 4 linhagens celulares de câncer oral. Considerando os dois genes que se mostraram

alterados nas amostras clínicas, *SETD5* e *SETMAR*, observou-se que o *SETMAR* mostrou-se hipoexpresso em todas as linhagens estudadas, o que corrobora os achados nas amostras clínicas. Já o *SETD5* se apresentou superexpresso na SCC25, que tem um grande potencial de invasão, e na Cal27, que apresenta pouca ou ausência de diferenciação celular, resultado semelhante ao encontrado nas amostras clínicas. Porém, nas duas outras linhagens, o *SETD5* se mostrou hipoexpresso. Segundo alguns estudos é possível que haja resultados diferentes conforme a célula utilizada, pelas características genéticas e da própria expressão gênica serem desconhecidas, e por isso, é necessário avaliar qual o melhor modelo a ser utilizado (117). Sabe-se, por exemplo, que alguns subtipos celulares cancerígenos podem apresentar uma alta taxa de proliferação, e outras linhagens já têm característica mais invasiva e metastática. Contudo, sabe-se também que um único tumor costuma apresentar grande complexidade celular e de microambiente, contendo células bastante heterogêneas com diferentes habilidades (118).

Na análise de expressão dos 10 genes *SETD* em amostras clínicas de pacientes com câncer oral, observou-se expressão aumentada do gene *SETD5* no câncer oral quando comparado com o tecido normal (Figura 6). *SETD5* é um membro da família de histonas lisina metiltransferases, tendo atividade na H3K36, podendo realizar mono, di ou tri metilação em lisinas. Porém, a função desta enzima ainda não está completamente caracterizada, tendo papel na conformação da cromatina, regulação da expressão gênica, alongamento e processamento de RNA. Estudos mostram a expressão aumentada do gene *SETD5* no câncer de pulmão, associada à invasão celular e à ativação de PI3K, AKT e mTOR, todos genes da via de sinalização celular que, neste estudo, promoveu a característica de células tronco cancerosas (115). Além disso, *SETD5* apresenta-se superexpresso em adenocarcinoma ductal pancreático e em câncer colorretal, quando comparados com os respectivos tecidos normais, mostrando associação com KRAS, regulação da cromatina e regulação da via de sinalização MAPK, GSTT1 e PDK4 (82,83). Um estudo recente mostra que a alta expressão de *SETD5* está associada a um pior prognóstico para os pacientes com câncer de mama, além de favorecer a progressão da doença através do gene *AKT1* que é uma serina/ treonina quinase ligada ao crescimento e diferenciação celular. Além disso a sua expressão elevada está associada a metástase e estágios clínicos avançados, relacionando-se com a inibição da apoptose e o aumento da proliferação celular. Estudos *in vitro* mostram que a inibição de *SETD5* aumenta a taxa de apoptose, diminui a proliferação celular, além da diminuição significativa de angiogênese, migração e metástase (119,120). *SETD5* está fortemente associado a metástase de linfonodos, ativação da migração e invasão celular, e a sua alta expressão parece estar correlacionada a uma maior agressividade no câncer de pulmão (121). Um estudo mostra hiperexpressão proteica de *SETD5* no carcinoma epidermóide de esôfago, associando sua alta expressão com proteínas ligadas ao ciclo celular como ciclinaB1 e ciclinaD1, tendo a primeira um papel essencial na proliferação celular e a segunda sendo responsável pela transição entre as etapas G0/G1 e fase S. Além disso, a proteína *SETD5* parece regular a via de sinalização celular

PI3K/Akt, que tem um papel crítico no câncer de esôfago (122,123). A alta expressão da proteína SETD5 e a ativação da via PI3K/Akt/mTOR também estão bastante associadas à progressão do câncer oral, estando diretamente ligadas a algumas características do câncer, como a inflamação, proliferação, migração e metástase. Portanto, a alta expressão de SETD5 parece ser um indicador de mal prognóstico, com estes pacientes apresentando uma menor sobrevida (124,125).

Nas análises *in silico*, na plataforma UALCAN, o gene *SETD5* se apresentou mais expresso em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço do que em tecidos normais (Figura 12), e na plataforma Oncomine, onde é possível fazer uma análise específica para o carcinoma oral, encontrou-se resultados significativos em que *SETD5* está mais expresso no câncer oral quando comparado a tecido normal. Na análise de expressão de proteínas utilizando a plataforma The Human Protein Atlas, a metiltransferase *SETD5* se apresentou com expressão mediana/baixa em diferentes tipos de câncer, inclusive no câncer de cabeça e pescoço, com sublocalização nuclear. Esses resultados estão condizentes com o encontrado no presente estudo, e sugerem que *SETD5* parece atuar como um oncogene no câncer oral.

No estudo em amostras clínicas de pacientes com câncer oral, o gene *SETMAR* apresentou expressão diminuída no câncer oral quando comparado ao tecido normal (Figura 7). Este resultado é condizente com um estudo recente que mostra *SETMAR* com expressão diminuída no câncer de bexiga quando comparado com tecidos normais (91). O gene *SETMAR* metila a histona 3 na lisina 4 e 36 e está associado a decatenação cromossômica, junção de extremidade não homóloga (NHEJ), reparo do DNA e ação na plasticidade da cromatina. Em contraste com os resultados encontrados aqui, *SETMAR* encontra-se hiperexpresso em câncer de mama e glioblastoma, com um possível papel na progressão desses cânceres (126,127). Utilizando o banco de dados UALCAN, observou-se que o gene *SETMAR* se apresentou hipoexpresso em células escamosas de cabeça e pescoço quando comparado aos tecidos normais (Figura 13), resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Além disso, na análise de sobrevida utilizando a curva de Kaplan-Meier, foi possível observar que quanto menor a expressão do gene *SETMAR* menor é a sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Figura 15). Resultado semelhante foi mostrado em um estudo com câncer de bexiga, onde observou-se que a expressão diminuída do gene estava associada com menor sobrevida dos pacientes (128). No câncer de rim, a alta expressão da proteína SETMAR é favorável a sobrevida do paciente, porém no câncer de fígado se apresenta desfavorável. *SETMAR* auxilia na regulação gênica e induz alterações na cromatina, mas ainda não existem dados na literatura que expliquem esta heterogeneidade da sua expressão em diferentes tecidos e órgãos, sendo necessário ainda identificar os alvos e os mecanismos específicos de *SETMAR* em diferentes tecidos (129). Estudos mostram que a expressão do gene *SETMAR* em pessoas saudáveis está associada a diversos processos celulares, como metilação de proteínas pelo seu domínio SET, reparo do DNA pela via de junção de extremidade não homóloga (NHEJ), decatenação cromossômica, supressão de translocações cromossômicas, integração do

DNA, replicação do DNA pela associação com a DNA topoisomerase II α , regulação do ciclo celular, além de regulação e manutenção da expressão gênica (130,131). Esses dados da literatura mostram a importância de *SETMAR* em diversos processos celulares e como ele pode ter diferentes ações dependendo do tipo tecidual. A expressão alterada de *SETMAR* em diferentes tipos de câncer, reforça a importância dos achados do presente estudo, dados inéditos, já que até o momento não existem estudos que mostram o envolvimento de *SETMAR* no câncer oral. Portanto, podemos sugerir que *SETMAR* desempenha papel na manutenção e integridade do genoma, e que a sua baixa expressão no câncer oral pode desencadear uma instabilidade genômica.

Na análise *in silico* usando a plataforma OncoPrint, que utiliza dados do TCGA, em um estudo que tem dados de *SETMAR* em câncer oral, o gene não apresentou diferença significativa nos resultados de expressão gênica em comparação a tecidos normais, embora haja uma tendência de expressão diminuída no câncer oral (102). Vale ressaltar que os dados encontrados no OncoPrint são dados de RNA-Seq e microarranjo de cDNA, que são técnicas de alto rendimento e utilizadas como método de varredura e não como de validação (132). Em contraste, a metodologia utilizada no presente estudo, qPCR em tempo real, é uma técnica mais acurada e robusta para estudo de expressão gênica.

Os genes *SETD1A*, *SETD1B*, *SETD2*, *SETD3*, *SETD4*, *SETD6*, *SETD7* e *SETD8* não apresentaram diferença significativa na análise de expressão gênica, sendo necessários estudos adicionais, com uma amostragem maior para se obter um melhor entendimento destes genes no câncer oral.

Na análise dos dados clínicos dos pacientes com a expressão gênica da família *SETD*, os genes *SETD4* e *SETD5* apresentaram-se com expressão aumentada nos pacientes acima de 60 anos (Figura 9,10) e as suas expressões mostraram-se correlacionadas positivamente (Figura 11). Não existem até o momento estudos que mostrem a relação desses genes e a sua expressão em idades mais avançadas no câncer oral. Na análise *in silico*, a expressão gênica de *SETD4* mostrou-se aumentada significativamente na faixa de 41-60 e 61-80 anos, no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço quando comparado aos tecidos normais, assim como *SETD5* também se mostrou com expressão aumentada significativamente na faixa de 41-60, 61-80 e 81-100 anos. Ainda pouco se sabe sobre o gene *SETD4* e o seu envolvimento na carcinogênese. Estudos indicam que *SETD4* pode atuar na regulação hematopoiética (133), além disso tem atividade de metiltransferase, metilando proteínas histonas e não histonas, com papel importante na proliferação, migração e angiogênese de células tronco mesenquimais (134). Estudos com camundongos mostram que a sua deleção em linfomas T melhoram a sobrevivência (75). *SETD4* auxilia na formação da heterocromatina e tem papel na quiescência em células tronco de câncer de mama (81). Um estudo mais recente mostra que *SETD4* regula receptores Toll-like (TLR) que

são proteínas transmembranas, regulando positivamente IL-6 e TNF- α , citocinas inflamatórias (135).

Considerando em conjunto esses dados, nota-se a importância do presente estudo que é o primeiro a mostrar a expressão alterada de *SETD5*, *SETMAR* e *SETD4* no câncer oral. Apesar destes resultados serem inéditos, são necessários estudos adicionais com testes funcionais *in vitro*, com a finalidade de elucidar o papel destes genes e uma possível relação biológica entre eles no contexto do câncer oral.

7. CONCLUSÃO

O gene *SETD5* apresentou expressão aumentada em tecidos tumorais quando comparado com tecidos normais, em pacientes com câncer oral. De acordo com estudos sobre a função de *SETD5*, sugerimos que a sua alta expressão pode atuar na via de sinalização *PI3K/AKT/mTOR*, tendo papel na inflamação, proliferação celular, migração e metástase, atuando como oncogênico na carcinogênese oral.

O gene *SETMAR* apresentou expressão diminuída em tecidos tumorais quando comparado aos tecidos normais, em pacientes com câncer oral. De acordo com estudos sobre a função de *SETMAR*, sugerimos que sua baixa expressão no câncer oral pode desencadear uma instabilidade genômica, tendo papel de supressor tumoral.

Os genes *SETD4* e *SETD5* apresentaram expressão aumentada em pacientes com idade acima de 60 anos, e além disso os dois genes apresentam expressão gênica correlacionada. Esta alteração pode representar uma relação biológica na carcinogênese oral, mas que requer estudos adicionais para maior entendimento.

Até o momento presente, este é o primeiro trabalho a identificar alterações da família *SETD* no câncer oral. Estudos adicionais, como testes funcionais e de imuno-histoquímica, serão essenciais para melhor compreensão da importância das alterações nos genes *SETD4*, *SETD5* e *SETMAR* no câncer oral e como este entendimento pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico, prognóstico e tratamento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tahmasebi E, Alikhani M, Yazdanian A, Yazdanian M, Tebyanian H, Seifalian A. The current markers of cancer stem cell in oral cancers. Life Sciences. maio de 2020;249:117483.

2. Santibáñez N, Fernández A, Fernández J, Martínez R, Fawaz J, Olate S, Haidar Z. Inmunoexpressión de E-cadherina y Vimentina en mucosa oral normal, displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas. *Int.J. Morphol.* 2017; 35(2):596-602.
3. Bomfim RA, Cascaes AM. Trends in social security benefits for oral and oropharyngeal câncer from 2006 to 2013 in Brazil. *Epidemiol. Serv. Saude.* 2018; 27(1):e20171416.
4. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Oral cancer.* :11.
5. Chattopadhyay I, Panda M. Recent trends of saliva omics biomarkers for the diagnosis and treatment of oral cancer. *Journal of Oral Biosciences.* junho de 2019;61(2):84–94.
6. Alvarenga L de M, Ruiz T, Pavarino ÉC, Ruback MJC, Maniglia V, Goloni-Bertollo EM. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. *REVISTA BRASILEIRA DE OTORRINOLARINGOLOGIA.* 2008;6.
7. Mazumder S, Datta S, Ray JG, Chaudhuri K, Chatterjee R. Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiology.* fevereiro de 2019;58:137–45.
8. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J.* março de 2018;63:S91
9. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2019. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acessado em 20/01/2021.
10. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2020.* Atlanta: American Cancer Society; 2020.
11. D’Souza W, Kumar A. microRNAs in oral cancer: Moving from bench to bed as next generation medicine. *Oral Oncology.* dezembro de 2020; 111:104916.
12. Montero PH, Patel SG. Cancer of the Oral Cavity. *Surgical Oncology Clinics of North America.* julho de 2015;24(3):491–508.

13. Upadhaya P, Barhoi D, Giri A, Bhattacharjee A, Giri S. Joint detection of claudin-1 and junctional adhesion molecule-A as a therapeutic target in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem.* outubro de 2019;120(10):18117–27.
14. Lins L, Bezerra N, Freire A, Almeida L, Lucena E, Cavalcanti Y. Socio-demographic characteristics are related to the advanced clinical stage of oral cancer. *Med Oral.* 2019;0–0.
15. Barros-Silva Pg, Fontes-Borges Mm, Costa-Dias C, Mota-Lemos Jv, Socorro-Saldanha-Cunha Md, Fernandes-Souza E, et al. Clinical-pathological and sociodemographic factors associated with the distant metastasis and overall survival of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Med Oral.* 2020;e375–82.
16. Leal da Silva Leonel AC, Belém Rodrigues Barros Soares C, Freire Lisboa de Castro J, Rogério Ferreti Bonan P, de Moraes Ramos-Perez FM, Elias da Cruz Perez D. Knowledge and Attitudes of Primary Health Care Dentists Regarding Oral Cancer in Brazil. *Acta Stomatol Croat.* 15 de março de 2019;53(1):55–63.
17. Le Campion ACOV, Ribeiro CMB, Luiz RR, da Silva Júnior FF, Barros HCS, dos Santos K de CB, et al. Low Survival Rates of Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *International Journal of Dentistry.* 2017; 2017:1–7.
18. Jairajpuri Z, Rana S, Hajela A, Jetley S. Toward early diagnosis of oral cancer: Diagnostic utility of cytomorphological features, a pilot study. *Natl J Maxillofac Surg.* 2019;10(1):20.
19. Petito G, Carneiro MAS, Santos SHR, Silva AMT, Alencar RC, Gontijo AP, Saddi VA. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017;83(1):38-44.

20. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. maio de 2018;18(5):269–82.
21. Melo BA de C, Vilar LG, Oliveira NR de, Lima PO de, Pinheiro M de B, Domingueti CP, et al. Human papillomavirus infection and oral squamous cell carcinoma - a systematic review. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. maio de 2021;87(3):346–52.
22. Varoni EM, Lombardi N, Franchini R, D'Amore F, Noviello V, Cassani B, et al. Oral Human Papillomavirus (HPV) and sexual behaviors in a young cohort of oral cancer survivors. *Oral Dis*. maio de 2021;27(4):919–23.
23. Glazer, C. A., Chang, S. S., Ha, P. K. & Califano, J. A. Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. *Oral Oncol*. 45, 440–446 (2009).
24. Gress, D.M., Edge, S.B., Gershenwald, J.E., et al. Principles of Cancer Staging. In: Amin, M.B., Edge, S.B., Greene, F.L., et al. (Eds.) *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Ed. New York: Springer; 2017: 3-30.
25. Edge SB, Hortobagyi GN, Giuliano AE. New and important changes in breast cancer TNM: incorporation of biologic factors into staging. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 3 de abril de 2019;19(4):309–18.
26. Lee NCJ, Eskander A, Park HS, Mehra S, Burtness BA, Husain Z. Pathologic staging changes in oral cavity squamous cell carcinoma: Stage migration and implications for adjuvant treatment. *Cancer*. setembro de 2019;125(17):2975–
27. Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. janeiro de 2019;18:153303381986735.

28. Upadhaya P, Barhoi D, Giri A, Bhattacharjee A, Giri S. Joint detection of claudin-1 and junctional adhesion molecule-A as a therapeutic target in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *J Cell Biochem.* outubro de 2019;120(10):18117–27.
29. Ghantous Y, Nashef A, Abu-Elnaaj I. Epigenetic Alterations Associated with the Overall Survival and Recurrence Free Survival among Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *JCM.* 7 de abril de 2020;9(4):1035.
30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* março de 2011;144(5):646–74.
31. Moolgavkar SH, Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a model for human carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 1981;66(6):1037-52.
32. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2941-53.
33. Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 1998;153(2):333-9.
34. Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 1991;51(18 Suppl):5023s-5044s.
35. Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1997;18(5):869-82.
36. Minamoto T, Mai M, Ronai Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1999;20(4):519-27.
37. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989;49(14):3713-21.

38. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.* 1991;51(12):3075-9.
39. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* janeiro de 2000;100(1):57–70.
40. Crimi S, Falzone L, Gattuso G, Grillo CM, Candido S, Bianchi A, et al. Droplet Digital PCR Analysis of Liquid Biopsy Samples Unveils the Diagnostic Role of hsa-miR-133a-3p and hsa-miR-375-3p in Oral Cancer. *Biology.* 6 de novembro de 2020;9(11):379.
41. Falzone, Lupo, Rosa, Crimi, Anfuso, Salemi, et al. Identification of Novel MicroRNAs and Their Diagnostic and Prognostic Significance in Oral Cancer. *Cancers.* 30 de abril de 2019;11(5):610.
42. Li C-C, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America.* janeiro de 2020;29(1):127–44.
43. Geng F, Wang Q, Li C, Liu J, Zhang D, Zhang S, et al. Identification of Potential Candidate Genes of Oral Cancer in Response to Chronic Infection With *Porphyromonas gingivalis* Using Bioinformatical Analyses. *Front Oncol.* 21 de fevereiro de 2019;9:91.
44. Lee J, Liu S-H, Dai K-Y, Huang Y-M, Li C-J, Chen JC-H, et al. Sarcopenia and Systemic Inflammation Synergistically Impact Survival in Oral Cavity Cancer. 2021;10.
45. Ferraz GA, Costa Neto A de O, Cerqueira E de MM, Meireles JRC. Effects of age on the frequency of micronuclei and degenerative nuclear abnormalities. *Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia.* agosto de 2016;19(4):627
46. Zhong Z, Yu J, Virshup DM, Madan B. Wnts and the hallmarks of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* setembro de 2020;39(3):625–45.
47. Silva CT da, Jasiulionis MG. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e

- câncer. *Ciência e Cultura*. 2014;66(1):38–42.
48. Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*. julho de 2019;571(7766):489–99.
49. Shin Y, Kim M, Won J, Kim J, Oh SB, Lee J-H, et al. Epigenetic Modification of CFTR in Head and Neck Cancer. *JCM*. 9 de março de 2020;9(3):734.
50. Raeesossadati R, Ferrari MFR, Kihara AH, AlDiri I, Gross JM. Epigenetic regulation of retinal development. *Epigenetics & Chromatin*. dezembro de 2021;14(1):11.
51. Wu Z, Connolly J, Biggar KK. Beyond histones - the expanding roles of protein lysine methylation. *FEBS J*. setembro de 2017;284(17):2732–44.
52. Zhao Z, Shilatifard A. Epigenetic modifications of histones in cancer. *Genome Biol*. dezembro de 2019;20(1):245.
53. Hamon MA, Cossart P. Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections. *Cell Host Microbe*. 2008; 14;4(2):100.
54. Kim SY, Han YK, Song JM, Lee CH, Kang K, Yi JM, et al. Aberrantly hypermethylated tumor suppressor genes were identified in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Clin Epigenet*. dezembro de 2019;11(1):116.
55. Goel H, Singhal S, Mathur R, Syeda S, Gupta RK, Kumar A, et al. Promoter Hypermethylation of LATS2 Gene in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Among North Indian Population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 1º de maio de 2020;21(5):1283–7.
56. Spannhoff A, Hauser A-T, Heinke R, Sippl W, Jung M. The Emerging Therapeutic Potential of Histone Methyltransferase and Demethylase Inhibitors. *ChemMedChem*. 5 de outubro de 2009;4(10):1568–82.
57. Zhang Y. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development*. 15 de setembro de 2001;15(18):2343–60.
58. Zheng Y, Tang L, Chen G, Liu Z. Comprehensive Bioinformatics Analysis of Key

- Methyltransferases and Demethylases for Histone Lysines in Hepatocellular Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 1º de janeiro de 2020;19:153303382098328.
59. Wan J, Liu H, Ming L. Lysine crotonylation is involved in hepatocellular carcinoma progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. março de 2019;111:976–82.
60. Fang L, Teng H, Wang Y, Liao G, Weng L, Li Y, et al. SET1A-Mediated Mono-Methylation at K342 Regulates YAP Activation by Blocking Its Nuclear Export and Promotes Tumorigenesis. *Cancer Cell*. julho de 2018;34(1):103-118.e9.
61. Qian C, Zhou M-M. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. dezembro de 2006;63(23):2755–63.
62. Zhang X, Tamaru H, Khan SI, Horton JR, Keefe LJ, Selker EU, et al. Structure of the Neurospora SET Domain Protein DIM-5, a Histone H3 Lysine Methyltransferase. *Cell*. outubro de 2002;111(1):117–27.
63. Jan S, Dar MI, Wani R, Sandey J, Mushtaq I, Lateef S, et al. Targeting EHMT2/ G9a for cancer therapy: Progress and perspective. *European Journal of Pharmacology*. fevereiro de 2021;893:173827.
64. Herz H-M, Garruss A, Shilatifard A. SET for life: biochemical activities and biological functions of SET domain-containing proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. dezembro de 2013;38(12):621–39.
65. Kim H, Ronai ZA. PRMT5 function and targeting in cancer. *CST*. 10 de agosto de 2020;4(8):199–215.
66. Gaździcka J, Gołąbek K, Strzelczyk JK, Ostrowska Z. Epigenetic Modifications in Head and Neck Cancer. *Biochem Genet*. abril de 2020;58(2):213–44.
67. Piao L, Li H, Feng Y, Yang Z, Kim S, Xuan Y. SET domain-containing 5 is a potential prognostic biomarker that promotes esophageal squamous cell carcinoma stemness. *Experimental Cell Research*. abril de 2020;389(1):111861.
68. Yang L, Jin M, Park SJ, Seo S-Y, Jeong KW. SETD1A Promotes Proliferation of Castration-Resistant Prostate Cancer Cells via FOXM1 Transcription. *Cancers*. 30 de

junho de 2020;12(7):1736.

69. Du M, Gong P, Zhang Y, Liu Y, Liu X, Zhang F, et al. Histone methyltransferase SETD1A participates in lung cancer progression. *Thorac Cancer*. agosto de 2021;12(16):2247–57.
70. Wu J, Chai H, Xu X, Yu J, Gu Y. Histone methyltransferase SETD1A interacts with HIF1 α to enhance glycolysis and promote cancer progression in gastric cancer. *Mol Oncol*. junho de 2020;14(6):1397–409.
71. Yang P, Huang X, Lai C, Li L, Li T, Huang P, et al. SET domain containing 1B gene is mutated in primary hepatic neuroendocrine tumors. *Int J Cancer*. dezembro de 2019;145(11):2986–95.
72. Lindner P, Paul S, Eckstein M, Hampel C, Muenzner JK, Erlenbach-Wuensch K, et al. EMT transcription factor ZEB1 alters the epigenetic landscape of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis*. fevereiro de 2020;11(2):147.
73. Kudithipudi S, Jeltsch A. Role of somatic cancer mutations in human protein lysine methyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. dezembro de 2014;1846(2):366–79.
74. Zeng Y, Wang S, Feng M, Shao Z, Yuan J, Shen Z-H, et al. Quantitative proteomics and differential signal enrichment in nasopharyngeal carcinoma cells with or without SETD2 gene knockout. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University*. 30 de outubro de 2019;39:1191–9.
75. Chen R, Zhao W, Fang C, Yang X, Ji M. Histone methyltransferase SETD2: a potential tumor suppressor in solid cancers. *J Cancer*. 2020;11(11):3349–56.
76. Pires-Luís AS, Vieira-Coimbra M, Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Silva-Santos R, Dias PC, et al. Expression of histone methyltransferases as novel biomarkers for renal cell tumor diagnosis and prognostication. *Epigenetics*. 2 de novembro de 2015;10(11):1033–43.
77. Hassan N, Rutsch N, Györfy B, Espinoza-Sánchez NA, Götte M. SETD3 acts as a prognostic marker in breast cancer patients and modulates the viability and invasion of breast cancer cells. *Sci Rep*. dezembro de 2020;10(1):2262.

78. Abaev-Schneiderman E, Admoni-Elisha L, Levy D. SETD3 is a positive regulator of DNA-damage-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* fevereiro de 2019;10(2)
79. Feng X, Lu H, Yue J, Schneider N, Liu J, Denzin LK, et al. Loss of Setd4 delays radiation-induced thymic lymphoma in mice. *DNA Repair.* fevereiro de 2020;86:102754.
80. Feng X, Lu H, Yue J, Shettigar M, Liu J, Denzin LK, et al. Deletion of Mouse Setd4 Promotes the Recovery of Hematopoietic Failure. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics.* julho de 2020;107(4):779–92.
81. Ye S, Ding Y-F, Jia W-H, Liu X-L, Feng J-Y, Zhu Q, et al. SET Domain–Containing Protein 4 Epigenetically Controls Breast Cancer Stem Cell Quiescence. *Cancer Res.* 15 de setembro de 2019;79(18):4729–43.
82. Wang Z, Hausmann S, Lyu R, Li T-M, Lofgren SM, Flores NM, et al. SETD5-Coordinated Chromatin Reprogramming Regulates Adaptive Resistance to Targeted Pancreatic Cancer Therapy. *Cancer Cell.* junho de 2020;37(6):834-849.e13.
83. Kim JC, Kim JH, Ha YJ, Kim CW, Tak KH, Yoon YS, et al. Analysis of genomic pathogenesis according to the revised Bethesda guidelines and additional criteria. *J Cancer Res Clin Oncol.* janeiro de 2021;147(1):117–28.
84. Binda O. Lysine methyltransferase SETD6 modifies histones on a glycine-lysine motif. *Epigenetics.* 1º de fevereiro de 2020;15(1–2):26–31.
85. Vershinin Z, Feldman M, Levy D. PAK4 methylation by the methyltransferase SETD6 attenuates cell adhesion. *Sci Rep.* dezembro de 2020;10(1):17068.
86. Xie H, Li J, Ying Y, Yan H, Jin K, Ma X, et al. METTL3/YTHDF2 m⁶ A axis promotes tumorigenesis by degrading SETD7 and KLF4 mRNAs in bladder cancer. *J Cell Mol Med.* abril de 2020;24(7):4092–104.
87. Meng F, Zhou Y, Dong B, Dong A, Zhang J. Long non-coding RNA LINC01194 promotes the proliferation, migration and invasion of lung adenocarcinoma cells by targeting miR-641/SETD7 axis. *Cancer Cell Int.* dezembro de 2020;20(1):588.

88. Wada M, Kukita A, Sone K, Hamamoto R, Kaneko S, Komatsu M, et al. Epigenetic Modifier SETD8 as a Therapeutic Target for High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Biomolecules*. 16 de dezembro de 2020;10(12):1686.
89. Liu M, Qin Y, Hu Q, Liu W, Ji S, Xu W, et al. SETD8 potentiates constitutive ERK1/2 activation via epigenetically silencing DUSP10 expression in pancreatic cancer. *Cancer Letters*. fevereiro de 2021;499:265–78.
90. Piao L, Feng Y, Che N, Li M, Li X, Jin Y, et al. SETD8 is a prognostic biomarker that contributes to stem-like cell properties in non-small cell lung cancer. *Pathology - Research and Practice*. dezembro de 2020;216(12):153258.
91. Xie R, Chen X, Cheng L, Huang M, Zhou Q, Zhang J, et al. NONO Inhibits Lymphatic Metastasis of Bladder Cancer via Alternative Splicing of SETMAR. *Molecular Therapy*. janeiro de 2021;29(1):291–307.
92. Kaur E, Nair J, Ghorai A, Mishra SV, Achareker A, Ketkar M, et al. Inhibition of SETMAR–H3K36me2–NHEJ repair axis in residual disease cells prevents glioblastoma recurrence. *Neuro-Oncology*. 1º de dezembro de 2020;22(12):1785
93. Peixoto RP, Rabello DA. Análise do perfil de expressão gênica de metiltransferase proteica *EZH2* e sua sublocalização celular em linhagens celulares de carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Universidade de Brasília. 2018.
94. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 1º de maio de 2001;29(9):45e–45.
95. Chandrashekar DS, Bashel B, Balasubramanya SAH, Creighton CJ, Ponce-Rodriguez I. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. 2017;19(8):10.
96. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExResultNew2.pl?genenam=SETD5&ctype=HNSC>. Acessado em 07/12/2021.

97. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExResultNew2.pl?genenam=SETMAR&ctype=HNSC>. Acessado em 07/12/2021.
98. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAsurvival1.pl?genenam=SETD5&ctype=HNSC>. Acessado em 07/12/2021.
99. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAsurvival1.pl?genenam=SETMAR&ctype=HNSC>. Acessado em 07/12/2021.
100. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExResultNew2.pl?genenam=SETD5&ctype=HNSC>. Acessado em 21/12/2021.
101. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExResultNew2.pl?genenam=SETMAR&ctype=HNSC>. Acessado em 21/12/2021.
102. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExResultNew2.pl?genenam=SETD4&ctype=HNSC>. Acessado em 21/12/2021.
103. <http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExResultNew2.pl?genenam=SETD5&ctype=HNSC>. Acessado em 21/12/2021.
104. Peng C-H, Liao C-T, Peng S-C, Chen Y-J, Cheng A-J, Juang J-L, et al. A Novel Molecular Signature Identified by Systems Genetics Approach Predicts Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. Dias-Neto E, organizador. PLoS ONE. 11 de agosto de 2011;6(8):e23452.
105. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168137/SETD5/pathology/head+and+neck+cancer#img>. Acessado em 14/07/2021.
106. Silva-Carvalho AÉ, Alencar APD, Resende MR, da Costa DF, Nonino A, Neves FAR, et al. Epigenetic priming by EHMT1/EHMT2 in acute lymphoblastic leukemia induces TP53 and TP73 overexpression and promotes cell death. Toxicology in Vitro. dezembro de 2020;69:104992.

107. Moon S, Son H, Mo H, Choi E, Yoo J, Lee S. Mutation and expression alterations of histone methylation-related NSD2, KDM2B and SETMAR genes in colon cancers. *Pathology - Research and Practice*. 1º de fevereiro de 2021;219:153354.
108. Bhattacharjee T, Kerketa M, Babu Na. Differences of oral cancer in men and women of West Bengal, India. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021;25(1):200.
109. Alkhadar H, Macluskey M, White S, Ellis I. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: Incidence, prognostic impact and molecular insight. *J Oral Pathol Med*. novembro de 2020;49(10):994–1003.
110. Williams MD. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Mucosal Melanomas. *Head and Neck Pathol*. março de 2017;11(1):110–7.
111. Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Disease-a-Month*. dezembro de 2020;66(12):100988.
112. Mu G, Wang J, Liu Z, Zhang H, Zhou S, Xiang Q, et al. Association between smokeless tobacco use and oral cavity cancer risk in women compared with men: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. dezembro de 2021;21(1):960.
113. Adamski ŁJ, Starzyńska A, Adamska P, Kunc M, Sakowicz-Burkiewicz M, Marvaso G, et al. High PD-L1 Expression on Tumor Cells Indicates Worse Overall Survival in Advanced Oral Squamous Cell Carcinomas of the Tongue and the Floor of the Mouth but Not in Other Oral Compartments. *Biomedicines*. 1º de setembro de 2021;9(9):1132.
114. Li X, Liu Z, Zhou W, Liu X, Cao W. Downregulation of CCL22 and mutated NOTCH1 in tongue and mouth floor squamous cell carcinoma results in decreased Th2 cell recruitment and expression, predicting poor clinical outcome. *BMC Cancer*. dezembro de 2021;21(1):922.

115. Lima MS, Siqueira HFF, Moura AR, Hora EC, Brito HL de F, Marques AD, et al. Temporal trend of cancer mortality in a Brazilian state with a medium Human Development Index (1980–2018). *Sci Rep.* dezembro de 2020;10(1):21384.
116. Fukumoto C, Ogisawa S, Tani M, Hyodo T, Kamimura R, Sawatani Y, et al. Clinical characteristics, treatment methods and prognoses of patients with oral squamous cell carcinoma in Japanese population: a single institution retrospective cohort study. *BMC Geriatr.* dezembro de 2020;20(1):487.
117. Andreghetto FM, Klingbeil MFG, Soares RM, Sitnik R, Pinto Junior D dos S, Mathor MB, et al. Evaluation of microRNA expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and in primary culture of oral keratinocytes. *Einstein (São Paulo).* dezembro de 2011;9(4):442–8.
118. Huang L-Y, Hsieh Y-P, Wang Y-Y, Hwang D-Y, Jiang SS, Huang W-T, et al. Single-Cell Analysis of Different Stages of Oral Cancer Carcinogenesis in a Mouse Model. *IJMS.* 31 de outubro de 2020;21(21):8171.
119. Chen Q, Sun Z, Li J, Zhang D, Guo B, Zhang T. SET Domain-Containing Protein 5 Enhances the Cell Stemness of Non-Small Cell Lung Cancer via the PI3Kt/mTOR Pathway. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2021;40(2):55–63.
120. Yang Z, Zhang C, Che N, Feng Y, Li C, Xuan Y. Su(var)3–9, Enhancer of Zeste, and Trithorax Domain-Containing 5 Facilitates Tumor Growth and Pulmonary Metastasis through Up-Regulation of AKT1 Signaling in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology.* janeiro de 2021;191(1):180–93.
121. Yu H, Sun J, Zhao C, Wang H, Liu Y, Xiong J, et al. SET domain containing protein 5 (SETD5) enhances tumor cell invasion and is associated with a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *BMC Cancer.* dezembro de 2019;19(1):736.

122. Piao L, Li H, Feng Y, Yang Z, Kim S, Xuan Y. SET domain-containing 5 is a potential prognostic biomarker that promotes esophageal squamous cell carcinoma stemness. *Experimental Cell Research*. abril de 2020;389(1):111861.
123. Xie X, Lin W, Zheng W, Chen T, Yang H, Sun L, et al. Downregulation of G2/mitotic-specific cyclinB1 triggers autophagy via AMPK-ULK1-dependent signal pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Death Dis*. fevereiro de 2019;10(2):94.
124. Liu H, Xu X, Wu R, Bi L, Zhang C, Chen H, et al. Antioral Squamous Cell Carcinoma Effects of Carvacrol via Inhibiting Inflammation, Proliferation, and Migration Related to Nrf2/Keap1 Pathway. Ramoji K, organizador. *BioMed Research International*. 10 de junho de 2021;2021:1–14.
125. Kim WD, Kim YW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. E-cadherin inhibits nuclear accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *Journal of Cell Science*. 1º de março de 2012;125(5):1284–95.
126. Dussaussois-Montagne A, Jaillet J, Babin L, Verrelle P, Karayan-Tapon L, Renault S, et al. SETMAR isoforms in glioblastoma: A matter of protein stability. *Oncotarget*. 7 de fevereiro de 2017;8(6):9835–48.
127. Liu L, Kimball S, Liu H, Holowatyj A, Yang Z-Q. Genetic alterations of histone lysine methyltransferases and their significance in breast cancer. *Oncotarget*. 10 de fevereiro de 2015;6(4):2466–82.
128. Ding B, Yan L, Zhang Y, Wang Z, Zhang Y, Xia D, et al. Analysis of the role of mutations in the KMT 2D histone lysine methyltransferase in bladder cancer. *FEBS Open Bio*. abril de 2019;9(4):693–706.
129. Miskei M, Horváth A, Viola L, Varga L, Nagy É, Feró O, et al. Genome-wide mapping of binding sites of the transposase-derived SETMAR protein in the human genome. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:4032–41.

130. Tellier M. Structure, Activity, and Function of SETMAR Protein Lysine Methyltransferase. *Life*. 4 de dezembro de 2021;11(12):1342.
131. Lié O, Virolle T, Gabut M, Pasquier C, Zemmoura I, Augé-Gouillou C. SETMAR Shorter Isoform: A New Prognostic Factor in Glioblastoma. *Front Oncol*. 3 de janeiro de 2022;11:638397.
132. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*. 20 de abril de 2015;43(7):e47–e47.
133. Feng X, Lu H, Yue J, Shettigar M, Liu J, Denzin LK, et al. Deletion of Mouse Setd4 Promotes the Recovery of Hematopoietic Failure. *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*. julho de 2020;107(4):779–92.
134. Liao X, Wu C, Shao Z, Zhang S, Zou Y, Wang K, et al. SETD4 in the Proliferation, Migration, Angiogenesis, Myogenic Differentiation and Genomic Methylation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Rev and Rep*. agosto de 2021;17(4):1374–89.
135. Zhong Y, Ye P, Mei Z, Huang S, Huang M, Li Y, et al. The novel methyltransferase SETD4 regulates TLR agonist-induced expression of cytokines through methylation of lysine 4 at histone 3 in macrophages. *Molecular Immunology*. outubro de 2019;114:179–88.