

JULIANA LUCENA SCHUSSEL

**Avaliação da hipermetilação em biomarcadores na progressão do
câncer de boca**

São Paulo

2010

JULIANA LUCENA SCHUSSEL

**Avaliação da hipermetilação em biomarcadores na progressão do
câncer de boca**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Marília Trierweiler Martins

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Schussel, Juliana Lucena

Avaliação da hipermetilação em biomarcadores na progressão do câncer de boca / Juliana Lucena Schussel; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2010.

72p. : tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Neoplasias bucais -- Biomarcadores -- Hipermetilação -- Avaliação. 2. Patologia Bucal. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Schussel JL. Avaliação da hipermetilação em biomarcadores na progressão do câncer de boca. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2010

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à Pompílio Mercadante Neto, primo/tio/amigo/pai adotivo. A inspiradora convivência e exemplo de amor à vida me guiarão, sempre.

AGRADECIMENTOS

162.000 quilômetros depois de iniciada a minha jornada na pós-graduação, chega enfim o momento de agradecer a todos aqueles que de alguma forma fizeram parte deste processo. E não foram poucas essas pessoas...por isso vou iniciar meus agradecimentos no começo de tudo:

Agradecendo meus pais, Zulma e Ricardo, pelo carinho e dedicação infinitos, pelo apoio irrestrito e contínuo estímulo e incentivo. Se posso hoje apresentar este trabalho, é porque com seu amor infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Agradeço ao meu marido Bruno, que nunca me deixou desanimar, acreditou em mim e sempre foi extremamente generoso abdicando de seus momentos em meu favor. Agradeço por seu companheirismo, carinho e amor ao longo de todos esses anos juntos.

Agradeço às minhas irmãs, Carolina e Sílvia, por serem maravilhosas amigas e companheiras, sempre entusiastas das minhas conquistas!

Chegar a São Paulo sozinha para empreender esta jornada nunca foi um problema, pois aqui encontrei uma segunda família que me acolheu e amparou com amor e carinho surpreendentes. E por isso só posso agradecer a minha prima/tia/segunda mãe Beth, que tornou tudo mais fácil ao me acolher em sua casa e me “adotar”. Agradeço também pelas deliciosas conversas sobre Antropologia e Gerontologia!

Agradeço também a minha prima Adriana, pelas conversas solidárias, pelo estímulo e carinho. E também por me emprestar seus maravilhosos pais!!

A experiência na disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, foi em todos os aspectos inspiradora por todas as pessoas que tive o prazer de conhecer e conviver.

Agradeço a Profa. Dra. Marília, que acreditou em mim desde a minha chegada na disciplina e me orientou durante todo o período com muita dedicação e paciência, sempre pronta para ajudar quando preciso.

Agradeço ao Dr. Joseph Califano pela oportunidade de trabalhar em sua equipe e pela confiança depositada para realização deste trabalho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal FOU SP, por compartilharem tão generosamente seus conhecimentos.

Manter a sanidade durante as pós-graduação nem sempre é uma tarefa simples! Encontrar amigos para compartilhar todas as frustrações e alegrias, ajudou a manter as perspectivas e relaxar quando nada mais podia ser feito! Por isso devo dizer que as conversas na “Copa” foram parte importante deste processo. Não posso deixar de agradecer à Fabiana e Márcio, Renata, Thaís, Patrícia, Nathalie por todos os momentos de alegria e descontração. Um especial agradecimento meu fiel escudeiro Paulo, um verdadeiro amigo para todas as horas e a Alexandra, com quem compartilhei todas as conquistas e angústias do mestrado e doutorado.

O período no Johns Hopkins Medical Institutions foi ainda melhor e mais proveitoso porque pude contar com a amizade e generosidade de uma pessoa maravilhosa, que rapidamente se tornou uma grande amiga, Mariana Brait. E agradecendo a ela, não posso deixar de agradecer também, aos demais colegas de laboratório Leonel Maldonado, Jose Salazar, Ethan Soudry e Sofia Lyford-Pike, pela acolhida e ajuda imprescindíveis.

Agradeço a toda equipe do Serviço de Cirurgia Buco Maxilo Facial do Hospital Erasto Gaertner- Liga Paranaense de Combate ao Câncer, por todo apoio e estímulo e pelas colaborações durante todo desenvolvimento desse trabalho, em especial, Dr. Laurindo Moacir Sassi, chefe do Serviço, e à amiga e cúmplice de caminhada Roberta T. Stramandinoli. E também, agradeço ao Serviço de Anatomia Patológica, que viabilizou a utilização das amostras.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação pela agradável convivência e espírito de companheirismo e ajuda nos momentos em que precisei.

Às funcionárias, Elisa, Zilda, Néia, Nair e Bia pela amizade, disponibilidade, paciência e competência.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos de doutorado e do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE), que permitiu minha experiência no Johns Hopkins Medical Institutions.

Agradeço a todos que, de alguma forma participaram da elaboração deste trabalho e colaboraram com ele, e a todos aqueles que me ensinaram a prosseguir sempre.

RESUMO

Schussel JL. Avaliação da hipermetilação em biomarcadores na progressão do câncer de boca. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010

A hipermetilação aberrante de regiões gênicas promotoras foi recentemente sugerida como meio de detecção do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Neste estudo nós avaliamos o *status* de metilação de um painel de 7 genes já relatados na literatura e sua correlação com lesões orais malignas e cancerizáveis de boca. Inicialmente, nós utilizamos amostras de enxágues salivares de pacientes com lesões benignas, displásicas e malignas para determinar a hipermetilação em regiões gênicas promotoras em pacientes de alto risco. Uma avaliação clínica de risco foi realizada e correlacionada com o diagnóstico histológico e *status* dos biomarcadores. A partir dos resultados analisados nas lesões intraorais, o gene *DCC*, que obteve a melhor performance entre os 7 genes, foi testado em lesões de queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio. Foram realizadas reações de PCR específica para metilação, quantitativa (Q-MSP) para os 7 genes (*CCNA1*, *MGMT*, *MINT31*, *TIMP3*, *P16*, *DAPK*, *DCC*) em enxágues salivares de 191 pacientes com lesões intraorais, e do gene *DCC* em 39 lesões de lábio. Análises de regressão logística e curva ROC foram utilizadas para avaliar a associação do *status* de metilação com o diagnóstico histológico e para estimar a acurácia da classificação respectivamente, nas amostras de enxágue salivar. Na análise multivariada, o diagnóstico displasia/ câncer foi associado com a idade (OR=1.3, 95% CI= (1.01-1.6, $p=0.014$) e a metilação do painel de 7 genes (OR=2.2, 95% CI=(1.3–4.0), $p=0.006$); a metilação do *DCC* também foi fortemente associada (OR=3.3, 95% CI=(1.7-6.6), $p=0.004$). Na análise multivariada, o diagnóstico histológico foi independentemente associado com a metilação do painel de 7 genes (OR=2.0, 95% CI=(1.1-3.6), $p=0.027$) ou do *DCC* (OR=2.8, 95% CI=(1.4-5.7), $p=0.004$). Uma nova análise, excluindo pacientes com diagnóstico prévio de câncer ($n=30$), e levando em conta uma classificação clínica de risco, foi realizada. Na análise univariada, *DCC* (OR=2.6, 95% CI=(1.1-6.1), $p=0.026$) e a classificação clínica de risco (OR=2.5, 95% CI=(1.3-5.1), $p=0.008$) foram associados com o diagnóstico de displasia/ câncer, e

permaneceram significante na análise multivariada (*DCC*: OR=2.5, 95% CI= (1.1-6.0), $p=0.037$, classificação de risco: OR=2.5, 95% CI=(1.2-5.0), $p=0.012$). A classificação clínica de risco identificou displasia/ câncer com a sensibilidade de (95% CI=41–71%) e especificidade de 66% (95% CI= 57–75%). A sensibilidade da classificação clínica de risco combinada com a metilação do painel de 7 genes melhorou, chegando a 71% (95% CI=56–83%) e com a metilação do *DCC* chegou a 69% (95% CI=54–81%). O status de metilação do painel de 7 genes, como também o *DCC* como um marcador individual, foi independentemente associado com o diagnóstico histológico em enxágues salivares. Nas lesões labiais não foi possível observar a mesma correlação entre o *status* de metilação do gene *DCC* e o diagnóstico histológico, provavelmente, devido a diferente etiologia das lesões intraorais e labiais. Os resultados mostram a potencial habilidade destes biomarcadores em prever o risco de presença de lesões intraorais cancerizáveis, usando uma abordagem não invasiva, além do potencial de melhorar a eficiência da classificação clínica de risco. Mas reforça a diferente etiologia das lesões intraorais e labiais e a necessidade de diferentes marcadores para essas lesões.

Palavras-chave: Câncer bucal, Metilação, Fluidos corporais

ABSTRACT

Schussel JL. Evaluation of biomarkers hypermethylation in oral cancer progression [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010

Aberrant promoter hypermethylation has been recently proposed as a means for detection of HNSCC in salivary rinses. Here we evaluate the ability of a previously reported 7-gene methylation panel status to correlate with premalignant and malignant oral lesions. We used a large prospective cohort of salivary rinses obtained from patients with benign, dysplastic, and cancer diagnoses to determine promoter hypermethylation in high-risk patients. Clinical risk assessment was performed and correlated with histological diagnosis and biomarker status. Also, a cohort of lip lesions was selected and methylation *status* of *DCC* gene was correlated with histology. Quantitative methylation-specific PCR (Q-MSP) was performed analyzing methylation status of 7 genes (*CCNA1*, *MGMT*, *MINT31*, *TIMP3*, *P16*, *DAPK*, *DCC*) in salivary rinses of 191 patients with oral lesion and 39 lip lesions. Logistic regression and receiver operating characteristic (ROC) analyses were used to examine the association of methylation status with histologic diagnosis and to estimate classification accuracy, respectively. On univariate analysis, diagnosis of dysplasia/cancer was associated with age (OR=1.3, 95% CI= (1.01-1.6, $p=0.014$) and 7-gene panel methylation (OR=2.2, 95% CI=(1.3–4.0), $p=0.006$); *DCC* methylation was also strongly associated (OR=3.3, 95% CI=(1.7-6.6), $p=0.004$). On multivariable modeling, histologic diagnosis was independently associated with 7 gene panel (OR=2.0, 95% CI=(1.1-3.6), $p=0.027$) or *DCC* (OR=2.8, 95% CI=(1.4-5.7), $p=0.004$) methylation. A subset analyzed (n=161) without prior biopsy proven malignancy received clinical risk classification based on lesion examination. On univariate analysis, *DCC* (OR=2.6, 95% CI=(1.1-6.1), $p=0.026$) and clinical risk classification (OR=2.5, 95% CI=(1.3-5.1), $p=0.008$) were associated with diagnosis of dysplasia/cancer, and remained significant on multivariate analysis (*DCC*: OR=2.5, 95% CI= (1.1-6.0), $p=0.037$, risk classification: OR=2.5, 95% CI=(1.2-5.0), $p=0.012$). Clinical risk classification identified dysplasia/cancer with a sensitivity of 56% (95% CI=41–71%) and specificity of 66% (95% CI= 57–75%). The sensitivity of clinical risk classification combined with 7-gene panel methylation improved to 71% (95% CI=56–

83%) and with *DCC* methylation improved to 69% (95% CI=54–81%). The 7-gene panel methylation, as well *DCC* as a single marker, was independently associated with histologic diagnosis in salivary rinses. No correlation was found between *DCC* methylation *status* and histologic diagnosis of lip lesions, probably due different etiology of oral and lip lesions. The results show the potential ability of these biomarkers to predict risk for presence of oral premalignancy and malignancy using a non-invasive approach using salivary rinse and can improve the efficiency of clinical risk classification. Also, reinforces the different etiologic origins of intraoral and lip lesions and the need of different markers for these lesions.

Keywords: Oral cancer, Methylation, Body fluid

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 CÂNCER DE BOCA	15
2.2 EPIGENÉTICA	18
2.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS	19
2.3.1 Modificações covalentes das histonas	19
2.3.2 Micro RNA (miRNA)	20
2.3.3 Metilação do DNA	21
2.4 EPIGENÉTICA E CÂNCER.....	23
2.5 METILAÇÃO ABERRANTE DO DNA EM CÂNCER DE BOCA	24
2.6 USO DE FLUIDOS CORPORAIS NA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES	28
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 AMOSTRAS.....	30
4.1.1 Enxágues salivares	30
4.1.2 Amostras parafinadas	31
4.2 METODOLOGIA DA PESQUISA	31
4.2.1 Obtenção dos enxágues salivares	32
4.2.2 Extração de DNA	32
4.2.3 Tratamento com Bissulfito de Sódio	33
4.2.4 Reação de Polimerase em cadeia quantitativa específica para metilação (qMSP)	34
4.2.5 Análise Estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 LESÕES INTRAORAIS	37
5.1.1 Amostras	37
5.1.2 Classificação de risco	38
5.1.3 Status de metilação do painel de 7 genes	38
5.1.4 Fatores de risco	39
5.1.5 Classificação de risco versus diagnóstico histológico	40
5.2 LESÕES DE LÁBIO	46
5.2.1 Amostras	46
5.2.2 Status de metilação do DCC	46
5.2.3 Fatores de risco	47
5.2.4 Sobrevida carcinoma epidermoide de lábio	47

6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é a sexta neoplasia mais comum em todo o mundo. O maior problema enfrentado nesse tipo de neoplasia maligna é a taxa de sobrevida que permanece baixa e sem alterações nas últimas três décadas. Apesar dos avanços nas cirurgias, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 50%. O baixo índice de melhora é atribuído principalmente ao diagnóstico tardio que diminui as chances de sucesso dos tratamentos, além da incidência de segundos tumores primários. Por isso mesmo, o principal foco das pesquisas de câncer de região de cabeça e pescoço é a busca por biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce, bem como auxiliar no prognóstico da doença.

O uso da genômica e proteômica tem auxiliado na busca de biomarcadores para os diversos cânceres, inclusive o de cabeça e pescoço, mas para isso é necessária a obtenção de grupos de amostras. O utilização de fluidos corporais como sangue e saliva, é uma boa opção para grandes estudos de doença por apresentarem vantagens como fácil acesso, baixa invasividade, baixo custo e obtenção de várias alíquotas de amostras. Os fluidos corporais são potenciais carreadores de DNA, RNA e proteínas e por isso seu uso tem aumentado nos últimos anos.

A metilação do DNA é o evento epigenético mais estudado em humanos, e já demonstrou forte correlação na evolução de neoplasias malignas. Biomarcadores epigenéticos já foram relatados em vários tipos de câncer, tanto para o uso como ferramenta de diagnóstico como para o prognóstico da doença.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações de metilação em genes que já foram relacionados anteriormente na literatura relacionados à carcinogênese de cabeça e pescoço e correlacionar com dados clínicos e histológicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE BOCA

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública atualmente em todo o mundo. No Brasil é a segunda causa de morte, sendo esperados 489.270 novos casos em 2010. Entre eles 14.120 (2,9%) ocorrerão em boca, com expectativa de 6.214 (44%) mortes em decorrência da doença (1), sendo a sexta neoplasia maligna mais frequente. O carcinoma epidermoide é o tipo mais comum de câncer de boca, correspondendo a 90% dos casos, os demais se dividem entre neoplasias malignas de glândulas salivares, carcinoma basocelular e outras neoplasias raras (2).

Apesar de todos os avanços em tecnologia e tratamentos oncológicos, houve apenas modesta melhora na sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço nas últimas três décadas (3) na maioria das vezes devido ao diagnóstico tardio. A demora no diagnóstico muitas vezes está relacionada ao paciente que não busca assistência médica, e também ao profissional que falha na detecção e diagnóstico de lesões de alto risco. As lesões assintomáticas costumam ser diagnosticadas mais tardiamente. Apenas 50% dos pacientes podem ser curados com terapia inicial (4). O diagnóstico precoce favorece não apenas o prognóstico do paciente como também reduz morbidade e necessidade de tratamentos mais agressivos (5).

Acredita-se que o carcinoma epidermoide de boca surja a partir de lesões iniciais cancerizáveis. A detecção dessas lesões é um importante fator de redução de mortalidade, morbidade e custo de tratamento do carcinoma epidermoide de boca (5).

As lesões precursoras de boca apresentam alterações pré-neoplásicas, chamadas displasias. Alguns autores, ainda, sugerem o uso do termo neoplasia

intraepitelial (6). Acredita-se que as características displásicas ocorram em decorrência de alterações cromossômicas, gênomicas e até mesmo epigenômicas, mas não é possível determinar se essas alterações são as mesmas associadas com o desenvolvimento da neoplasia maligna (7). O conceito de displasia representa um amplo espectro de alterações ao invés de discretos estágios identificáveis (7), mas convencionou-se classificar as displasias epiteliais orais como severa, moderada e discreta de acordo com as alterações arquiteturais e atípicas citológicas presentes. De acordo com método preconizado pela Organização Mundial de Saúde em 2005, a classificação é feita pela análise das camadas do epitélio atingidas pelas alterações arquiteturais e citológicas. No entanto, a falta de critérios na interpretação das lesões contribui para avaliações inconsistentes das displasias. A falta de concordância entre observadores e a falta de consenso sobre a importância de cada alteração dificultam o correto diagnóstico das displasias epiteliais orais. Não existem evidências de que as lesões potencialmente malignas da boca sofrerão transformação neoplásica (8, 9). Os avanços nos estudos de biologia molecular irão, sem dúvida, promover melhorias nos métodos de avaliação do diagnóstico e prognóstico das lesões orais, em especial, as lesões displásicas.

Clinicamente, as lesões precursoras podem ter diferentes apresentações, sendo as mais comuns as manchas brancas (leucoplasia), e as lesões avermelhadas (eritroplasia). Características tais como espessamento das bordas da lesão, crescimento irregular e ulceração, devem ser avaliadas cuidadosamente pelo clínico. Além disso, a localização dessas lesões deve ser levada em consideração no momento da avaliação de risco de malignização e uma atenção maior deve ser dispensada àquelas que se encontram nos sítios mais comuns para o carcinoma epidermoide oral, como a língua e assoalho bucal (10). Em geral, as leucoplasias têm menor risco de transformação em relação às eritroplasias. Lesões mistas apresentam risco intermediário de malignização e devem ser avaliadas levando-se em consideração as demais características clínicas (10).

O perfil dos pacientes de carcinoma epidermoide de boca inclui, na maioria, homens acima dos 50 anos de idade, com história de tabagismo e etilismo. A mudança de hábitos entre as mulheres, principalmente o aumento do uso de tabaco diminuiu a relação homem:mulher na incidência do câncer de boca (2). Os locais mais frequentes são lábio, assoalho bucal e língua. No momento do diagnóstico, até

43% dos pacientes podem apresentar metástase regional e até 10% metástase à distância (11, 12).

De maneira geral, a maioria das neoplasias malignas está associada a fatores de risco ambientais e estilo de vida. A boca está em contínuo contato com diferentes agentes agressores, sejam eles químicos, físicos ou biológicos, que podem de alguma forma contribuir com o processo de carcinogênese. O tabaco e o álcool estão fortemente associados ao câncer de boca, sendo não apenas fatores independentes de risco como também possuem um efeito multiplicativo nas chances de desenvolver esta neoplasia maligna, relacionado de 85 a 90% dos casos (13). O tabaco é a maior causa de câncer passível de prevenção no mundo hoje. É responsável por 89-90% de todas as mortes por câncer de pulmão, e aproximadamente 30% de todas as mortes por câncer em países em desenvolvimento, incluindo morte por câncer de cavidade bucal, laringe, esôfago e estômago (14).

Depois dos carcinomas de pele, o câncer de lábio é a neoplasia maligna mais comum em cabeça e pescoço, e corresponde a 30% das neoplasias malignas de boca (15, 16). É classificado como carcinoma de cavidade oral, mas sua localização e seu epitélio diferenciado lhe conferem características próprias e comuns às neoplasias não-melanoma de pele (17, 18). A maioria dos cânceres de lábio se originam no vermelhão do lábio, na junção entre a cavidade oral e a pele. Em lesões extensas é difícil determinar a exata origem da neoplasia (2). A região mais acometida é o lábio inferior, com até 95% dos casos. A cirurgia e radioterapia são os tratamentos de escolha para essa neoplasia, e o índice de cura pode chegar a 90% em estágios iniciais da doença (2).

A taxa de sobrevida para pacientes com carcinoma epidermoide de lábio é de 90% e está relacionado com a recorrência da neoplasia e metástase regional (15). As metástases em linfonodos cervicais são encontradas de 4 a 13% dos casos e reduzem a sobrevida dos pacientes de 29 a 68% (15). A inspeção cuidadosa e regular deve ser feita durante vários anos após a terapia inicial (2), levando em conta os riscos de desenvolver segundo tumor primário. Apesar dos altos índices de sucesso no tratamento, tanto a cirurgia como a radioterapia podem deixar sequelas funcionais e estéticas permanentes (2).

Clinicamente, o carcinoma epidermoide de boca se apresenta como ulcerações que não cicatrizam, com bordas elevadas e endurecidas, indolor em estágios iniciais. Seu crescimento e invasão são locais, mas pode atingir estruturas adjacentes. Seu prognóstico é favorável quando detectado precocemente. De acordo com Gooris et al. (19) a presença e a extensão do envolvimento de linfonodos regionais é considerado o fator prognóstico mais importante para determinar a sobrevida do paciente. A invasão neural, especialmente do nervo alveolar inferior e nervo lingual, podem causar parestesia na cavidade oral e face em estágios avançados da doença (20). A disseminação do carcinoma epidermoide de boca pode ocorrer por meio de continuidade ou contiguidade, invadindo orofaringe e atingindo estruturas ósseas e musculatura profunda, ou ainda por meio de vasos linfáticos atingindo inicialmente linfonodos cervicais, e em estágios mais avançados via hematogênica, atingindo frequentemente, neste caso, os pulmões (21).

Histologicamente apresenta proliferação de queratinócitos atípicos com graus variados de pleomorfismo nuclear e celular, mitoses atípicas e queratinizações prematuras formando ilhas ou cordões de células neoplásicas que invadem a lâmina própria.

2.2 EPIGENÉTICA

O conceito de epigenética foi primeiramente descrito por C. H. Waddington (1939) (22) para explicar as interações causais entre genes e seus produtos que interferem no fenótipo. Essa primeira definição, apesar de levar em conta apenas o papel da epigenética no desenvolvimento embrionário, já demonstrava o impacto da estrutura da cromatina na expressão gênica. Ao longo dos anos, os avanços nos conhecimentos sobre o DNA, evidenciaram a epigenética em uma ampla variedade de processos biológicos. Hoje, o estudo da epigenética engloba as alterações hereditárias na expressão gênica que ocorrem independente de mudanças na sequência primária do DNA (23).

A programação epigenética é responsável pela expressão do genoma nos organismos eucarióticos, colaborando com vários processos biológicos desde a diferenciação, *imprinting* e inativação do cromossomo X, como também no desenvolvimento de doenças como o câncer (24). A regulação epigenética mede a adaptação genômica a um ambiente, contribuindo em última instância com o fenótipo (25). Modificações epigenéticas constituem a memória de um organismo a todos os estímulos ou insultos a que ele foi exposto (25).

A epigenética é regulada por uma variedade de mecanismos moleculares, tais como modificações pós-translacionais das histonas, mecanismos não covalentes (como incorporação de variantes de histonas e remodelamento do nucleossomo), metilação de bases citosinas e RNA não codificantes, (como RNA de interferência (siRNA) e micro RNA (miRNA)). Esses mecanismos agem sobre a estrutura da cromatina interferindo na compactação e acessibilidade do nucleossomo (26-28).

Para entender a epigenética como um todo é preciso entender cada um de seus mecanismos, uma vez que esses eventos estão interrelacionados. Como o foco principal deste trabalho é discutir as alterações nos padrões de metilação gênica, uma maior atenção será dispensada a este assunto.

2.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS

2.3.1 Modificações covalentes das histonas

As histonas são as principais proteínas do nucleossomo. Possuem estruturas globulares com proeminentes regiões N-terminais organizadas em um octômero de 4 histonas (H3, H4, H2A, H2B). Podem sofrer várias reações químicas como: metilação, acetilação, fosforilação e ribosilação. Essas modificações são eventos essenciais no controle de transcrição, replicação e reparo do DNA (29).

A modificação nas histonas promove uma mudança na acessibilidade da cromatina, através da ligação de proteínas não histonas a um sítio de ligação provocando a ligação ou oclusão deste sítio, interferindo assim, na mensagem codificada. Essa constante remodelação da cromatina permite que ela regule os diferentes processos celulares, promovendo as alterações enzimáticas exigidas a cada etapa. Essas modificações podem levar ou a ativação ou a repressão gênica, dependendo de quais resíduos são modificados ou do tipo de modificação presente (29), mas também pode levar à ativação de oncogenes e perda de função dos genes supressores de tumor favorecendo a tumorigênese (24). Padrões específicos de modificações das histonas estão presentes nos diferentes tipos celulares e exercem um importante papel na determinação da identidade celular (30).

A adição ou remoção de modificações covalentes das histonas é controlada por enzimas. A histona acetiltransferase e a histona deacetilase são responsáveis pela adição e remoção de grupos acetil, respectivamente, enquanto as histonas metiltransferases e histonas demetilases são responsáveis pela adição e remoção de grupos metil (29). Essas enzimas, não só interagem umas com as outras, como também interagem com outros mecanismos regulatórios envolvidos com a estrutura da cromatina e processos transcricionais (31).

2.3.2 Micro RNA (miRNA)

miRNAs são RNAs não codificantes com importantes funções regulatórias em diversos processos biológicos, desde diferenciação e regulação do ciclo celular até senescência e metabolismo. Descobertos em 1993 (32), possuem, aproximadamente, 22 nucleotídeos e agem através do silenciamento pós-transcricional de genes alvo.

Os genes que codificam os miRNAs são transcritos no núcleo pela RNA polimerase II e translocados para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, os “pré-miRNAs” são clivados em fragmentos duplos de 18 a 24 nucleotídeos que ligam-se ao complexo de indução do silenciamento de RNA (RISC – *RNA-induced silencing*

complex). Uma das fitas do miRNA permanece ligada ao complexo RISC, enquanto a outra fita se liga ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, causando clivagem, em caso de complementaridade entre mRNA e miRNA, ou repressão translacional, caso a complementaridade não seja completa (33). Normalmente os miRNAs exercem suas funções regulatórias ligando-se à sequência 3'-UTR (*untranslated region*) do mRNA alvo.

Desde sua descoberta, vários miRNAs foram identificados no genoma humano, como também uma lista de seus possíveis alvos, o que tem demonstrado, cada vez mais, seu importante papel na expressão gênica de maneira geral (34).

A expressão de miRNA não só pode ser regulada por mecanismos epigenéticos como também os próprios miRNAs podem participar de mecanismos regulatórios epigenéticos celulares tendo como alvo as enzimas responsáveis pela metilação do DNA e modificações das histonas.

2.3.3 Metilação do DNA

A metilação do DNA é provavelmente o evento epigenético mais estudado em mamíferos (31). A metilação do carbono 5 do anel de pirimidina de citosinas em sequências de dinucleotídeos CpG é uma característica de genomas eucarióticos. Essas sequências estão concentradas em regiões do DNA chamadas ilhas CpG, ou em regiões com grande repetição de sequências como regiões centroméricas e retrotransposons (31). A ligação 5-metilcitosina corresponde a 1% de todas as bases, podendo variar de acordo com o tipo de tecido, mas de maneira geral 75% dos dinucleotídeos estão metilados no genoma humano.

As ilhas CpG possuem de 1 a 4 kb de comprimento e geralmente são encontradas na região promotora dos genes, ou, ainda, no primeiro exon, e contêm pelo menos 50% de C+G. A maioria das ilhas não está metilada e conseqüentemente conserva o potencial de transcrição ativo. Estima-se que existam

em torno de 30.000 ilhas CpG no genoma humano, mas essa quantidade pode estar subestimada, uma vez que essas ilhas representam um sítio alvo para mutações, com uma ocorrência de até 10 a 50 vezes mais que outras regiões (25).

Cerca de três quartos dos sítios de transcrição e 88% dos promotores ativos estão associados com sequências ricas em CpG, e conseqüentemente podem ser regulados por metilação (25, 31). Durante o desenvolvimento e diferenciação tecidual, a maioria das ilhas CpG não está metiladas. A metilação de algumas ilhas CpG promotoras durante o desenvolvimento resulta no silenciamento transcricional a longo prazo, como a inativação do cromossomo X e genes *imprinting* genômico (35). Regiões intergênicas ou regiões de íntrons são consideradas regiões pobres em CpG e geralmente encontram-se metiladas (36).

A metilação ocorre pela transferência de um grupo metil da S-adenosil-L-metionina (SAM) para a posição 5' da citosina do anel de pirimidina do DNA. Essa reação é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMT1, DNMT3A e DNMT3B). A S-adenosilocisteína resultante da saída do grupo metil, em altas concentrações, inibe a ação das enzimas DNA metiltransferases, representando um controle na ocorrência da reação (31, 36).

As DNA metiltransferases são essenciais para o desenvolvimento embrionário. A DNMT1 atua como uma enzima de manutenção, agindo durante a replicação e metilando DNA recém sintetizado usando a fita parental como modelo, e dessa forma passando a informação epigenética para as outras gerações de células. As DNMT3A e DNMT3B atuam como metiltransferases *de novo* agindo independentes da replicação tanto em regiões não metiladas como hemimetiladas (25), com um importante papel no estabelecimento dos padrões de metilação. Sendo que o DNA hemimetilado ocorre no processo de metilação de manutenção, quando uma das fitas do DNA, durante a replicação, encontra-se metilada e a outra não.

2.4 EPIGENÉTICA E CÂNCER

O câncer normalmente é definido como uma doença genética multifatorial. No entanto, a genética clássica não é capaz de explicar a diversidade e complexidade dessa doença. As primeiras ideias sobre epigenética surgiram justamente para explicar eventos que não podiam ser esclarecidos através de mecanismos genéticos.

A perda de metilação no DNA em áreas de dinucleotídeos CpG foi a primeira anormalidade epigenética detectada em neoplasias (37), na tentativa de explicar qual mecanismo seria responsável pela alta frequência de, o que então se acreditava serem mutações, adaptação do microambiente neoplásico e plasticidade de algumas neoplasias. Os primeiros experimentos para detecção de metilação aberrante foram realizados por Andy Feinberg e Bert Vogelstein (37), em 1983 no Johns Hopkins Hospital, utilizando a técnica de Southern blotting. Os pesquisadores observaram uma significativa diferença na proporção de CpG metiladas em tecidos normais e não metiladas em tecidos neoplásicos, caracterizando a hipometilação.

A perda de metilação no DNA genômico aumenta com a progressão maligna das lesões, durante a evolução das neoplasias. Na síndrome hereditária de Beckwith-Wiedemann (caracterizada por onfalocele, macroglossia e gigantismo), a hipometilação leva a perda de *imprinting* do gene *IGF2* (gene do fator de crescimento similar à insulina) aumentando o risco para neoplasias malignas, como por exemplo, carcinoma coloretal e desenvolvimento do tumor de Wilm's (28, 38). A hipometilação ou desmetilação leva à ativação de genes com efeitos imprevisíveis. Alguns exemplos são a ativação dos genes *CCND2* (ciclina D2) e *MASPIN* em carcinomas gástricos; *MN/CA9* em carcinoma de células renais; *S100A4* associado a metástase em carcinoma de cólon e *HPV16* em câncer cervical (28).

O primeiro gene supressor de tumor a ser identificado como hipermetilado em neoplasias, foi justamente o primeiro gene supressor de tumor conhecido, o retinoblastoma 1 (*RB1*) (39), mostrando que o silenciamento desse gene ocorria por mecanismos epigenéticos. A partir de então, muitos autores observaram a

hipermetilação de regiões promotoras em vários genes, confirmando a inativação epigenética no câncer (40-42). A principal prova do papel da metilação do DNA no silenciamento dos genes supressores de tumor foi demonstrada com o uso de drogas desmetilantes que reativavam a expressão gênica, como por exemplo o 5-Aza-2'-deoxicitidina (28). Com a constatação do importante papel da metilação nas neoplasias malignas, houve um aumento do interesse na comunidade científica que levou à criação do projeto epigenoma e à investigação de terapias epigenéticas (37).

2.5 METILAÇÃO ABERRANTE DO DNA EM CÂNCER DE BOCA

A epigenética, como já foi demonstrado, pode ser um evento reversível e por isso possui um excelente potencial para o uso em terapias oncológicas (43). Vários genes já foram testados em câncer de boca, e na maioria das vezes possuem também relação com outros tipos de neoplasias malignas. Áreas adjacentes a neoplasias e lesões cancerizáveis podem também apresentar aumento na metilação, sugerindo que a metilação de genes supressores de tumor pode ser um evento precoce da carcinogênese (44).

Os estudos sobre metilação de DNA em regiões promotoras apontam para promissores avanços na detecção precoce do carcinoma epidermoide de boca. Técnicas como reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real, como por exemplo PCR quantitativo específico para metilação (qMSP), são instrumentos importantes na pesquisa de biomarcadores. A determinação do status da metilação no câncer de boca vem demonstrando um potencial cada vez melhor na detecção precoce, monitoramento e tratamento das neoplasias (44).

Vários genes já foram estudados na tentativa de correlacionar progressão do carcinoma epidermoide de boca com o *status* de metilação do DNA.

DAPK1

O gene codificador da proteína quinase associada à morte/apoptose (*DAPK1*), já foi amplamente associado à metilação em várias neoplasias humanas. As principais funções da proteína incluem apoptose, supressão tumoral e morte de células neuronais induzidas por isquemia (43, 45). A hipermetilação desse gene já foi verificada em carcinoma epidermoide oral, em até 68,3% dos casos e mucosa adjacente em 76,7% dos casos (44, 46). A metilação de *DAPK1* já foi associada com a recorrência precoce do carcinoma de bexiga, além de ter sido verificada em carcinomas epidermóides de pele (47).

CDKN2A

O gene *CDKN2A* é um importante regulador do ciclo celular bastante estudado. Está localizado no cromossomo 9p21 e foi inicialmente identificado como um gene supressor de tumor. Além de participar ativamente da regulação da progressão do ciclo celular, inibindo as CDK (quinases dependentes de ciclinas), promove também a regulação da proteína retinoblastoma (pRb). A metilação de *CDKN2A* já foi relatada em lesões displásicas potencialmente malignas de boca, em regiões adjacentes à carcinomas gástricos e na colite ulcerativa (48, 49). A hipermetilação na região promotora desse gene parece ser um evento comum nos carcinomas de cabeça e pescoço, mas sem correlação significativa com evolução clínica e prognóstico. Acredita-se que esteja relacionado a estágios precoces da carcinogênese e associado com a exposição ao álcool e tabaco (50). Em carcinomas epidermóides cutâneos associados à radiação UV sua expressão reduzida foi associada à hipermetilação da região promotora do gene e consequente diminuição na produção da proteína (47).

MGMT

A O⁶-metilguanina DNA metiltransferase (*MGMT*) é uma enzima de reparo de DNA codificada por gene de mesmo nome (51). A *MGMT* catalisa a transferência do grupo metil da O⁶-metilguanina para um resíduo de cisteína da própria molécula, reparando a lesão em passo único (51).

Estudos mostram que o gene *MGMT* não está mutado ou deletado nos cânceres humanos, mas sua perda está relacionada com eventos epigenéticos (52).

A hipermetilação das ilhas CpG do *MGMT* causam silenciamento transcricional em linhagens celulares deficientes no reparo por O⁶-metilganina, e seu tratamento com drogas desmetilantes restabelece a expressão de *MGMT* (52, 53).

O silenciamento por metilação do gene codificador já foi relacionado com carcinomas de cabeça e pescoço e carcinomas de pele, além de estar associado com aumento na frequência de mutações de transição de G:C/ A:T no gene *TP53* em câncer de cérebro, colo retal e pulmão (54). Kato et al. (2006) (48) demonstraram um aumento nas taxas de metilação do gene *MGMT* e *CDKN2A* em carcinomas epidermóides de boca, e também no tecido normal adjacente ao tumor.

MINT31

O *MINT31* (*methylated in tumors 31*) corresponde a ilha CpG na região 5' do gene *CACNA1G* que está localizado no cromossomo 17q21, e normalmente está associado a perda de heterozigose em vários tumores (55). O silenciamento causado por hipermetilação do região promotora já foi associado com pior prognóstico e diminuição da sobrevida em pacientes com câncer colo retal (56) e em carcinomas epidermóides de boca. Estudos sugerem que *MINT31* esteja localizado em uma região envolvida com regulação transcricional de vários genes, incluindo o *CACNA1G* juntamente com o *MINT1* (57).

TIMP3

TIMP-3 é uma glicoproteína de 24 kDa, produzida na maioria das células, e por causa das diferentes funções e localizações teciduais, seu papel na tumorigênese pode ser mais relevante que o de outros membros da família *TIMP*. A *TIMP-3* é insolúvel e permanece ligada à matriz extracelular, além de inibir a atividade das metaloproteinases da matriz (MMP) 1, 2, 3, 9 e 13 (58). Pode também ter efeitos inibitórios na progressão tumoral, com atividade antiangiogênica e promoção de apoptose (59). A diminuição da expressão pode favorecer o crescimento neoplásico, reduzindo a inibição das MMPs e da atividade tumoral e aumentando a angiogênese (60).

Estudos mostram uma alta incidência de hipermetilação de *TIMP3* no esôfago de Barret e no adenocarcinoma de esôfago, associado com diminuição da sobrevida (61). Os estudos apontam que a hipermetilação do *TIMP3* e seu consequente

silenciamento pode ser usada como fator prognóstico no carcinoma epidermoide de esôfago (60, 62).

Righini et al. (63) mostraram que, entre outros genes, a hipermetilação do *TIMP3* pode ser detectada na saliva de pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e pode também ser utilizado como marcador de detecção precoce.

CCNA1

O gene *CCNA1* (ciclina A1) é expresso de forma específica nos tecidos e está frequentemente metilado nas neoplasias sólidas (64). Em um estudo, utilizando agentes desmetilantes para genes potencialmente hipermetilados em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, os autores encontraram metilação na região promotora do *CCNA1* de 45% das neoplasias, mas em nenhum caso de tecido normal (65, 66). A ciclina A1 está envolvida na apoptose e inibição do crescimento na via da p53, e sua metilação está inversamente relacionada com a presença de p53 mutante (66).

A ciclina A1 tem importante papel na progressão celular na fase de metáfase da meiose, através da ligação à CDK2 (quinase ciclina dependente 2). Sua função é pouco conhecida, mas estudos sugerem funções de supressão tumoral. A ciclina A1 parece também participar do processo de reparo da quebra na dupla fita do DNA (64).

DCC

O gene *DCC* (deletado em carcinoma colorretal) é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo 18q21, que codifica proteínas transmembrana com estrutura similar a moléculas de adesão de células neurais (67) envolvidas na diferenciação celular, tanto epitelial como neuronal (68). Sua expressão está reduzida ou ausente em mais de 50% dos carcinomas colorretais.

Carvalho et al. (2006) (69) demonstraram que a hipermetilação da região promotora do *DCC* é o mecanismo de inativação mais comumente encontrado em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. A hipermetilação do *DCC* foi encontrada em 75% dos casos de neoplasias malignas e em menos de 1% dos controles normais (69).

2.6 USO DE FLUIDOS CORPORAIS NA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

O uso de fluidos corporais para detecção de biomarcadores tem se mostrado bastante promissor na pesquisa oncológica. Estudos anteriores mostraram que células tumorais senescentes podem se desprender e entrar na circulação, sendo carregadas pelo soro e plasma (70). A detecção do DNA circulante nessas células pode ser usado para identificar alterações neoplásicas específicas como, por exemplo, perda de heterozigose, instabilidade de microssatélite e metilação, em neoplasias de cabeça e pescoço (71). Essas células também podem ser obtidas de fluidos corporais em direto contato com a neoplasia, tais como a urina para detecção de alterações moleculares em pacientes com carcinoma de bexiga (72).

A saliva é um fluido de fácil obtenção que carrega células do epitélio de revestimento oral, bem como da orofaringe. O primeiro estudo a identificar alterações de hipermetilação em neoplasias de cabeça e pescoço, feito por Rosas et al. (73), mostrou o potencial do uso de saliva para detecção de biomarcadores.

Estudos anteriores mostraram que a saliva pode também ser utilizada no diagnóstico de cárie e doença periodontal (74, 75), e seu uso oferece uma boa relação custo-benefício na detecção de doenças.

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a metilação aberrante de um painel de genes, sabidamente alterados em neoplasias malignas, em carcinoma epidermoide bucal, intraoral e labial, e correlacionar com dados clínicos e histológicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado em duas etapas, com grupos de amostras diferentes. A primeira etapa foi realizada no *Johns Hopkins Medical Institutions, Division of Head and Neck Cancer Research* (Baltimore, MD, EUA) e utilizou amostras de enxágues salivares para avaliação de um painel de genes para detecção de biomarcadores de carcinogênese. Na segunda etapa, realizada na Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, utilizando amostras parafinadas de pacientes atendidos no Hospital Erasto Gaertner (Curitiba-PR), o gene que obteve os melhores resultados na primeira etapa do trabalho, foi testado em lesões cancerizáveis e malignas de lábio.

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Enxágues salivares

Esta parte do estudo utilizou amostras de saliva coletadas na New York University (NYU) College of Dentistry (Nova Iorque, NY, EUA). O grupo de pacientes foi selecionado na clínica odontológica associada à NYU College of Dentistry, e os pacientes foram admitidos prospectivamente em um estudo sobre determinantes clínicos e moleculares de risco para malignidades e lesões cancerizáveis. Os pacientes foram avaliados quanto ao risco clínico observando a presença, localização, tamanho e aparência de lesão, bem como outros parâmetros clínicos, definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (10). Os pacientes foram submetidos a coleta de sangue e de enxágues salivares. Informações demográficas,

tais como sexo, idade, cor da pele e exposição a fatores de risco, foram obtidas, e biópsias incisionais foram realizadas nas lesões examinadas, para confirmação histológica do diagnóstico.

4.1.2 Amostras parafinadas

Foram selecionados casos de queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio de pacientes atendidos no Hospital Erasto Gaertner (Curitiba-PR), num total de 32 amostras de carcinoma epidermoide de lábio e 7 amostras de queilite actínica. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner (registrado sob o nº 1672) (Anexo A), com anuência do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Anexo B). Através dos prontuários médico-hospitalares dos paciente selecionados, foram coletados dados referentes a: idade, sexo cor, exposição a fatores de risco tais como tabaco, álcool e radiação ultra-violeta, e também dados relativos a tratamento e sobrevida dos pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermoide de boca.

4.2 METODOLOGIA DA PESQUISA

As amostras, tanto de enxágue salivar como parafinadas dos pacientes selecionados para pesquisa foram submetidas a extração de DNA, tratamento com bissulfito de sódio e reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real, para análise quantitativa.

Os dados foram analisados estatisticamente para as correlações desejadas.

4.2.1 Obtenção dos enxágues salivares

Para obtenção das amostras de enxágue salivar foram utilizados raspadores citológicos para coletar células esfoliadas da cavidade oral e orofaringe, seguido de bochecho e gargarejo com 20 ml de solução salina por 30 segundos. O material obtido dos raspadores foi agitado para liberação do material coletado no enxágue salivar. A solução obtida foi então centrifugada para obtenção de botão e o sobrenadante descartado. O material foi imediatamente congelado e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA obtido nos enxágues salivares, as amostras foram inicialmente colocadas em tubos contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de proteinase K (Boehringer-Ingelheim, Nieder-Ingelheim, Alemanha) e 1% de solução SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e incubados a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 horas, sendo que 10 μl de proteinase K foram adicionados a cada 6 horas, para digestão das membranas celulares. Em seguida foi realizada a extração com a utilização de solução fenol/clorofórmio e precipitação com etanol, da seguinte maneira: 300 μl de solução fenol/clorofórmio foi adicionada a cada tubo e agitada por um minuto em *vortex*, para expor toda a amostra à solução de extração. A solução obtida foi então transferida para um tubo *MaxExtract low density* (Qiagen Inc., Alameda, CA) e centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm. Após a centrifugação, torna-se possível observar a separação das fases aquosa e orgânica. O sobrenadante (fase aquosa) foi então removido e colocado em novo tubo de 2 ml. A essa solução foram acrescentados 200 μl de isopropanol, 100 μl de acetato de amônia 5M e 2 μl de glicogênio, e a solução resultante incubada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. Após este período, a solução foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm e foi possível observar a formação de um botão. Descartou-se o sobrenadante,

com cuidado para não descartar o botão, e a seguir adicionou-se 500 µl de etanol absoluto para enxágue. Novamente a solução foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm, descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 500 µl de etanol 70% e seguiu-se outro ciclo de centrifugação de 15 minutos a 12.000 rpm. Removeu-se, então, todo o sobrenadante e os tubos foram mantidos abertos por 10 minutos para secagem. O DNA foi então ressuspendido em 30 µl de água destilada e as amostras armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Para extração das amostras parafinadas, foi utilizado o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Alameda, CA) seguindo-se as recomendações do fabricante. Em resumo, as amostras passaram por um processo de desparafinização em 2 banhos de xilol aquecido de 30 minutos cada e, a seguir, por um processo de reidratação em banhos de etanol em concentrações descendentes. As amostras foram então lavadas com água destilada e mantidas no tubo aberto para secagem em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada às amostras, a solução tampão fornecida pelo kit e 20 µl de proteinase K. As amostras foram incubadas em banho aquecido (56 °C) por 24 horas. Após o período de incubação, foi adicionado 200 µl de tampão AL, fornecido pelo fabricante, e novamente o tubo foi incubado em banho aquecido (70 °C), por 10 minutos seguido de breve centrifugação. Foi então adicionado 200 µl de etanol absoluto, e após agitação em vortex, o conteúdo do tubo foi transferido para tubos com colunas, parte integrante do kit. Os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 10.000rpm, e a solução expelida da coluna foi descartada. Em seguida, foram utilizados 500 µl de tampão de enxágue, AW1 seguido por AW2, com centrifugação subsequente e descarte das soluções remanescentes. O último passo foi adicionar 50 µl do tampão AE, que foi mantido em temperatura ambiente por 5 minutos antes da centrifugação. A solução foi mantida a - 80 °C até o momento do uso.

4.2.3 Tratamento com Bissulfito de Sódio

Nesta técnica, o tratamento com bissulfito de sódio converte todas as citosinas não metiladas em uracilas, sendo que as citosinas metiladas permanecem

citossinas após o tratamento. Dessa forma é possível identificar-se as regiões metiladas nas sequências desejadas.

A conversão com o bissulfite de sódio do DNA extraído das amostras de saliva e também das amostras parafinadas foi realizado com a utilização do kit EpiTect Bisulfite (Qiagen Inc., Alameda, CA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a conversão, o DNA foi armazenado a -80 °C.

4.2.4 Reação de Polimerase em cadeia quantitativa específica para metilação (qMSP).

A reação de MSP foi primeiramente descrita por Herman et al. (1996), e introduziu a conversão das bases citosinas não metiladas em uracilas a fim de facilitar a identificação das citosinas metiladas nas reações de PCR. O PCR em tempo real possibilita uma análise quantitativa das amostras de DNA, demonstrando a cada ciclo de reação a quantidade de amplificações geradas. A técnica foi utilizada tanto para as amostras de enxágues salivares como para amostras de parafina.

Para esta pesquisa optou-se por utilizar o método Taqman, com a utilização de sondas fluorogênicas para detecção de produtos de PCR específicos a medida que esses se acumulam durante a reação. A sonda de oligonucleotídeos utilizada nesse método, possui um fluoróforo em sua região 5' e um inibidor na região 3'. Enquanto a sonda esta intacta, a proximidade do inibidor com o fluoróforo reduz a fluorescência, uma vez que a sonda se liga na região entre iniciadores, ela é quebrada pela ação da enzima Taq polimerase, separando o inibidor e aumentando o sinal fluorescente. A sonda é então removida da fita alvo, permitindo a extensão do iniciador por toda a fita e o avanço da reação de PCR. À medida que a reação ocorre, mais moléculas de fluoróforo são quebradas de suas respectivas sondas aumentando a intensidade da fluorescência proporcionalmente à quantidade de produtos formados.

O DNA convertido, após o tratamento com bissulfite de sódio, foi utilizado para realização de PCR em tempo real com fluorescência conforme descrito anteriormente (76). Em resumo, iniciadores e sondas foram desenhados para

amplificar especificamente o DNA convertido por tratamento com bissulfito de sódio para os genes de interesse na pesquisa, *DAPK*, *DCC*, *CCNA1*, *TIMP3*, *MINT31*, *CDKN2A* e *MGMT*, e também para o gene constitutivo, β -actina. As sequências estão relacionadas na Tabela 4.1. Os sete genes foram testados nas amostras de saliva e apenas o gene *DCC* foi testado nas amostras de lesões de lábio.

As reações de amplificação foram realizadas em triplicata, com volume final de 10 μ l, contendo: 1,5 μ l de DNA convertido; 600 nmol/l de cada iniciador (senso e antisenso); 200 μ mol/l de sonda fluorogênica; 0,75 unidades de Platinum Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA); 200 μ mol/l de cada dATP, dCTP, dGTP, e dTTP; 200 nmol/l de ROX Reference Dye (Invitrogen, Carlsbad, CA); 16,6 mmol/l de sulfato de amônia; 67 nmol/l de Trizma (Sigma, St Louis, MO); 6,7 mmol/l de cloreto de magnésio; 10 mmol/l mercaptoetanol; e 0,1% de DMSO.

O ciclo térmico foi iniciado com um passo de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido por 50 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As reações de amplificação das amostras de enxágue salivar foram realizadas em placas de 384 poços em aparelho 7900 sequence detector (Perkin- Elmer Applied Biosystems), enquanto para as amostras parafinadas, foram realizadas em aparelho 7500 sequence detector (Perkin- Elmer Applied Biosystems) em placas de 96 poços. Ambas foram analisadas por um sistema de detecção de sequência (SDS 2.3; Applied Biosystems).

DNA de leucócitos de indivíduo saudável foi metilado *in vitro* com excesso de Sssl metiltransferase (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) para gerar um DNA completamente metilado, do qual diluições seriadas foram utilizadas para realização de curva de calibração para cada placa. DNA de leucócitos normais, ou DNA de uma linhagem celular sabidamente não metilada, tratado com bissulfito de sódio, foram usados como controle negativo da reação. A quantidade de metilação em cada amostra foi determinada por medias entre os valores do gene de interesse e gene de referência interna, a β - actina (média dos valores das triplicatas do gene de interesse dividido pela média dos valores das triplicatas da β -actina, multiplicado por 100).

4.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada tratando os valores obtidos como variáveis binárias e contínuas para os genes individualmente. Uma análise descritiva inicial foi realizada para demonstrar a distribuição da população e as comparações estatísticas dos valores de metilação com as variáveis clínicas, como idade, sexo, localização, categoria de risco clínico, diagnóstico histológico (incluindo o grau de displasia epitelial ou presença de malignidade) e fatores de risco (tabagismo, consumo de álcool e radiação UV) usando o teste qui-quadrado.

Para as amostras de lesões intraorais, o modelo de risco proporcional de Cox foi utilizado para calcular o risco multifatorial da presença de doença maligna ou cancerizável e a associação com o *status* de metilação em enxágues salivares. A significância estatística foi determinada por $p < 0,05$.

Tabela 4.1- Lista de sequências de iniciadores e sondas fluorogênicas utilizada

<i>Gene</i>	<i>Forward 5'-3'</i>	<i>Sonda 6FAM 5'-3'TAMRA</i>	<i>Reverse 5'-3'</i>
DAPK	GGATAGTCGGATCGAGTTAAC GTC	TTCGGTAATTCGTAGCGGTAGGGTT TGG	CCCTCCCAAACGCCGA
MGMT	CGAATATACTAAAACAACCCG CG	AATCCTCGCGATACGCACCGTTTAC G	GTATTTTTTCGGGAGCGAGGC
P16	TTATTAGAGGGTGGGGCGGAT CGC	AGTAGTATGGAGTCGGCGCGGG	GACCCCGAACC GCGACCGTAA
TIMP3	GCGTCGGAGGTTAAGGTTGTT	AACTCGCTCGCCCGCCGAA	CTCTCCAAAATTACCGTACGCG
DCC	CGCGATTTTTGGTTTCGAAGG	GGTTTTTGATTTTTTCGGAGTTTTTT TG	TACCGATTACTTAAAAATACGC G
MINT31	GAGTGATTTATTAGGTTTCGTC	ACGCCGAAAAACACTTCCCAAC	CGAAAAACGAAACGCCGCGA
CCNA1	TCGCGGCGAGTTTATTCG	CGTTATGGCGATGCGGTTTCGG	CCGACCGCGACAAACG
EDNRB	GGGAGTTGTAGTTTAGTTAGTT AGGGAGTAG	TTTTTATTCGTCGGGAGGAG	CCCGCGATTAAACTCGAAAA
ACTB	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGT AAGT	ACCACCACCAACACACAATAACA AACACA	AACCAATAAACCTACTCTCC CTTAA

5 RESULTADOS

5.1 LESÕES INTRAORAIS

5.1.1 Amostras

Um total de 191 pacientes foi incluído neste estudo. A maioria eram homens (69,9%), leucodermas (69,6%), com idade média de 54,1 anos (variando entre 18 e 90 anos). Uso de álcool e cigarro (atual ou passado) foi encontrado em 49,4% e 72,2% dos pacientes, respectivamente. Quando comparadas as características histológicas — lesão benigna, displasia epitelial e câncer —, os grupos foram similares. Entre os pacientes com relato de uso de tabaco — atual ou passado —, 67,3% apresentaram lesão benigna, 69,8% apresentaram algum nível de displasia epitelial e 74,3% já apresentavam carcinoma invasivo. Quando considerado o consumo de álcool, a ocorrência foi de 70,8%, 74,4% e 77,1% respectivamente. O consumo concomitante de álcool e tabaco foi observado em 37% dos casos, sendo que quando considerado o diagnóstico histológico, a exposição aos dois fatores de risco ocorreu em 34% dos casos de lesão benigna, 40% dos casos de displasia leve, 20% dos casos de displasia moderada, 55% dos casos de displasia severa e 40% dos casos de carcinoma epidermoide.

5.1.2 Classificação de risco

Os cirurgiões-dentistas se basearam na classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para realizar uma classificação clínica de risco nas lesões analisadas. As lesões foram classificadas em alto risco e baixo risco de malignização. Após a biópsia, o risco de classificação foi comparado com o diagnóstico histológico (Tabela 5.1).

Tabela 5.1- Comparação da classificação clínica de risco e diagnóstico histológico

	<i>Baixo Risco</i>	<i>Alto Risco</i>	<i>CEB</i>	<i>Total</i>
Benigna	75	38	0	113
Displasia discreta	16	11	0	27
Displasia moderada	2	7	1	10
Displasia Severa.	3	3	0	9
Câncer	0	6	29	35
Total	96	65	30	191

CEB- carcinoma epidermóide de boca

5.1.3 Status de metilação do painel de 7 genes

A análise univariada foi realizada para verificar a associação dos genes individualmente e o diagnóstico histológico (Tabela 5.2). O painel de 7 genes teve uma significativa associação com o diagnóstico histológico (OR= 2,2, 95% de intervalo de confiança (CI)= 1,3-4,0; p= 0,006). Para a maioria das lesões benignas e cancerizáveis nenhum dos genes estavam metilados (71,7% e 67,4%,

respectivamente), enquanto a maioria dos carcinomas epidermóides apresentaram pelo menos um dos genes metilados (57,1%).

Quando analisados separadamente, *DCC* teve a maior associação, como um marcador único (OR=3,3, 95%CI=1,7-6,6; $p=0,0005$). O gene *CCNA1* também apresentou associação estatisticamente significativa e foi fortemente correlacionado com *DCC* ($p<0,0001$). Por esse motivo, para as outras análises, apenas o *DCC* foi considerado, uma vez que apresentou maior estabilidade e menor intervalo de confiança (CI). Os genes *CDNK2A* e *MINT31* também apresentaram associação com o diagnóstico histológico, quando analisados separadamente ($p=0,031$; $p=0,019$), porém ambos apresentaram CI inválido (OR=6,9, 95%CI=1,2-39,9; OR=16,5, 95%CI=1,6-171,9), o que diminuiu a significância estatística. Os genes *TIMP3* e *MGMT* não apresentaram associação significativa com o diagnóstico histológico na amostra estudada.

5.1.4 Fatores de risco

A análise univariada dos fatores de risco apontou a idade como a única variável associada com o diagnóstico histológico nesta amostra (OR=1,3, 95%CI= 1,1-1,6; $p=0,014$). Nem o tabaco ou o consumo de álcool ($p=0,372$ e $p=0,435$, respectivamente) tiveram associação significativa (Tabela 5.3).

Na análise multivariada, após ajuste para os fatores de risco (idade, tabaco e consumo de álcool), a idade permaneceu como fator mais associado ao diagnóstico histológico (OR=1,3, 95%CI= 1,0-1,6; $p=0,034$). O painel de 7 genes também obteve associação significativa com o diagnóstico histológico (OR=2,0, 95%CI= 1,1-3,6; $p=0,027$) (Tabela 5.3). O gene *DCC*, quando analisado como um marcador único, reduziu a significância estatística da idade ($p=0,051$), mas teve uma forte associação com o diagnóstico histológico (OR=2,8, 95%CI=1,4-5,7; $p=0,004$) (Tabela 5.4), melhor que o painel de 7 genes, o que sugere que ele possa ser usado como um marcador independente para o diagnóstico histológico.

5.1.5 Classificação de risco versus diagnóstico histológico

Para uma melhor avaliação da classificação de risco, as amostras foram analisadas de acordo com o diagnóstico histológico (benignas n=113 vs. displasia epitelial/ carcinoma epidermoide n=48), excluindo pacientes que possuíam diagnóstico de câncer no momento da primeira consulta (n=30) (Tabela 5.5).

Nenhum dos fatores de risco (idade, sexo, tabaco e consumo de álcool) alcançaram significância estatística na análise univariada. A classificação de risco, descrita como alto risco ou baixo risco, foi associada com o diagnóstico histológico (OR=2,5, 95%CI= 1,3-5,1; p=0,008). O *status* de metilação do painel de 7 genes não foi associado com a histologia (p=0,372), mas novamente o gene *DCC*, como marcador único, foi associado com o diagnóstico histológico (OR= 2,6, 95%CI= 1,1-6,1; p= 0,026) (Tabela 5.5).

O modelo multivariado analisou a classificação de risco, idade, cor da pele, o *status* de metilação do painel de 7 genes e do *DCC* (Tabela 5.6 e 5.7). A classificação de risco foi novamente associada, independentemente, com o diagnóstico histológico na análise do painel de genes e do *DCC* (OR=2,5, 95%CI=1,3-5,0; p=0,009 e OR=2,5, 95%CI=1,2-5,0; p=0,012). O *status* de metilação do *DCC* teve, mais uma vez, associação significativa com o diagnóstico de displasia epitelial/ carcinoma epidermoide (OR=2,5, 95%CI=1,1-6,0; p=0,037).

Para avaliar a precisão da classificação de risco e marcadores, a sensibilidade e especificidade foram calculadas usando a análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A área sob a curva (AUC- *area under the curve*) também foi calculada com um CI de 95% (Tabela 5.8). A classificação de risco, quando analisada como um único fator para evolução da histologia, obteve 56% (95% CI= 41-71) de sensibilidade e 66% (95% CI= 57-75) de especificidade, com AUC de 0,61 (95% CI= 0,53-0,70). O painel de 7 genes, considerando pelo menos 1 gene metilado como critério de corte, obteve 35% (95% CI= 22-51) de sensibilidade e 72% (95% CI= 62-80) de especificidade, com AUC de 0,54 (95% CI= 0,46-0,62). O gene *DCC*, como um marcador individual, obteve 27% (95% CI= 15-42) de sensibilidade e 88% (95% CI= 80-93) de especificidade, com AUC de 0,57 (95% CI= 0,50-0,64)

quando tratado como valor binário, sendo metilado ou não metilado. Usando a análise de regressão logística, foi combinado o risco de classificação e o *status* de metilação do painel de 7 genes, utilizando o valor de corte de 0,254270 para maximizar os valores, e com isso, houve um aumento na sensibilidade, que chegou a 71% (95% CI= 56-83), mas perda de especificidade (49%; 95% CI= 39-58), e AUC de 0,63 (95% CI= 0,50-0,75).

A combinação do risco de classificação com o gene *DCC*, no valor de corte maximizado de 0,37007, mostrou uma sensibilidade similar (69%; 95% CI= 54-81), mas aumento da especificidade (59%; 95% CI= 50-68) e AUC (0,65; 95% CI= 0,53-0,78). A combinação do risco de classificação e metilação melhorou os resultados.

Tabela 5.2- Análise univariada da associação entre genes individuais e histologia

Variável	Benigno (n=113)	Pré-maligno (n=43)	Maligno (n=35)	Total	OR ¹ (95% CI)	P ¹
CCNA1, n [%]						
Não- metilado	109 (96,5)	40 (93,0)	26 (74,3)	175	Ref	0,0003
Metilado	4 (3,5)	3 (7,0)	9 (25,7)	16	6,4 (2,4 – 17,4)	
DAPK, n [%]						
Não- metilado	103 (91,2)	40 (93,0)	31 (88,6)	174	Ref	0,832
Metilado	10 (8,8)	3 (7,0)	4 (11,3)	17	1,1 (0,4 – 2,9)	
DCC, n [%]						
Não- metilado	99 (87,6)	33 (76,7)	21 (60,0)	153	Ref	0,0005
Metilado	14 (12,4)	10 (23,3)	14 (40,0)	38	3,3 (1,7 – 6,6)	
MGMT, n [%]						
Não- metilado	104 (92,0)	43 (100)	29 (82,9)	176	Ref	0,426
Metilado	9 (8,0)	0 (0)	6 (17,1)	15	1,5 (0,6 – 4,1)	
MINT31, n [%]						
Não- metilado	113 (100)	42 (97,7)	32 (91,4)	187	Ref	0,019
Metilado	0 (0)	1 (2,3)	3 (8,6)	4	16,5 (1,6 – 171,9)	
TIMP3, n [%]						
Não- metilado	106 (93,8)	41 (95,4)	32 (91,4)	179	Ref	0,801
Metilado	7 (6,2)	2 (4,6)	3 (8,6)	12	1,2 (0,4 – 3,6)	
P16, n [%]						
Não- metilado	112 (99,1)	42 (97,7)	32 (91,4)	186	Ref	0,031
Metilado	1 (0,9)	1 (2,3)	3 (8,6)	5	6,9 (1,2 – 39,9)	
7-gene panel, n [%]						
Nenhum metilado	81 (71,7)	29 (67,4)	15 (42,9)	125	Ref	0,006
Pelo menos 1 metilado	32 (28,3)	14 (32,6)	20 (57,1)	66	2,2 (1,3 – 4,0)	

¹ Baseado no modelo de regressão logística de risco proporcional com métodos assintóticos

Tabela 5.3- Associação entre fatores de risco e histologia- painel de 7 genes.

Variáveis	Análise univariada		Análise multivariada	
	OR ¹ (95% CI)	P ¹	OR ² Ajustado (95% CI)	P ² Ajustado
Idade (anos)	1,3 ³ (1,1 – 1,6)	0,014	1,3 ³ (1,0 – 1,6)	0,034
Sexo				
Feminino	Ref		Ref	
Masculino	1,2 (0,6 – 2,1)	0,618	1,2 (0,6 – 2,2)	0,657
Cor				
Afro-americanos	Ref		Ref	
Caucasianos	1,2 (0,6 – 2,5)	0,730	1,1 (0,5 – 2,3)	0,713
Outros	1,5 (0,5 – 4,9)		1,7 (0,5 – 5,5)	
Tabaco				
Nunca usou	Ref		Ref	
Ex-fumante	1,7 (0,8 – 3,8)	0,372	1,7 (0,7 – 3,8)	0,497
Fumante	1,1 (0,6 – 2,2)		1,3 (0,7 – 2,7)	
Álcool				
Nunca usou	Ref		Ref	
Usuário	1,3 (0,7 – 2,4)	0,435	1,1 (0,5 – 2,2)	0,829
Painel de 7 genes				
Nenhum metilado	Ref		Ref	
Pelo menos 1 metilado	2,2 (1,3 – 4,0)	0,006	2,0 (1,1 – 3,6)	0,027

¹ Modelo univariado de risco proporcional; ² Modelo multivariado de risco proporcional; ³ Unidade de 10 anos

Tabela 5.4- Associação entre fatores de risco e histologia– gene *DCC*

Variáveis	Análise univariada		Análise multivariada	
	OR ¹ (95% CI)	P ¹	OR ² Ajustado (95% CI)	P ² Ajustado
Idade (anos)	1,3 ³ (1,1 – 1,6)	0,014	1,3 ³ (1,0 – 1,6)	0,051
Sexo				
Feminino	Ref		Ref	
Masculino	1,2 (0,6 – 2,1)	0,618	1,2 (0,6 – 2,3)	0,634
Cor				
Afro-americanos	Ref		Ref	
Caucasianos	1,2 (0,6 – 2,5)	0,730	1,1 (0,5 – 2,3)	0,786
Outros	1,5 (0,5 – 4,9)		1,5 (0,5 – 5,2)	
Tabaco				
Nunca usou	Ref		Ref	
Ex-fumante	1,7 (0,8 – 3,8)	0,372	1,6 (0,7 – 3,7)	0,571
Fumante	1,1 (0,6 – 2,2)		1,3 (0,6 – 2,6)	
Álcool				
Nunca usou	Ref		Ref	
Usuário	1,3 (0,7 – 2,4)	0,435	1,0 (0,5 – 2,0)	0,980
<i>DCC</i>				
Não metilado	Ref		Ref	
Metilado	3,3 (1,7 – 6,6)	0,0005	2,8 (1,4 – 5,7)	0,004

¹ Modelo univariado de risco proporcional; ² Modelo multivariado de risco proporcional; ³ Unidade de 10 anos

Tabela 5.5 - Análise univariada da associação entre fatores de risco e histologia – excluindo pacientes com diagnóstico de câncer na primeira consulta (n=161)

Variável	Benignas (n=113)	Displasia/câncer (n=48)	Odds ratio ¹ (95% CI)	P ¹
Idade (anos) Média (variação)	52 (18 – 78)	57 (24 – 86)	1,2 ² (0,9 – 1,6)	0,110
Sexo, n [%]				
Feminino	36 (31,9)	15 (31,3)	Ref	
Masculino	77 (68,1)	33 (68,7)	1,0 (0,5 – 2,1)	0,940
Cor, n [%]				
Afro-americanos	28 (24,8)	10 (20,8)	Ref	
Caucasianos	77 (68,1)	36 (75,0)	1,3 (0,6 – 3,0)	0,639
Outros	8 (7,1)	2 (4,2)	0,7 (0,1 – 3,9)	
Tabaco, n [%]				
Nunca usou	37 (32,7)	14 (29,2)	Ref	
Ex-fumante	20 (17,7)	10 (20,8)	1,3 (0,5 – 3,5)	0,855
Fumante	56 (49,6)	24 (50,0)	1,1 (0,5 – 2,5)	
Álcool, n [%]				
Nunca usou	33 (29,2)	12 (25,0)	Ref	
Usuário	80 (70,8)	36 (75,0)	1,2 (0,6 – 2,7)	0,587
Classificação de risco, n [%]				
Baixo risco	75 (66,4)	21 (43,8)	Ref	
Alto risco	38 (33,6)	27 (56,2)	2,5 (1,3 – 5,1)	0,008
Painel de 7 genes, n [%]				
Nenhum metilado	81 (71,7)	31 (64,6)	Ref	
Pelo menos 1 metilado	32 (28,3)	17 (35,4)	1,4 (0,7 – 2,9)	0,372
DCC n [%]				
Não metilado	99 (87,6)	35 (72,9)	Ref	
Metilado	14 (12,4)	13 (27,1)	2,6 (1,1 – 6,1)	0,026

¹ Modelo de regressão logística univariado; ² Unidade de 10 anos;

Tabela 5.6- Análise multivariada –painel de 7 genes (n=161)

Variável	OR ¹ Ajustado (95% CI)	P ¹ Ajustado
Classificação de risco Alto risco vs. Baixo risco	2,5 (1,3 – 5,0)	0,009
Painel de 7 genes Pelo menos 1 metilado vs. Nenhum metilado	1,3 (0,6 – 2,8)	0,456

¹ Modelo de regressão logística multivariado

Tabela 5.7- Análise multivariada – DCC (n=161)

Variável	OR ¹ Ajustado (95% CI)	P ¹ Ajustado
Classificação de risco Alto risco vs. Baixo risco	2,5 (1,2 – 5,0)	0,012
DCC Metilado vs. Não metilado	2,5 (1,1 – 6,0)	0,037

¹ Modelo de regressão logística multivariado

Tabela 5.8- Acurácia previsível da classificação de risco e marcadores (n=161)

Fatores	Corte	Sensibilidade (%, 95% CI)	Especificidade (%, 95% CI)	AUC (95% CI)
Classificação de risco	Alto risco	56 (41 – 71)	66 (57 – 75)	0,61 (0,53 – 0,70)
Painel de 7 genes	Pelo menos 1 metilado	35 (22 – 51)	72 (62 – 80)	0,54 (0,46 – 0,62)
DCC	Metilado	27 (15 – 42)	88 (80 – 93)	0,57 (0,50 – 0,64)
Risco e painel combinados	0,254270 ¹	71 (56 – 83)	49 (39 – 58)	0,63 (0,50 – 0,75)
	0,392219 ¹	56 (41 – 71)	66 (57 – 75)	
	0,460660 ¹	21 (10 – 35)	89 (82 – 94)	
Risco e DCC combinados	0,37007 ¹	69 (54 – 81)	59 (50 – 68)	0,65 (0,53 – 0,78)
	0,59663 ¹	15 (6 – 28)	95 (89 – 98)	

¹ Baseado no risco previsível de displasia/câncer usando o modelo de regressão logística.

5.2 LESÕES DE LÁBIO

5.2.1 Amostras

Foram avaliadas neste estudo 39 lesões de lábio, sendo 32 carcinomas epidermoides e 7 lesões de queilite actínica (QA). Entre os casos de carcinoma epidermoide de lábio, 84% eram homens com média de idade de 63,9 anos, variando entre 41 e 81 anos. As lesões de QA também foram mais frequentes em homens (71%), com média de idade de 54,8 anos. No total da amostra 92% dos pacientes relataram uso de tabaco, 90% dos pacientes com diagnóstico de câncer e 100% dos pacientes com QA. O consumo de álcool estava presente em 61% da amostra, sendo 53% dos pacientes com câncer e 85% com QA. A exposição ao sol, maior fator de risco para estas lesões, foi relatada em 75% dos casos de câncer e 85% dos casos de QA, na maioria relacionada à ocupação profissional.

5.2.2 Status de metilação do *DCC*

Os dados de metilação foram dicotomizados, ou seja, foram considerados metilados ou não metilados. Observou-se que o gene *DCC* estava metilado em 37% dos casos de carcinoma epidermoide de lábio e em 28% dos casos de QA. Não houve correlação entre o diagnóstico histológico e o *status* de metilação do *DCC* ($p=0,656$; teste de qui-quadrado).

5.2.3 Fatores de risco

Foi realizada uma análise entre os fatores de risco e o *status* de metilação do *DCC* (Tabela 5.9). Entre os casos em que se observou metilação do *DCC*, a média de idade dos pacientes foi de 67,4 anos de idade, todos os pacientes eram fumantes, e 66% relataram consumo de álcool. A exposição solar, considerada principal fator etiológico do carcinoma epidermoide de lábio, estava presente em 91% dos casos.

5.2.4 Sobrevida carcinoma epidermoide de lábio

Foram avaliados também dados relacionados a tratamento e sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermoide de lábio (Tabela 5.10). O tratamento de escolha para o carcinoma epidermoide de lábio é a remoção cirúrgica da lesão, e apenas um caso não pode ser tratado cirurgicamente devidos a outros problemas de saúde do paciente. Quatro pacientes optaram por não realizar o tratamento. Após o tratamento, 56% dos pacientes não apresentaram mais sinais da doença, com média de acompanhamento de 6 anos e 5 meses. Em 12,5% dos casos, apesar de livres de recidiva em lábio, os pacientes apresentaram lesões de carcinoma basocelular em pele. Metástases em linfonodos cervicais foram observadas em 6% dos casos e 9% apresentaram recidiva da lesão após tratamento inicial. Um paciente apresentou um segundo tumor primário em esôfago, 3 anos depois do diagnóstico de carcinoma epidermoide de lábio. Não foi encontrada nenhuma associação entre sobrevida e *status* de metilação do *DCC* ($p= 0,749$).

Tabela 5.9- Associação entre fatores de risco e metilação do *DCC*

Variável	Queilite Actínica	Câncer	p ¹
Fumante	7 (100%)	29 (90%)	
DCC metilado	1 (14%)	11 (34%)	0,297
Álcool	6 (85%)	17 (53%)	
DCC metilado	2 (28%)	8 (25%)	0,845
Sol	6 (85%)	24 (75%)	
DCC metilado	1 (14%)	11 (34%)	0,297

Tabela 5.10 – Dados de sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermoide de lábio

Prognóstico		<i>DCC</i>
Sem doença	18 (56%)	6 (50%)
Sem doença, com lesões em pele	4 (12,5%)	2 (16%)
Metástase em linfonodo cervical	2 (6%)	2 (16%)
Recidiva	3 (9%)	0
Segundo tumor primário	1 (3%)	0
Não realizou o tratamento	4 (12,5%)	2 (16%)

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico tardio é a principal causa de mortalidade e morbidade no câncer de cabeça e pescoço (77). Apesar da cavidade oral ser um local de fácil visualização, a demora na procura por atendimento médico leva ao diagnóstico em estágios avançados da doença (78). Além disso, a ocorrência de segundos tumores primários, que atinge de 10 a 40% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (79) também piora o prognóstico e diminui a sobrevida dos pacientes (80).

A radioterapia e a cirurgia são os principais tratamentos curativos no câncer de boca (81). A cirurgia pode resultar em defeitos estéticos e funcionais, enquanto a radioterapia resulta em significativos efeitos colaterais e produz perda na qualidade de vida do paciente, muitas vezes de forma permanente. A xerostomia e a cárie de radiação são os problemas mais comumente enfrentados pelo pacientes pós-radioterapia. O diagnóstico precoce pode favorecer tratamentos mais conservadores e menos agressivos, permitindo manutenção de estética e função para o paciente e, conseqüentemente, melhorando sua qualidade de vida.

Sabe-se que o carcinoma epidermoide é precedido por um acúmulo progressivo de mutações genéticas nas células epiteliais, mas ainda não se pode afirmar em que momento estas alterações moleculares modificam a morfologia celular (7). O termo displasia é utilizado quando podemos observar, no tecido, alterações arquiteturais acompanhadas de atipias citológicas. Existem várias classificações disponíveis na literatura para avaliar o risco de malignização das displasias epiteliais orais, porém a mais frequentemente utilizada divide as lesões em displasia severa, moderada e discreta, e foi proposta pela OMS em 2005 (10). Os parâmetros estabelecidos nessa classificação dividem o epitélio em três camadas, e o grau de displasia é definido de acordo com a presença de alterações arquiteturais em cada terço do epitélio. No entanto, a observação das alterações do epitélio é, muitas vezes, subjetiva e leva a diagnósticos imprecisos. A significativa variação intra e interobservadores que ocorre na classificação das displasias epiteliais orais traz dúvidas sobre o comportamento e prognóstico das lesões, e

dificulta a conduta clínica (82). Por esta razão o correto diagnóstico e classificação das displasias epiteliais orais gera várias discussões na literatura (5, 7-9, 74, 82).

A dificuldade de consenso entre as classificações e patologistas levou pesquisadores a buscarem alternativas para o diagnóstico das displasias epiteliais orais. A biópsia é ainda o padrão ouro para o diagnóstico, porém apresenta algumas limitações, como a necessidade de equipamentos e profissionais capacitados, e no caso das displasias epiteliais orais, um profissional experiente no diagnóstico histopatológico dessas lesões. Muitas vezes, as alterações moleculares, presentes nos estágios precoces da transformação maligna, não podem ser detectadas na análise morfológica (7). Assim, o uso de biomarcadores moleculares seria um importante instrumento não só no diagnóstico da lesão, mas também no prognóstico, ajudando a identificar as lesões com maior risco de transformação maligna.

O uso de fluidos corporais para avaliação do risco de transformação maligna e prognóstico pode representar um bom método de prevenção e monitoramento de lesões bucais. A possibilidade de se obter facilmente material de qualidade e em quantidade suficiente para o estudo de alterações moleculares é uma alternativa nos métodos de detecção, prevenção e prognóstico do câncer de cabeça e pescoço.

Vários estudos já validaram o uso de DNA obtido de saliva na detecção de biomarcadores do câncer de cabeça e pescoço (73, 83-86). Estudos recentes buscam ainda validar o uso de RNA de enxágues salivares e mostram resultados promissores (85-87), abrindo novas possibilidades para estudos de expressão gênica.

A análise de enxágues salivares de pacientes com lesões orais faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida pelo grupo do Dr. Joseph Califano na Divisão de Pesquisa de Câncer de Cabeça e Pescoço do Departamento de Otorrinolaringologia do *Johns Hopkins Medical Institutions*, Baltimore, MD EUA. Carvalho et al. (2008) (84) demonstraram que é possível detectar, com acurácia satisfatória, a metilação aberrante utilizando amostras de enxágues salivares.

O presente estudo se baseou em pesquisas anteriores para escolha e validação de genes como biomarcadores de malignidade em neoplasias de cabeça e pescoço. A estratégia para descoberta desses possíveis biomarcadores utilizou

genes já descritos na literatura como hipermetilados em neoplasias de cabeça e pescoço e outras neoplasias sólidas, além de genes revelados a partir de estudos de *microarray*. Dentre os 21 genes selecionados inicialmente, os sete genes estudados foram os mais expressivos, em termos de sensibilidade e especificidade, na detecção de metilação aberrante em amostras de neoplasias malignas e enxágues salivares (84).

Durante o desenvolvimento e diferenciação, o organismo dos mamíferos cria várias células específicas para o tipo de tecido a que estão designadas através do epigenoma, que determina os padrões de metilação do DNA. Dessa forma, o corpo humano pode apresentar até 180 epigenomas diferentes (66). Portanto, quando se estuda metilação do DNA é importante entender os padrões normais de metilação nos tecidos saudáveis para poder avaliar as alterações patológicas. Este estudo utilizou amostras de neoplasias malignas, lesões cancerizáveis e lesões benignas na tentativa de avaliar a metilação aberrante na progressão do câncer de boca.

As alterações epigenéticas no câncer podem envolver tanto perdas e ganhos de metilação do DNA como também alterações na conformação das histonas. Os primeiros estudos em epigenética e câncer buscaram identificar alterações na metilação de genes supressores de tumor, como *RB1* e *CDNK2A* (37). A identificação de genes especificamente hiper ou hipometilados, ou seja, silenciados ou superexpressos respectivamente, pode levar a descoberta de novos fatores importantes de iniciação e progressão tumoral (28).

Os padrões de metilação têm sido utilizados também como biomarcadores para diferentes tipos de câncer, marcadores de avaliação de risco, detecção precoce e monitoramento de prognóstico, além de indicadores de suscetibilidade e resposta à terapia oncológica (26). Estudos recentes mostram que alterações epigenéticas podem iniciar a expansão de células com potencial maligno durante estágios iniciais da tumorigênese. As mudanças no padrão epigenético que ocorrem nestas células podem determinar as alterações genéticas seguintes e a expansão clonal do tumor (26).

Este estudo encontrou uma significativa correlação entre o diagnóstico histológico e o *status* de metilação, tanto na análise do painel de 7 genes, quanto na análise do *DCC* como marcador individual. O gene *deletado no câncer colorretal*

(*DCC*) é um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 18q21 que codifica a proteína transmembrana com estrutura similar à molécula de adesão de célula neural (67) envolvida tanto na diferenciação celular epitelial como neuronal (68). A hipermetilação do gene *DCC* foi detectada no carcinoma epidermoide oral e outros cânceres de cabeça e pescoço, mama, gástrico e cólon (69, 88, 89). Carvalho et al. (69) demonstraram que o *DCC* é epigeneticamente inativado pela hipermetilação da região promotora na maioria dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Os autores observaram que o *DCC* estava hipermetilado em 40% das amostras de enxágues salivares de neoplasias malignas e foi associado com histologia, independente de outros fatores de risco, como idade e exposição ao tabaco e álcool. Esses resultados, junto com os resultados obtidos no presente estudo, sugerem que ele possa ser utilizado como um marcador individual para malignidade.

Os demais genes do painel não mostraram resultados significantes quando analisados individualmente. Apesar de todos os genes escolhidos terem sido previamente relatados como hipermetilados em neoplasias de cabeça e pescoço, a correlação com a malignidade ainda não havia sido esclarecida. A superexpressão da proteína p16 já foi associada com lesões displásicas, mas não houve correlação com o grau de displasia em estudos com imuno-histoquímica (90). De fato, a expressão da p16 é menor nas lesões malignas do que nas lesões displásicas, apontando para um papel em estágios iniciais da doença. Além disso, a p16 está associada com a infecção oral pelo vírus HPV que, por sua vez está associado ao câncer bucal (91).

O estudo de linhagens celulares de carcinoma epidermoide de boca mostrou que a metilação tem um papel chave no silenciamento do gene *DAPK1* (55). A metilação aberrante desse gene foi verificada em até 68% das neoplasias primárias. A redução na expressão da *DAPK1* está relacionada com o potencial metastático, porém sem associação com a sobrevida (92). Além disso, a metilação do gene *DAPK1*, parece estar relacionado com o consumo de álcool (93). Nosso estudo não obteve resultados estatisticamente significantes para este gene individualmente ($p=0,832$), mas apenas em conjunto com demais genes do painel estudado.

Tyler et al. (94) observaram que a hipermetilação dos genes *DAPK1* e *CDKN2A* não têm papel relevante no desenvolvimento dos carcinomas

epidermóides cutâneos, justificado pelos diferentes mecanismos de indução da tumorigênese de carcinomas epidermóides induzidos por radiação UV e por tabaco e álcool. Estudos mostram ainda que, uma vez irradiados, os queratinócitos da pele podem induzir a expressão de p16 como uma resposta adaptativa, causando a parada do ciclo celular na fase G2 (95).

O *MINT31* está localizado no cromossomo 17q21, onde frequentemente se observa perda de heterozigose em vários tipos de neoplasias. A metilação foi associada com o silenciamento do *MINT31* em neoplasias de língua e com a diminuição da sobrevivência dos pacientes, além de estar relacionado a neoplasias em estágios mais avançados (55). Provavelmente por esses fatores que, em nossa amostra, composta na sua maioria por lesões benignas e displásicas (n=161) não foi possível observar nenhuma correlação entre a metilação desse marcador e os fatores analisados.

A proteína TIMP3 se liga à matriz extracelular promovendo a inibição das metaloproteinases da matriz (96). Mutações no gene *TIMP3* causam a distrofia pseudoinflamatória de Sorsby, que é uma desordem autossômica dominante caracterizada pela neovascularização coroidal, adelgaçamento da membrana de Bruch, degeneração da retina e perda da visão (97). A expressão diminuída do gene *TIMP3* está relacionada com o aumento no crescimento neoplásico, angiogênese, invasão e metástase, principalmente pelo conseqüente aumento da atividade das metaloproteinases de matriz (MMP) (98). A hipermetilação desse gene está relacionada com a progressão neoplásica (98). Righini et al. (63) demonstraram a detecção de hipermetilação do gene *TIMP3* em 46% das amostras de enxágues salivares de pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Apesar de estudos mostrarem a hipermetilação deste gene em neoplasias de cabeça e pescoço, em nosso estudo não foi observada nenhuma correlação com os fatores de risco analisados e mais estudos são necessários para se avaliar o papel do silenciamento epigenético do *TIMP3* no carcinoma epidermoide de boca.

A expressão do gene *MGMT* protege linhagens celulares de mamíferos de transições espontâneas de G:C para A:T (99). Foi observado como sendo mais frequentemente metilado em metástases do que em neoplasias primárias de cabeça e pescoço (100). Nakagawachi et al. (101) demonstraram que o silenciamento do

MGMT é dependente da epigenética no câncer. Estudos mostram que a detecção da hipermetilação do *MGMT* na saliva de pacientes com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é viável e ainda, que está relacionada com carcinógenos do tabaco (73). A inativação do *MGMT* leva a mutações de transição o que pode ser verificado pelo acúmulo de altos níveis desse tipo de mutação em oncogenes e genes supressores de tumor (102), como por exemplo mutações nos genes *RAS* (103) e *TP53* (104). Em nosso estudo, a metilação desse gene não foi relacionada individualmente com o diagnóstico histopatológico ou fatores de risco ($p= 0,426$), estando metilado em apenas 17,1% dos casos de carcinoma epidermoide.

A ciclina A1 está envolvida na apoptose e interrupção do crescimento a jusante da p53 (65). Tokumaru et al. (66) observaram que o silenciamento do gene *CCNA1* pode estar relacionado a eventos epigenéticos nos carcinomas de cabeça e pescoço e, também, que a metilação desse gene é inversamente relacionada com o *status* mutacional da p53 em neoplasias primárias. A expressão induzida da ciclina A1 em linhagens celulares de carcinomas de cabeça e pescoço resultou na indução do tipo nativo de p53, sugerindo que ela possa ser um importante amplificador de sinal de atividade de p53 em carcinomas de cabeça e pescoço (66). Os autores observaram ainda que a expressão de ciclina A1 não é tolerada em neoplasias quando a p53 está em seu estado nativo. Além disso, estudos mostram que o *status* de metilação do gene *CCNA1* é tumor-específico nos carcinomas de cabeça e pescoço (65). Nosso estudo encontrou uma forte correlação entre o *status* de metilação desse gene com o diagnóstico histológico ($p=0,0003$). Como houve também uma forte associação entre este gene e o gene *DCC*, e como o intervalo de confiança do gene *DCC* foi mais confiável que o do gene *CCNA1*, optou-se por realizar as demais associações com o gene *DCC*, a fim de otimizar os resultados obtidos. De qualquer maneira, sua forte relação com a via de sinalização da p53, apontam para uma participação, direta ou indireta, desse gene, na carcinogênese de cabeça e pescoço.

O principal fator etiológico associado ao carcinoma epidermoide de boca é o tabagismo, a principal causa de câncer passível de prevenção, responsável também por outros tipos de neoplasias, entre elas, o câncer de pulmão (1, 77). Curiosamente, o tipo mais frequente de câncer de boca é o carcinoma epidermoide de lábio, cujo principal fator etiológico é a exposição à radiação ultravioleta (UV)

(105). A radiação UV é considerada não só um iniciador da carcinogênese como também um promotor de malignização (105-107). O lábio encontra-se em uma região de transição mucocutânea e compartilha características com a pele. Apesar de sua alta incidência entre as neoplasias de boca, possui um baixo índice de mortalidade, principalmente quando tratado em estágios iniciais (2, 17). A intenção do nosso estudo foi avaliar a diferença na metilação nas lesões intraorais e labiais. Como o gene *DCC* apresentou resultados muito superiores que os demais genes do painel inicial, optou-se por estudar apenas ele nas lesões labiais, para otimização dos resultados.

Este estudo incluiu uma amostra de pacientes de alto risco, tanto para as lesões intraorais como labiais. Nas lesões intraorais, a idade média dos pacientes foi de 54,1 anos, com história de consumo de tabaco e álcool, na maioria dos casos, e lesões com diferentes graus de displasia epitelial e neoplasia maligna, na tentativa de correlacionar o *status* de metilação e a progressão do câncer. Entre as lesões de lábio, a média de idade foi de 63 anos, e além da história de tabagismo e etilismo, presente na maioria dos casos, a exposição solar também foi relatada por 75% dos pacientes.

No estudo da lesões intraorais, a avaliação de risco clínico foi realizado por cirurgiões-dentistas experientes, baseados nas proposições da OMS (10), classificando as lesões em alto risco e baixo risco de malignização. Quando associados o risco clínico e o *status* de metilação, foi observada uma correlação estatisticamente significativa ($p= 0,008$), apesar de nem sempre os diagnósticos histológicos serem compatíveis com a classificação clínica de risco (Tabela 5.1). Pudemos observar que, mesmo profissionais experientes, apresentaram dificuldade na correta classificação clínica das lesões. Também na análise multivariada, a classificação de risco foi associada com a histologia ($p= 0,009$), mostrando que a inspeção visual, apesar de limitada quanto a sensibilidade e especificidade, pode ser importante no diagnóstico precoce. Além disso, a combinação da inspeção clínica e uso de biomarcadores de malignidade pode resultar em um excelente método de prevenção e diagnóstico de displasias epiteliais orais.

Quando associados os fatores de risco com o *status* de metilação do painel de genes, apenas a idade mostrou uma correlação significativa ($p=0,014$). Apesar de

já estar bem estabelecida na literatura a associação do tabaco e álcool com o câncer de boca, neste estudo não se obteve nenhuma correlação. Isto pode ser explicado pela característica de alto risco da amostra estudada, na qual 49,4% dos pacientes fazem uso de tabaco e 72,2% relataram o consumo de álcool. Seria necessária a comparação da população estudada com uma amostra de pacientes sem fatores de risco associados para verificar se há correlação entre a metilação dos genes do painel e do gene *DCC* com consumo de tabaco e álcool. As alterações epigenéticas podem auxiliar no entendimento sobre como fatores externos podem aumentar os riscos de doenças nos indivíduos (108). Brait et al. (109) demonstraram que é possível detectar a hipermetilação de genes relacionados ao câncer no plasma de uma população livre da doença e que é possível relacionar os dados de metilação com a exposição a fatores de risco, tais como dieta, tabaco e álcool. Os autores observaram ainda que a metilação pode representar alterações pré-neoplásicas antes de qualquer sinal ou sintoma de doença. As lesões labiais estão altamente relacionadas com a exposição solar e nossa amostra teve 75% dos pacientes com história desse fator de risco, ainda que não tenha sido possível relacionar com a metilação do *DCC*.

O Hospital Erasto Gaertner é uma instituição filantrópica que atende cerca de 80% dos seus pacientes pelo SUS, provenientes da região metropolitana de Curitiba e interior do Estado. Atende um grande número de pacientes que trabalham expostos ao sol, como agricultores e pedreiros, que têm pouca ou nenhuma orientação sobre os cuidados com a exposição solar e os riscos de desenvolver câncer de pele e mesmo de lábio. A presença de lesões ulceradas indolores em lábio não chamam a atenção e atrasam a procura por atendimento médico. Neste estudo, não encontramos nenhuma correlação entre os fatores de risco e a metilação do *DCC*. As lesões intraorais e labiais possuem mecanismos de carcinogênese distintos, com mutações e padrões de metilações específicos de acordo com a sua etiologia e, portanto, não é possível a utilização dos mesmos marcadores moleculares nessas duas lesões.

Nas lesões intraorais, a associação entre o *status* de metilação e a classificação de risco resultou num aumento da sensibilidade com uma perda mínima da especificidade no painel de 7 genes. Da mesma forma, quando analisado individualmente, o gene *DCC* foi associado com a classificação de risco, com

sensibilidade e especificidade similar ao painel de 7 genes, mostrando sua excelente performance como marcador individual de malignização.

Ainda na análise das lesões intraorais, o exame clínico de lesões da cavidade oral resultou em uma classificação de risco com 56% de sensibilidade, que foi aumentado para 69% quando associado com o *status* de metilação do *DCC*. Isto mostra que a inspeção visual realizada por profissionais treinados pode ser complementada quando associada com um marcador molecular confiável. Essa combinação poderia oferecer ao profissional de saúde uma avaliação de risco das lesões mais precisa e uma atenção personalizada para cada lesão.

Já nas lesões de lábio, não observamos a mesma correlação do *DCC* ($p=0,656$) com o diagnóstico histológico. Provavelmente os resultados menos expressivos do gene quando analisado em lábio, se devem à etiologia diferenciada em relação às lesões intraorais. As alterações de carcinogênese causados pela radiação UV atingem principalmente os mecanismos de reparo do DNA e consequentemente diferentes vias de sinalização acabam sendo afetadas. Da mesma forma, não encontramos associação entre tabaco e álcool com a metilação dos genes em questão, porém novamente a população estudada é considerada de alto risco pelos hábitos apresentados.

As diferentes etiologias apresentadas pelas lesões intraoral e labial, apontam para necessidade de diferentes biomarcadores de progressão de malignidade. O fato de o lábio ser uma região de transição faz com que compartilhe fatores de risco com ambas regiões, intra e extraoral. O melhor índice de sucesso na terapia do carcinoma epidermoide de lábio pode ser atribuído a sua localização, mas apresenta altos índices de morbidade, com redução da abertura da rima bucal e consequente dificuldade de reabilitação oral quando necessário.

O carcinoma epidermoide de lábio, apesar de ser classificado como uma câncer de boca, requer, por sua etiologia diferenciada, estudos específicos de seus mecanismos de progressão de malignidade (82).

Para este estudo, todas as amostras de saliva foram coletadas por profissionais sem treinamento prévio e sem experiência no protocolo de coleta adotado. A quantidade de DNA coletada foi suficiente para realização da análise de

vários genes, com boa qualidade. Os bons resultados obtidos neste estudo mostram um método fácil e eficiente para obtenção de amostras e estudo de biomarcadores.

O biomarcador ideal deve ser altamente específico, quantitativo, fácil de ser detectado e com baixo custo. Este estudo mostrou que o enxágue salivar pode ser obtido por profissionais sem treinamento prévio e também que a técnica de qMSP pode ter uma boa relação custo-benefício, além de permitir rápida análise. O uso desta técnica como um método para detecção precoce de lesões malignas e cancerizáveis reforça sua utilidade nas estratégias de detecção e prevenção do câncer de boca.

Marcadores moleculares também podem auxiliar no diagnóstico de doença oculta através de técnicas não invasivas, como no uso de fluidos corporais. Enxágues salivares mostraram ser um instrumento útil para o diagnóstico de várias doenças como infecções e doenças autoimunes, e também foi demonstrado como um eficiente material para o uso com técnicas moleculares para detecção de metilação aberrante, expressão gênica, detecção de HPV e miRNA (73, 85, 110, 111).

A avaliação das lesões labiais deve levar em consideração seus aspectos etiológicos na busca de um biomarcador, com sensibilidade e especificidade, para melhorar seu diagnóstico. Além disso, o uso de enxágue salivar para o estudo dessas lesões não seria o mais apropriado, pois não conteria células descamadas da região labial para uma análise confiável.

A radiação UV é o fator etiológico fundamental das lesões malignas e cancerizáveis de lábio e o gene *DCC* parece não ter nenhuma associação com as alterações moleculares da fotocarcinogênese. Próximos estudos devem levar em consideração os fatores etiológicos no momento da seleção dos genes.

7 CONCLUSÕES

Através do estudo de metilação aberrante no carcinoma epidermoide de boca, podemos concluir que:

O painel de 7 genes estudado pode ser utilizado como marcador de malignização, para lesões intraorais.

O gene *DCC* pode ser utilizado como marcador independente de malignização em lesões intraorais

O *status* de metilação do gene *DCC* não pode ser usado na detecção aberrante nas lesões de lábio estudadas, mostrando que a radiação UV provoca alterações moleculares distintas das lesões intraorais.

REFERÊNCIAS

1. INCA. Estatísticas do Câncer. <http://www1incagovbr/vigilancia/> 2010.
2. Kubler AC, de Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30:504-9.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225-49.
4. Goodwin WJ, Jr. Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: when do the ends justify the means? *Laryngoscope.* 2000;110:1-18.
5. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc.* 2002;68:617-21.
6. Kuffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol.* 2002;38:125-30.
7. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:127-33.
8. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36:575-80.
9. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008;37:1-10.
10. Barnes LL, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology & Genetics. Head and Neck Tumors.* Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) 2005; IARC Press.

11. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol.* 2007;43:107-15.
12. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009;45:324-34.
13. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006;59:445-53.
14. WHO WHO. Tobacco Prevention. Available from: <http://www.who.int/topics/tobacco/en/> 13/09/2010.
15. Zitsch RP, 3rd, Park CW, Renner GJ, Rea JL. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995;113:589-96.
16. Vukadinovic M, Jezdic Z, Petrovic M, Medenica LM, Lens M. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:675-9.
17. de Visscher JG, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27:199-203.
18. Horta MC, de Assis LA, de Souza AF, de Araujo VC, Gomez RS, Aguiar MC. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007;36:88-92.
19. Gooris PJ, Schaapveld M, Vermey A, Otter R, Rispens A, Roodenburg JL. Regional guideline for diagnosis and treatment of squamous cell carcinoma of the lip: what is the level of compliance? *Int J Qual Health Care.* 2001;13:143-50.
20. Crozier E, Sumer BD. Head and neck cancer. *Med Clin North Am.* 2010;94:1031-46.
21. Hall SF, Groome PA, Rothwell D, Dixon PF. Using the TNM system to predict survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res.* 1998;18:4777-8.

22. Waddington CH. Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1939;25:299-307.
23. Doi A, Park IH, Wen B, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. Nat Genet. 2009; 1-5.
24. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. Cell. 2007;128:683-92.
25. Tost J. DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. Mol Biotechnol. 2009;44:71-81.
26. Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer 2006;6:107-16.
27. Esteller M. Epigenetics in Cancer. N Engl J Med. 2008;358:1148- 59.
28. Feinberg APT, B. . The history of cancer epigenetics. Nature Reviews. 2004; 4:143- 52.
29. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell. 2007;128:693-705.
30. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, et al. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. Nat Genet. 2008;40:897-903.
31. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in Cancer. Carcinogenesis. 2010;31:27-36.
32. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 1993;75:843-54.
33. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116:281-97.
34. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 2007;302:1-12.

35. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002; 16:6-21.
36. Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol.* 2007;213:384-90.
37. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983;301:89-92.
38. Feinberg AP. Imprinting of a genomic domain of 11p15 and loss of imprinting in cancer: an introduction. *Cancer Res.* 1999;59:1743s-6s.
39. Sakai Tea. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American Journal of Human Genetics.* 1991;48:880-8.
40. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med.* 1995;1:686-92.
41. Herman JG, Merlo A, Mao L, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res.* 1995;55:4525-30.
42. Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 9700-4.
43. Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35:101-8.
44. Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol.* 2006;7:77-82.
45. Velentza AV, Schumacher AM, Weiss C, Egli M, Watterson DM. A protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression: structure, activity, and discovery of peptide substrates. *J Biol Chem.* 2001;276:38956-65.

46. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol.* 2004;40:145-53.
47. Murao K, Kubo Y, Ohtani N, Hara E, Arase S. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *Br J Dermatol.* 2006;155:999-1005.
48. Kato K, Hara A, Kuno T, et al. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132:735-43.
49. Wong TS, Man MW, Lam AK, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR. *Eur J Cancer.* 2003;39:1881-7.
50. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2001;163:221-8.
51. Abdel-Fattah R, Glick A, Rehman I, Maiberger P, Hennings H. Methylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter suppresses expression in mouse skin tumors and varies with the tumor induction protocol. *Int J Cancer.* 2006;118:527-31.
52. Esteller M, Gaidano G, Goodman SN, et al. Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:26-32.
53. Sorg UR, Kleff V, Fanaei S, et al. O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene therapy targeting haematopoietic stem cells: studies addressing safety issues. *DNA Repair (Amst).* 2007; 6:1197-209.
54. Zuo C, Ai L, Ratliff P, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:967-75.
55. Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002;8:3164-71.

56. Shen L, Catalano PJ, Benson AB, 3rd, O'Dwyer P, Hamilton SR, Issa JP. Association between DNA methylation and shortened survival in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6093-8.
57. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res.* 1999;59:4535-41.
58. Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, et al. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2004;279:8592-601.
59. Baker AH, George SJ, Zaltsman AB, Murphy G, Newby AC. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3. *Br J Cancer.* 1999;79:1347-55.
60. Ninomiya I, Kawakami K, Fushida S, et al. Quantitative detection of TIMP-3 promoter hypermethylation and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008;20:1489-95.
61. Darnton SJ, Hardie LJ, Muc RS, Wild CP, Casson AG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer.* 2005;115:351-8.
62. Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, et al. An immunohistochemical study of TIMP-3 expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2004;91:1556-60.
63. Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, et al. Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007;13:1179-85.
64. Muller-Tidow C, Bornemann C, Diederichs S, et al. Analyses of the genomic methylation status of the human cyclin A1 promoter by a novel real-time PCR-based methodology. *FEBS Lett.* 2001;490:75-8.

65. Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer*. 2006;94:561-8.
66. Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, et al. Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing. *Cancer Res*. 2004;64:5982-7.
67. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*. 1990;247:49-56.
68. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev*. 1994;8:1174-83.
69. Carvalho AL, Chuang A, Jiang WW, et al. Deleted in colorectal cancer is a putative conditional tumor-suppressor gene inactivated by promoter hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2006;66:9401-7.
70. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23:707-12.
71. Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med*. 1996;2:1035-7.
72. Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, et al. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science*. 1996;271:659-62.
73. Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res*. 2001;61:939-42.
74. Murdoch-Kinch CA. Oral medicine: advances in diagnostic procedures. *J Calif Dent Assoc*. 1999; 27:773-80.
75. Kaufman E, Lamster IB. Analysis of saliva for periodontal diagnosis--a review. *J Clin Periodontol*. 2000;27:453-65.

76. Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1370-5.
77. Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L. The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2004;13:139-42.
78. Subramanian S, Sankaranarayanan R, Bapat B, et al. Cost-effectiveness of oral cancer screening: results from a cluster randomized controlled trial in India. *Bull World Health Organ.* 2009;87:200-6.
79. Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1995;75:1343-53.
80. Tsou YA, Lin MH, Hua CH, et al. Survival outcome by early chemoradiation therapy salvage or early surgical salvage for the treatment of hypopharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;137:711-6.
81. Bhide SA, Nutting CM. Advances in radiotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2010;46:439-41.
82. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol.* 2007;43:224-31.
83. Nagler RM. Saliva as a tool for oral cancer diagnosis and prognosis. *Oral Oncol.* 2009;45:1006-10.
84. Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008;14:97-107.
85. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009;15:5473-7.
86. Park NJ, Li Y, Yu T, Brinkman BM, Wong DT. Characterization of RNA in saliva. *Clin Chem.* 2006;52:988-94.

87. Lee JM, Garon E, Wong DT. Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:206-11.
88. Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, et al. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer.* 2005;116:407-14.
89. Tamura G. Promoter methylation status of tumor suppressor and tumor-related genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Histol Histopathol.* 2004;19:221-8.
90. Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol.* 2006;19:1310-6.
91. Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem.* 2003;51:1291-7.
92. Nayak CS, Carvalho AL, Jeronimo C, et al. Positive correlation of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 and death-associated protein kinase hypermethylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2007;117:1376-80.
93. Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, et al. Promotor hypermethylation of p14ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2005;41:614-22.
94. Tyler LN, Ai L, Zuo C, Fan CY, Smoller BR. Analysis of promoter hypermethylation of death-associated protein kinase and p16 tumor suppressor genes in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol.* 2003;16:660-4.
95. Pavey S, Russell T, Gabrielli B. G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene.* 2001;20:6103-10.
96. Lee MH, Atkinson S, Murphy G. Identification of the extracellular matrix (ECM) binding motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and effective transfer to TIMP-1. *J Biol Chem.* 2007;282:6887-98.

97. Weber BH, Vogt G, Pruetz RC, Stohr H, Felbor U. Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat Genet.* 1994;8:352-6.
98. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:13787-95.
99. Christmann M, Pick M, Lage H, Schadendorf D, Kaina B. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT. *Int J Cancer.* 2001;92:123-9.
100. Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene.* 2004;23:4014-22.
101. Nakagawachi T, Soejima H, Urano T, et al. Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene.* 2003;22:8835-44.
102. Esteller M, Risques RA, Toyota M, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001;61:4689-92.
103. Munirajan AK, Mohanprasad BK, Shanmugam G, Tsuchida N. Detection of a rare point mutation at codon 59 and relatively high incidence of H-ras mutation in Indian oral cancer. *Int J Oncol.* 1998;13:971-4.
104. Munirajan AK, Tutsumi-Ishii Y, Mohanprasad BK, et al. p53 gene mutations in oral carcinomas from India. *Int J Cancer.* 1996;66:297-300.
105. Nishigori C. Cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci.* 2006;5:208-14.
106. Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195:298-308.

107. Yamaguchi Y, Takahashi K, Zmudzka BZ, et al. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J.* 2006;20:1486-8.
108. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl: 245-54.
109. Brait M, Ford JG, Papaiahgari S, et al. Association between lifestyle factors and CpG island methylation in a cancer-free population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18:2984-91.
110. Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, et al. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2005;117:605-10.
111. Lallemand B, Evrard A, Combescure C, et al. Clinical relevance of nine transcriptional molecular markers for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma in tissue and saliva rinse. *BMC Cancer.* 2009;9:370.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Erasto Gaertner

Curitiba, 05 de maio de 2008

Dra. Juliana Lucena Schussel
Pesquisadora Responsável

Prezada Sra.,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como **“Estudo de Eventos Epigenéticos na Fotocarcinogênese de Lábio”**, cujo número de protocolo é **P.P. nº 1672**, e tem como pesquisadora responsável V. Sa. foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e **aprovado**.

Ressaltamos que seu estudo só poderá ter início após aprovado pelo CEPEP.

Solicitamos que seja enviado um relatório semestral informando sobre o andamento do projeto e ao término do trabalho um relatório final, para darmos fechamento ao projeto. Cada alteração realizada no projeto deve ser comunicada imediatamente ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,


Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do CEP

Membros do CEP:

Enfª Ana Paula Hey – Enfermeira Especialista
 Enfª Andréa Wulf Pereira de Melo Tratch – Enfermeira Especialista
 Enfª Angelita Visentin – Enfermeira Especialista
 Fisio. Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta Especialista
 Dra. Clarice Nana Yamanouchi – Médica Especialista
 Dinarte Orlandi – Estatístico Especialista
 Edenice de Oliveira Santana – Enfermeira Especialista

Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico Especialista e Mestre
 Iolanda Galvão – Psicóloga Clínica
 Dr. João Antonio Guerreiro – Médico Especialista
 Dr. Jordan Zanetti Silva – Médico e Advogado
 Jose Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas
 Dra. Paola Andréa Galbiatti Pedruzzi – Médica Especialista
 Wanda Aparecida Silva – Representante da Comunidade

ANEXO B- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FOUSP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****Comitê de Ética em Pesquisa****DECLARAÇÃO**

Diante de Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo está ciente da aprovação, Parecer CEP P.P. Nº 1672, do projeto de pesquisa intitulado "**Estudo de Eventos Epigenéticos na Fotocarcinogênese de Lábio**", de responsabilidade da Pesquisadora Juliana Lucena Schussel, sob orientação da Professora Doutora Marília Trierveiler Martins, não havendo nenhuma oposição por parte deste CEP, com relação a sua realização.

São Paulo, 04 de agosto de 2010.


Prof. Dra. **Marcia Turola Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP