



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Análise do envolvimento das enzimas metiltransferases SUV420 no câncer de boca

Beatriz Itai Haupt Ribeiro

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

Brasília

2018

Análise do envolvimento das enzimas metiltransferases SUV420 no câncer de boca

Trabalho de Conclusão de Curso de
graduação em Ciências Farmacêuticas
apresentado junto à Faculdade de Ciências
da Saúde da Universidade de Brasília.

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

Brasília

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Paulo e Yurika, que sempre cuidaram tão bem de mim e sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando, que por muitas vezes me botaram em primeiro lugar e sempre fizeram de tudo por mim. Essa conquista é nossa.

À minha orientadora, Dora, pela oportunidade da pesquisa, por ter aceitado ser minha orientadora, por toda ajuda e aconselhamento nesse processo, sem você nada disso teria acontecido.

À minha amiga, Tai, por ser a melhor amiga possível, sempre me escutar, me ajudar e estar ao meu lado, mesmo estando longe, por ser minha inspiração, obrigada.

À todos os meus amigos, mas principalmente, João, Bia, Bruno, Caio, Ganso, obrigado pela companhia e amizade.

Às técnicas Luma, Tércia, Larissa, Mari e Fábio, por toda ajuda no laboratório durante os anos de pesquisa.

À todos aqueles que contribuíram, bem ou mal, para meu crescimento pessoal e profissional ao longo desses anos de faculdade.

Ao Professor Glauco e ao projeto de jiu-jitsu, por me mostrarem a batalha interna, por me fazerem crescer espiritualmente e no tatame.

À Bruna, por toda ajuda.

À Amora, Nuvem, Tigresa e Pandora.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

cDNA	Fita de DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IARC	International Agency for Research on Cancer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
SUV	Supressor of Variegation
KMTs	Lisina Metiltransferases
HMTs	Histona Metiltransferases
mRNA	RNA mensageiro

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Características essenciais do câncer.....	2
Figura 2: Demonstração das proteínas histonas.	6
Figura 3: Reação catalítica de SUV420H1.....	8
Figura 4: Reações dos estados de mono, di e trimetilação e seus catalisadores.....	9
Figura 5: Representação do método indireto de imuno-histoquímica.....	15
Figura 6: Comparação dos resultados de imuno-histoquímica.....	25
Tabela 1: Amostras utilizadas para análise de PCR quantitativa.....	18
Tabela 2: Intensidade da marcação positiva nas amostras normais (N) e tumorais (T) pela técnica de imuno-histoquímica.....	26

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Gênero dos pacientes com câncer de boca incluídos no estudo.....	17
Gráfico 2: Localização anatômica das lesões de câncer de boca de acordo com os dados clínicos dos pacientes.....	18
Gráfico 3: Expressão de <i>SUV420H1</i> em amostras normais e tumorais em análise de qPCR, pelo cálculo matemático $2^{-\Delta Ct}$	20
Gráfico 4: Expressão de <i>SUV420H2</i> em amostras normais e tumorais em análise de qPCR, pelo cálculo matemático $2^{-\Delta Ct}$	20
Gráfico 5: Expressão de RNAm de <i>SUV420H1</i> pela técnica de RNA-seq em 499 pacientes com câncer de cabeça e pescoço relatada pela mediana de FPKM pelo TCGA (The Cancer Genome Atlas).....	21
Gráfico 6: Expressão de RNAm de <i>SUV420H2</i> pela técnica de RNA-seq em 499 pacientes com câncer de cabeça e pescoço relatada pela mediana de FPKM pelo TCGA (The Cancer Genome Atlas).....	22
Gráfico 7: Taxa de sobrevida total em 499 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, de acordo com o nível de expressão de RNAm de <i>SUV420H2</i> pelo método de RNA-seq.....	22
Gráfico 8: Intensidade da positividade de marcação para <i>SUV420H1</i> em amostras de carcinoma oral de células escamosas (Normais=6 e Tumorais=9). Média de intensidade 0,356.....	27
Gráfico 9: Intensidade da positividade de marcação para <i>SUV420H2</i> em amostras de carcinoma oral de células escamosas (Normais=6 e Tumorais=9). Média de intensidade 0,344.....	27

RESUMO

Já é de conhecimento que as alterações de base genética influenciam o surgimento e desenvolvimento desta do câncer oral, porém estudos mais recentes mostraram que as modificações de base epigenética, que não alteram a sequência do DNA, também influenciam o processo. Dentre as alterações epigenéticas existentes está a metilação das proteínas histonas, que pode ser realizada por várias famílias de enzimas metiltransferases, responsáveis pelas alterações pós-traducionais em proteínas. Alterações nestas proteínas, fundamentais no enovelamento e compactação ou afrouxamento do material genético, podem interferir na atividade gênica da célula. Assim, a desregulação destas enzimas vem sendo associada à alguns tipos de doenças, entre elas, o câncer. Porém, ainda há poucos estudos sobre o papel das metiltransferases proteicas no câncer de boca. Este estudo buscou avaliar o perfil de expressão proteica e gênica das enzimas metiltransferases proteicas SUV420H1 e SUV420H2 em pacientes com câncer de boca. Foram feitas análises de imuno-histoquímica e PCR quantitativa em amostras tumorais e em margens normais, para comparação. Pela técnica de PCR quantitativa, as amostras tumorais apresentaram menor expressão de *SUV420H1* (0,078) e *SUV420H2* (0,009), quando comparadas com as margens normais (0,795 para *SUV420H1* e 0,457 para *SUV420H2*). O maior entendimento sobre o funcionamento destas enzimas, suas possíveis alterações e comportamento irá ajudar a estabelecer melhores métodos prognósticos e diagnósticos no futuro e assim melhorar o manejo dos pacientes com câncer de boca.

Palavras-chave: câncer de boca, epigenética, histonas, metiltransferase, SUV420, KMT5, expressão gênica, expressão proteica.

ABSTRACT

It is already known that genetic modifications influence the development of oral cancer, but more recent studies have shown that epigenetic modifications, which do not alter the DNA sequence, also influence the process. Among the existing epigenetic changes is the methylation of histone proteins, which can be performed by several families of methyltransferase enzymes, responsible for the post-translational changes in proteins. Alterations in these enzymes, fundamental in the folding and compacting or loosening of the genetic material, may interfere in the cell's gene activity. Thus, the deregulation of these enzymes has been associated with some types of diseases and among them is cancer. However, there are still few studies on the role of protein methyltransferases in oral cancer. This study aimed to evaluate protein and gene expression profile of the methyltransferases enzymes SUV420H1 and SUV420H2 in patients with oral cancer. Analyzes of immunohistochemistry and quantitative PCR were done on tumor samples and on normal margins, for comparison. Using quantitative PCR, tumor samples showed decreased expression of *SUV420H1*(0,078) and *SUV420H2* (0,009), when compared to normal margins (0,795 for *SUV420H1* and 0,457 for *SUV420H2*). Further understanding of the functioning of these enzymes, their possible changes and behavior will help establish better prognostic and diagnostic methods in the future and thus improve the management of patients with oral cancer.

Keywords: oral cancer, epigenetics, histones, methyltransferases, SUV420, KMT5, gene expression.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O CÂNCER.....	1
1.2 CÂNCER DE BOCA.....	3
1.3 EPIGENÉTICA.....	4
1.4 ENZIMAS METILTRANSFERASES PROTEICAS.....	6
1.5 FAMÍLIA SUV DE METILTRANSFERASES.....	8
2. JUSTIFICATIVA.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 OBJETIVO GERAL.....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. SUJEITOS E MÉTODOS.....	13
4.1 SUJEITOS.....	13
4.2 PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	13
4.3 PESQUISA <i>IN SILICO</i>	14
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	15
5. RESULTADOS.....	17
5.1 EXPRESSÃO DOS GENES <i>SUV420</i> POR PCR QUANTITATIVA (qPCR).....	17
5.2 PESQUISA <i>IN SILICO</i>	21
5.3 EXPRESSÃO DAS ENZIMAS <i>SUV420</i> POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	23
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	28
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31

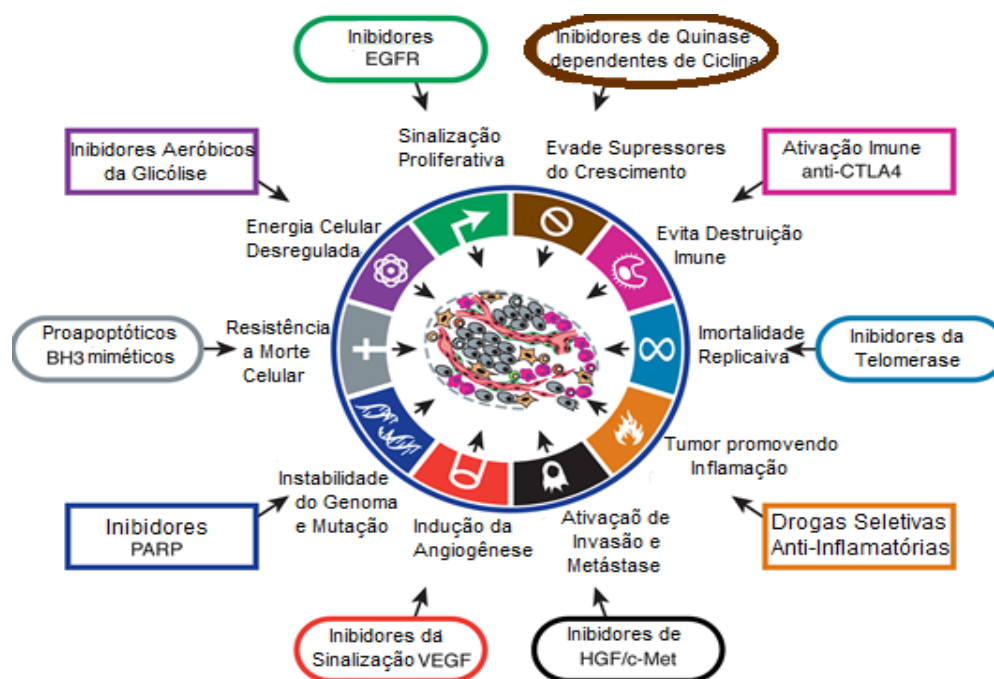
1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER

As neoplasias malignas, mais conhecidas como câncer, se dão pela alta taxa de divisão celular de uma célula em específico, com crescimento desordenado e autônomo, resistentes à morte celular, com indução de angiogênese no local, inibindo os fatores supressores de crescimento, acompanhada geralmente de baixa ou nenhuma diferenciação celular. Esse desenvolvimento de transformação maligna possui 10 características bem típicas, como mostra a Figura 1. As células malignas também apresentam núcleos grandes, geralmente ocupando quase todo o espaço citoplasmático, podendo estar presentes mais de um, além de nucléolos evidentes, pleomorfismo nuclear e celular, entre outras alterações [ROBBINS & COTRAN, 2018].

O processo de carcinogênese se inicia com uma alteração, podendo ela ser genética, quando há mutação e ocorre alteração na sequência das bases nitrogenadas do DNA, o que leva à uma leitura incorreta do mesmo, com falhas na produção de moléculas como proteínas, por exemplo, que podem afetar processos como a regulação do ciclo celular. A carcinogênese pode ainda ocorrer por alterações epigenéticas, quando não há alteração na sequência das bases nitrogenadas, mas sim alteração na sinalização dos processos celulares. Condições ambientais, como radiação solar, etilismo, tabagismo e a falta de qualidade de vida, como sedentarismo, alimentação inadequada com carência de íons e vitaminas e outros, podem contribuir para o início de uma alteração genética ou epigenética e assim levar a uma neoplasia [ROBBINS & COTRAN, 2018].

Figura 1: Características essenciais do câncer.



Fonte: Hanahan D., Weinberg A. R. Hallmarks of Cancer: Next Generation. Cell. Volume 144, Issue 5, 646-674. 2011. Adaptado.

Após o aparecimento da alteração, a geração de produtos como proteínas fica comprometida e a regulação do ciclo celular também pode se alterar. Tais fatores levam a uma divisão celular desregulada, muitas vezes de células que ainda não chegaram ao estágio final de diferenciação e maturação, contribuindo para o surgimento de muitas células, pouco diferenciadas. Este crescimento pode ser tão aumentado que inicia uma invasão de espaços vizinhos, com formação de novos vasos sanguíneos para nutrir o tumor. A invasão pode atingir também vasos sanguíneos e linfáticos, que levam as células do tumor para novas áreas no organismo, gerando outros tumores, chamados de secundários, ocorrendo assim o processo chamado de metástase [ROBBINS & COTRAN, 2018].

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estimou-se que aproximadamente 9,6 milhões de pessoas morreriam de câncer no ano de 2018, sendo o câncer a causa de 1 em 6 mortes. A segunda maior causa de óbitos mundialmente é o câncer, gerando mais mortes que a infecção por vírus HIV, malária e tuberculose, juntas [OMS, 2018].

1.2 CÂNCER DE BOCA

O carcinoma oral de células escamosas, também conhecido como epidermóide e espinocelular, é uma neoplasia maligna que se origina no tecido epitelial de revestimento da boca. O carcinoma de boca possui alta taxa de mortalidade, por ser muito invasivo e possuir elevada possibilidade de causar metástase nodal e invasão local, que após a invasão, atinge os vasos sanguíneos, levando ao desenvolvimento de metástase [LU et al, 2018; YAMAMOTO et al, 2018]. Compõe o maior subgrupo de câncer de cabeça e pescoço, sendo o tipo de câncer mais comum da cavidade oral, sendo a língua e o assoalho bucal as sublocalidades de maior ocorrência. [BRENER et al, 2007; MELCHERS et al, 2015]. Na região oral, podem surgir 45 tipos diferentes de tumores, de acordo com a classificação da OMS [IARC, 2005]. De acordo com a localização do tumor na cavidade oral, o comportamento clínico pode variar, sendo afetado também pela ocorrência ou não de metástase, o que interfere diretamente no prognóstico do paciente [BRENER et al, 2007; PATIL et al, 2018, POZZI et al, 2013].

De acordo com dados da estimativa de novos casos para o biênio 2018-2019 do INCA, poderão ocorrer 14.700 casos novos de câncer de boca apenas no Brasil, número que corresponde à aproximadamente 3% de todos os casos de câncer no país, sendo o 6º câncer que mais ocorre na escala mundial [INCA, 2018; YAMAMOTO et al, 2018]. O carcinoma de células escamosas é responsável por mais de 90% dos tumores classificados como malignos na cavidade oral e região da orofaringe, que podem ser diferenciados em epiteliais, mesenquimais ou hematolinfóides, dependendo do seu tecido de origem [IARC, 2005].

As partes superiores do sistema respiratório e do sistema digestório estão mais propensas à exposição aos fatores etiológicos como álcool e o tabaco, por serem a primeira região que entra em contato com estes compostos quando são usados por um indivíduo, a porta de entrada da substância no corpo, sendo uma região com um risco maior de ter alterações, que podem ir se acumulando e assim desenvolver uma futura lesão maligna. Em tabagistas, o risco de desenvolver um câncer de células escamosas é de 6,3 vezes maior do que em não-fumantes, diminuindo para um nível próximo de quem nunca fumou se o hábito de fumar for interrompido por um período de pelo menos 10 anos. O risco está presente para usuários de todas as formas de tabaco, sejam elas o cigarro mais comum,

charutos, cachimbo, tabaco mascado ou cigarro de palha. Quando usados em conjunto, o álcool potencializa o efeito carcinogênico do tabaco, pois são substâncias de efeito sinérgico, podendo elevar o risco de originar um câncer de boca em até 100 vezes. É importante ressaltar que, mesmo com o uso apenas de tabaco ou apenas de álcool, ainda há risco elevado, podendo este até ser maior quando apenas um deles é consumido em enormes quantidades, e elevada frequência, do que quando ambos são consumidos em conjunto, mas em menores quantidades [BRENER et al, 2007; CHOI and MYERS, 2008; IARC, 2005].

Os pacientes diagnosticados com câncer de boca possuem ainda um risco de 10 a 35% de desenvolver um câncer secundário, dotado das mesmas alterações genéticas do primário, no trato respiratório e digestivo superior, explicado pela teoria da cancerização de campo, quando grandes áreas de células de um tecido ou órgão são afetadas por alterações carcinogênicas, elevando a chance de ocorrência de um tumor secundário, que leva a um menor índice de sobrevivência quando comparado ao primário. Geralmente o processo de carcinogênese tem início com lesões pequenas, que progridem, podendo surgir sintomas, em casos mais avançados, como crescimento de massas na mucosa e ulcerações, dores, mau hálito, dificuldade na fala e/ou mastigação, dificuldade ao abrir a boca, sangramentos e consequente perda de peso. Estes fatos ressaltam a importância do cuidado bucal e da visita periódica ao dentista, das campanhas contra o consumo de tabaco e dos programas de educação em saúde, pois quanto antes for feito o diagnóstico e o tratamento, menos mutilante e agressivo será o tratamento, maiores as chances de sucesso ao final de todo o processo, resultando em maior qualidade de vida para o paciente ao final do ciclo diagnóstico-tratamento. Devido a este fator, geralmente, pessoas com baixo acesso à tratamentos bucais são mais atingidas por esse tipo de câncer. Apesar dos avanços nas pesquisas em câncer de boca, as taxas de sobrevivência dos pacientes não tiveram melhora ao longo dos últimos 30 anos [IARC, 2005; MOHAN M and JAGANNATHAN N, 2014; NAGATA et al, 2012].

1.3 EPIGENÉTICA

As alterações epigenéticas, como já mencionado, são aquelas modificações que não interferem na sequência de bases nitrogenadas das fitas de DNA, mas agem modificando a

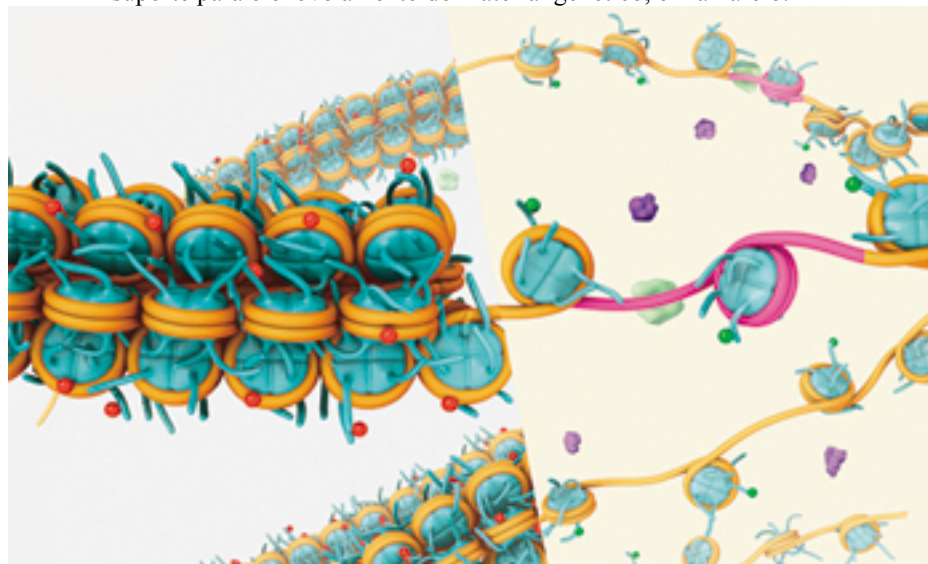
estrutura da cromatina nos processos de transcrição, tradução e pós-tradução, modificando a informação final. Os processos de epigenética podem ser divididos em quatro grupos: (1) metilação do DNA; (2) modificações covalentes nas histonas e outras proteínas – acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e ADP-ribosilação; (3) mecanismos não-covalentes como o remodelamento do nucleossomo e (4) RNAs não-codificantes, pequenas moléculas que não codificam proteínas, mas que podem, por exemplo, inibir a expressão de algum gene alvo. As reações são reversíveis, variando de acordo com a demanda e contexto celular [BECK et al, 2012; LU et al, 2018; POGRIBNY et al, 2007]

O DNA é formado por uma fita dupla de nucleotídeos enfileirados e emparelhados, sendo uma molécula muito longa, que necessita ser compactada e diminuída para que caiba dentro do meio celular. Assim, existem proteínas, as histonas, que possuem papel no enovelamento da molécula de DNA, sendo uma estrutura base onde o DNA se enrola, originando a estrutura da cromatina, que a nível mais condensado forma o nucleossomo, que na sua estrutura mais condensada forma o cromossomo. Mas esses níveis de organização não são fixos, podendo parte do material genético estar disponível para leitura e transcrição, enquanto há partes mais condensadas, impossibilitando seu uso. Logo, a organização formada não é uma estrutura inerte, podendo mudar de acordo com as condições do meio celular e com a sinalização recebida, podendo a cromatina estar mais relaxada, contendo genes ativos mais expostos, sendo chamada de eucromatina, ou pode ter regiões mais condensadas, contendo em sua maioria genes inativos, como as regiões do centrômero e telômeros, sendo chamada de heterocromatina. Assim, os estados da cromatina influenciam na manutenção do genoma, sendo de extrema importância, já que a instabilidade do genoma aumenta sua exposição e chances de variáveis, pois pode levar a um aumento da produção de fatores oncogênicos, além de poder ocorrer mutações, falha no reparo, entre outros [BANNISTER and KOUZARIDES, 2011; JORGENSEN, SCHOTTA E SORENSEN, 2013; GURSOY-YUZUGULLU et al, 2017].

Como as histonas (Figura 2) formam a parte central da cromatina, quando ocorre uma modificação covalente pós-traducional nelas, a estrutura da cromatina muda, podendo ficar mais relaxada ou mais condensada, dependendo da modificação que foi feita. Quando está mais relaxada é possível ocorrer a leitura gênica e quando está mais condensada não acontece o processo de transcrição. A compactação da cromatina que ocorre nas fases de mitose e interfase é um dos mecanismos de modulação para manter a integridade do

genoma, e assim, se dá a regulação gênica por parte das histonas. [GURSOY-YUZUGULLU et al, 2017; JORGENSEN, SCHOTTA E SORENSEN, 2013].

Figura 2: Demonstração das proteínas histonas e sua cauda N-terminal em azul, exercendo sua função de suporte para o enovelamento do material genético, em amarelo.



Fonte: AXS Biomedical Animation Studio. Disponível em: < <https://axs3d.com/services/scientific-illustration/>>. Acesso em 24 de nov de 2018.

1.4 ENZIMAS METILTRANSFERASES PROTEICAS

As metiltransferases proteicas são responsáveis por executar as alterações pós-traducionais de metilação em proteínas como as histonas, com a finalidade de assegurar o desenvolvimento e funcionamento normal do organismo. Estas enzimas têm função de catalisar a reação de metilação, adicionando um, dois ou três grupos metil na cauda das histonas, conseqüentemente modificando a estrutura da cromatina, que influencia os padrões de expressão gênica durante o processo de diferenciação celular e desenvolvimento embrionário. [LU et al, 2018; SCHOTTA et al, 2008]. A parte N-terminal da cauda das histonas pode sofrer uma variedade de modificações pós-traducionais como metilação, acetilação, ubiquitinação, sumoilação e fosforilação em resíduos específicos. Essas modificações podem levar tanto à ativação quanto à repressão da atividade gênica, dependendo de qual resíduo sofreu modificação e qual foi a modificação. As histonas possuem 24 sítios de metilação, em resíduos de lisina e arginina, que podem possuir

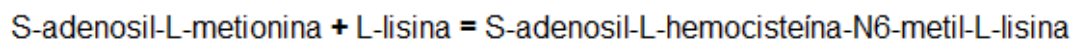
diversas funções a depender de sua localização, sendo a metilação do resíduo de lisina relacionada à ativação transcricional ou repressão, dependendo do grau de metilação e do resíduo metilado. Quando há uma desregulação da metilação que resulta em excesso dessa marcação ou a sua falta, pode ocorrer a perda do controle dos genes supressores tumorais ou dos proto-oncogenes, por exemplo [NAGATA et al, 2012; POGRIBNY et al, 2007; SHARMA, KELLY, JONES, 2010] .

Dentre esses sítios passíveis de metilação em resíduos de lisina e arginina, dois tipos de metilação de proteína foram caracterizados: metilação do átomo de nitrogênio da cadeia lateral guanidina da arginina por proteínas metiltransferase de arginina (PRMTs) e metilação de grupos e-amino de resíduos de lisina. As modificações na lisina podem ser mono, di ou trimetiladas. Enquanto na histona H3 podem ser modificados os resíduos de lisina K4, K9, K27 e K79, apenas o resíduo K20 é modificado na histona H4. A maioria das regiões de ilhas CpG, regiões intergênicas, sequências repetidas de DNA e heterocromatina constitutiva são altamente metiladas, por exemplo, mantendo-se inativas. [BALAKRISHNAN, MILAVETZ, 2010; DILLON et al, 2005; KAPOOR-VAZIRANI, KAGEY and VERTINO, 2011].

A metilação de resíduos de lisina em histonas é realizada com notável especificidade por um grupo de enzimas chamadas histonas metiltransferases (HMTs), todas pertencendo às proteínas da família com o domínio-SET conservado, com exceção da Dot1 metiltransferase [BALAKRISHNAN, MILAVETZ, 2010].

A função das proteínas de domínio-SET é transferir um grupo metil do S-adenosil-L-metionina para o grupo amino de um resíduo de lisina na histona ou em outra proteína, deixando a lisina metilada e o cofator S-adenosil-L-homocisteína, como mostrado na Figura 3. A metilação de resíduos de lisina específicos de histona serve como uma modificação epigenética pós-traducional que controla a expressão de genes como marcadores para o recrutamento de complexos particulares que direcionam a organização da cromatina [DILLON et al, 2005].

Figura 3: Reação catalítica de SUV420H1.



Fonte: UniProt. Disponível em: < <https://www.uniprot.org/uniprot/Q4FZB7>>. Acesso em 3 de out de 2018.

Ao todo fazem parte da família de lisina metiltransferases cerca de 34 genes, dentre eles os grupos *SUV39*, *EHMT*, *SETD*, *SMYD*, *EZH*, *PRD* e *KMT5*, que no subgrupo *KMT5* está contido *SUV420H1* e *SUV420H2* [HGNC, 2018].

1.5 FAMÍLIA SUV DE METILTRANSFERASES

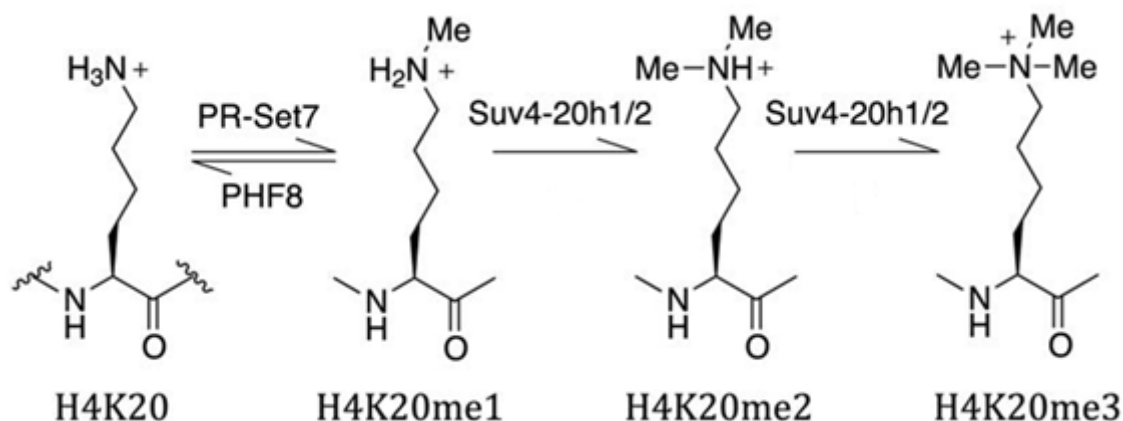
A família *SUV* é composta por genes que codificam proteínas com atividade enzimática, que fazem a adição de um, dois ou três grupos metil em resíduos de lisina de histonas, responsáveis pela geração de diferentes sítios e estados de metilação nas caudas de histonas, criando sítios de ligação, que irão sinalizar para proteínas efetoras. O processo de metilação específico dessa família é determinado pelo mecanismo denominado troca fenilalanina-tirosina. São participantes da família SUV de proteínas metiltransferases *SUV39H1* e *SUV39H2*, que catalisam a metilação do resíduo 9 de lisina da histona H3 e *SUV420H1* e *SUV420H2*, que catalisam a metilação do resíduo 20 de lisina da histona H4 [SOUTHALL, CRONIN, WILSON, 2014].

SUV420H1 (supressor of variegation 4-20 homólogo 1) é composta por 885 aminoácidos e sua atividade enzimática é conferida pelo domínio SET que possui. É responsável pela dimetilação do resíduo 20 de lisina, levando ao reparo gênico, tendo papel no ponto de checagem da mitose. [SERRANO et al, 2013; SCHOTTA et al, 2004]. *SUV420H2* (supressor of variegation 4-20 homólogo 2) é formada por 462 aminoácidos e sua atuação permite o estabelecimento da heterocromatina constitutiva, funcionando como uma marcação de regiões silenciadas e também para interação com membros da família da proteína Retinoblastoma (RB), ajudando assim a manter a integridade do genoma. Possui

expressão subregulada em câncer de mama, o que sugere um papel como supressor de tumor, mostrando a enzima como reguladora de eventos transcricionais e é responsável por catalisar a trimetilação [JORGENSEN, SCHOTTA E SORENSEN, 2013; POGRIBNY et al, 2006; SCHOTTA et al, 2004].

A reação de monometilação da K20 da H4 é catalisada por SET7 e SET8, enzimas pertencentes ao mesmo grupo de proteínas que possuem o domínio-SET das enzimas SUV, ligadas a repressão transcricional e a inativação gênica, sendo os estados seguintes de metilação catalisados por SUV420H1 e SUV420H2. A forma de trimetilação da histona precisa da existência prévia das formas mono e dimetiladas como substrato para que ocorra sua reação, sendo um processo sequencial (Figura 4). Quando há exclusão da forma primária gera-se um decréscimo na formação das formas seguintes. Em estudos realizados com ratos knockout para os genes SUV foi possível perceber a perda dos estados de dimetilação e trimetilação, com aumento da monometilação em situações de estresse e de reparo defeituoso no DNA danificado, mostrando a interdependência entre os estados de metilação, já que na ausência dos estados de dimetilação e trimetilação a monometilação não é usada como substrato, ficando em maior quantidade. Foi possível ainda perceber atraso no desenvolvimento dos ratos, com ocorrência de morte perinatal, que pode estar ligada ao fato da metilação ser uma sinalização de recrutamento de proteínas que realizam o reparo do DNA, demonstrando como o papel desempenhado por estas enzimas é importante para manter a integridade do genoma [BALAKRISHNAN, MILAVETZ, 2010; BECK et al, 2012; GURSOY-YUZUGULLU et al, 2017; JORGENSEN, SCHOTTA E SORENSEN, 2013; SCHOTTA et al, 2008].

Figura 4: Reações dos estados de mono, di e trimetilação e seus catalisadores.



Fonte: Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg D. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev.* 2012;26(4):325-37

A metilação do resíduo 20 na histona H4 é considerada uma marca evolutiva que foi conservada na evolução das espécies, desde os fungos até o ser humano, sendo uma das primeiras modificações epigenéticas a ser descoberta. Estudos utilizando a técnica de espectrometria de massa mostraram que o estado dimetilado é o mais abundante em histonas H4 [LU et al, 2018; SCHOTTA et al, 2008; TSANG, NINGHE and UNDERHILL, 2010]. As formas mono e dimetiladas em H4K20 foram relacionadas com o reparo do DNA, mantendo a estabilidade do genoma e regulação da replicação. [BALAKRISHNAN, MILAVETZ, 2010; BECK et al, 2012; JORGENSEN, SCHOTTA E SORENSEN, 2013].

As histonas H4K20 e H3K9 juntas, nas formas trimetiladas, foram associadas com a manutenção dos telômeros. A perda da atividade enzimática de SUV420H1, com consequente perda da forma trimetilada de H4K20, resulta em alongamento dos telômeros, que pode levar as células à imortalização, com um crescimento aberrante, e que por fim, pode levar ao câncer. Esse mecanismo é possivelmente gerado pela perda dos sinais de repressão no final dos cromossomos, que abrem os telômeros para o alongamento feito pela telomerase [BALAKRISHNAN, MILAVETZ, 2010].

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença que possui alta taxa de incidência mundial, sendo a segunda causadora de mortes por doenças no mundo, com número de casos sempre crescentes. O câncer de boca, representado em sua maioria pelo carcinoma de células escamosas (CCE) também tem uma incidência crescente, com alta taxa de mortalidade, que infelizmente segue estagnada. No Brasil, o câncer de boca ainda é relativamente pouco divulgado para a população, não havendo campanhas de educação em saúde tão presentes como nos casos de câncer de mama e colo do útero, resultando em menor conhecimento sobre os fatores de risco e sobre o surgimento desse tipo de câncer, o que pode levar a diagnósticos tardios. Há evidências de que quando o diagnóstico precoce é feito, o prognóstico é melhor. Porém, isso só é possível quando há acesso da população aos serviços básicos de saúde oral e geral. Faltam ainda marcadores para o câncer de boca que possam ser usados clinicamente para definir, de forma mais acurada, o diagnóstico ou prognóstico dos pacientes com câncer de boca, resultando em escolhas mais adequadas de tratamentos.

Já foi demonstrada, em diversos estudos, a expressão anormal de metiltransferases de histonas (HMTases) em cânceres humanos, mas para o câncer de boca ainda há pouca informação sobre o papel dessas enzimas na iniciação e progressão tumoral. Considerando que as metiltransferases de histonas efetuam modificações reversíveis, se for encontrada alguma alteração nas enzimas SUV420 que esteja associada ao câncer de boca, que seja de valor diagnóstico ou prognóstico, é possível a elaboração de um exame molecular diagnóstico ou até mesmo terapias que possam reverter essas alterações, inibindo a progressão tumoral.

Assim, neste estudo, procuramos identificar o perfil de expressão gênica e proteica das enzimas SUV420H1 e SUV420H2 no câncer de boca, a fim de esclarecer se estas enzimas estão associadas com a carcinogênese oral.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar o papel das enzimas metiltransferases SUV420H1 e SUV420H2 no câncer de boca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação do perfil de expressão dos genes *SUV420H1* e *SUV420H2* em amostras frescas de tecido tumoral e de margem normal, de pacientes com câncer de boca;
- b) Análise *in silico* sobre as proteínas SUV420, utilizando-se bancos de dados públicos, incluindo o *The Human Protein Atlas* (THPA) e o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA);
- c) Avaliação da expressão e distribuição tecidual das proteínas SUV420H1 e SUV420H2 em amostras parafinizadas de biópsia de pacientes com câncer de boca, comparadas com áreas normais como controle;
- d) Análise comparativa dos dados obtidos, buscando consolidar informações sobre o comportamento das enzimas SUV420H1 e SUV420H2 no câncer de boca.

4. SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 SUJEITOS

As amostras cirúrgicas frescas tumorais, assim como suas margens normais, de pacientes diagnosticados com câncer de boca foram coletadas no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), seguindo os padrões éticos e de acordo com a aprovação do CEP local, sob o número de registro 9371/2003. Foram utilizadas 45 amostras frescas de margem normal e 42 amostras frescas de tecido tumoral de pacientes com câncer de boca. Do total de amostras, 12 normais foram excluídas do estudo por não terem expressado o gene endógeno no ensaio de expressão gênica, provavelmente por estarem muito degradadas.

Foram selecionadas 15 amostras de câncer de boca parafinizadas, provenientes do Hospital da Universidade de Brasília (HUB), do arquivo do setor de Anatomia Patológica do HUB. Este estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde – UnB sob o número de protocolo 024/12. Destas, 5 amostras foram excluídas por haver divergência entre sua identificação e o conteúdo dos blocos, não correspondendo ao diagnóstico de carcinoma de células escamosas.

4.2 PCR QUANTITATIVA (qPCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica laboratorial usada para aumentar exponencialmente uma parte, um fragmento, da molécula de DNA ou cDNA (RNAm), usando a enzima polimerase, que sintetiza a fita de RNA ou uma fita de DNA simples. Na reação, é feito um *pool* contendo bases nitrogenadas, íons, o material de DNA que vai ser amplificado, *primers* ou iniciadores, uma solução tampão e a enzima polimerase, que é extraída de uma bactéria. Esse *pool* é colocado em equipamentos que realizam ciclos de temperatura. Primeiro eleva-se a temperatura para que ocorra desnaturação da dupla fita de DNA, gerando fitas simples da molécula. À uma temperatura entre 50-60 °C, o iniciador se liga à fita simples, ocorrendo o anelamento. Em seguida, a temperatura aumenta novamente, em torno dos 80°C, e a enzima polimerase, após pareada com o iniciador, usa os nucleotídeos para formar uma nova fita, acontecendo o alongamento. Vários ciclos acontecem repetidamente, resultando ao final no aumento do segmento de DNA escolhido.

Na PCR em tempo real, enquanto ocorre a amplificação do material genético, uma fluorescência é liberada a cada molécula formada, sendo detectada pelo equipamento no momento em que ocorre, por isso é chamada de tempo real.

As amostras de tumor e de margem normal tiveram seu RNA mensageiro (RNAm) extraído para análise do perfil de expressão dos genes *SUV420H1* e *SUV420H2*, com o kit AllPrep Universal Kit Qiagen, seguindo o protocolo do fabricante. O RNA total extraído foi convertido em cDNA usando-se transcriptase reversa e iniciadores com calda poli T do kit Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Foram usados ensaios inventoriados (primers e sondas de hidrólise Taqman da Applied Biosystems) específicos para cada gene, β -actina (gene endógeno), *SUV420H1* e *SUV420H2*, usando-se o equipamento StepOnePlus, da Applied Biosystems (Foster City, Califórnia, EUA).

Os dados obtidos pelo StepOnePlus foram usados para a análise de quantificação relativa (QR) da expressão gênica, usando-se o método do Δ Ct [PFAFFL, 2001]. Esses dados então foram submetidos à análise de variância, usando-se o teste de Mann-Whitney para dados não-paramétricos. Os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de p foi < 0.05 (IC 95%).

Está sendo conduzida a análise de associação dos dados clínicos dos pacientes com o resultado da expressão gênica. Os dados clínicos estão sendo coletados dos prontuários de cada paciente, incluindo: idade, gênero, local da lesão, uso de tabaco e/ou álcool, recidivas, metástases e sobrevida, assim como dados do estadiamento e do exame histopatológico.

4.3 PESQUISA *IN SILICO*

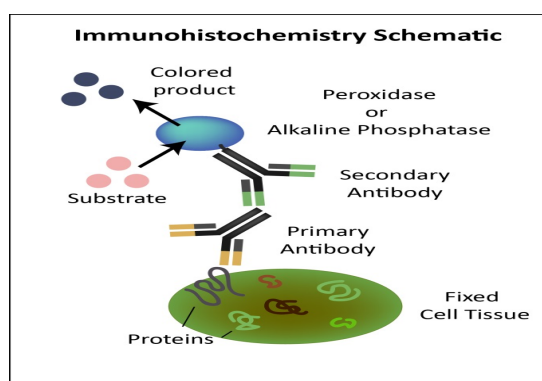
A pesquisa *in silico* foi realizada pela busca de informações em bancos de dados já estabelecidos. O *The Human Protein Atlas* (THPA) é um banco de dados suíço que mapeou todas as proteínas humanas em células, tecidos e órgãos, normais ou tumorais, por métodos diversos como imuno-histoquímica, imunocitoquímica, espectrometria de massa, entre outros. O banco é dividido em três partes, de acordo com aspectos particulares das análises: *Tissue Atlas*, *Cell Atlas* e *Pathology Atlas*. Todos os dados são de acesso aberto. O segundo banco de dados utilizado foi o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que possui

mapas multi-dimensionais sobre as mudanças genômicas chave em 33 tipos de câncer. As informações estão disponíveis publicamente.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica ocorre mediante a detecção de antígenos, que podem ser moléculas como proteínas, produtos celulares, através da ligação destes antígenos à anticorpos específicos, que podem estar conjugados à enzimas, fluoróforos ou cromóforos, produzindo uma reação que irá gerar cor, podendo ser vista na leitura por microscópio. A detecção pode ser feita pelos métodos direto ou indireto. No método direto há somente o anticorpo primário ligado ao antígeno. Já no método indireto (Figura 5), o anticorpo primário se liga diretamente ao antígeno e um anticorpo secundário com um marcador se liga ao anticorpo primário, ocorrendo assim uma amplificação do sinal para melhor visualização da marcação.

Figura 5: Representação do método indireto de imuno-histoquímica.



Fonte: Disponível em <<https://rockland-inc.com/ihc-products.aspx>>. Acesso em 10 de ago de 2018.

No estudo em questão foi utilizado o método indireto, com o anticorpo secundário ligado à biotina, onde um complexo de estreptavidina com enzima peroxidase irá reagir com o peróxido de hidrogênio, gerando uma marcação amarronzada no local.

Para checar a distribuição tecidual das proteínas, neste estudo foram utilizados os anticorpos IgG policlonais de coelho anti-SUV420H1 e anti-SUV420H2 da empresa Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA.

As lâminas contendo os cortes parafinizados das amostras foram colocadas em uma sequência de xilol e álcool, para desparafinizar e hidratar as amostras de tecido. Em

seguida, foram colocadas em banho-maria ou sob vapor a 95°C, mergulhadas em tampão citrato pH 6,2 para recuperação antigênica da amostra, por 30 minutos. Depois ficaram mais 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, ficaram mergulhadas por 30 minutos em peróxido de oxigênio, para bloqueio da peroxidase endógena, evitando assim reação inespecífica do cromógeno. Adicionou-se o anticorpo primário, deixando as amostras incubadas em câmara úmida durante a noite (cerca de 12 horas). Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário conjugado com a biotina, por 20 minutos e então adicionou-se a solução com estreptavidina com peroxidase, por mais 20 minutos. Aplicou-se então o cromógeno DAB, que reage com a peroxidase, conferindo marcação amarronzada para a marcação positiva. Por último, fez-se a contra-coloração com hematoxilina, para que o tecido não marcado também apareça na leitura com microscópio óptico. As lâminas passaram por álcool e xilol para serem desidratadas e foram finalizadas com meio de montagem e lamínula, para conservação.

Foram definidas as concentrações de 1:50 para SUV420H1 e 1:150 para SUV420H2.

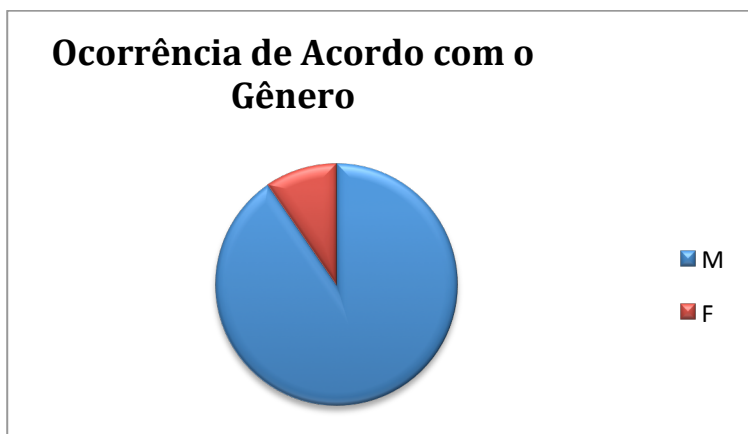
Além da análise morfológica qualitativa realizada em microscópio óptico, os resultados da marcação da reação foram quantificados utilizando o Scanner ScanScope Aperio® que escaneou as lâminas e demarcou as áreas marcadas de tecidos e aquelas não marcadas, comparando a intensidade da marcação.

5. RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO DOS GENES *SUV420* POR PCR QUANTITATIVA (qPCR)

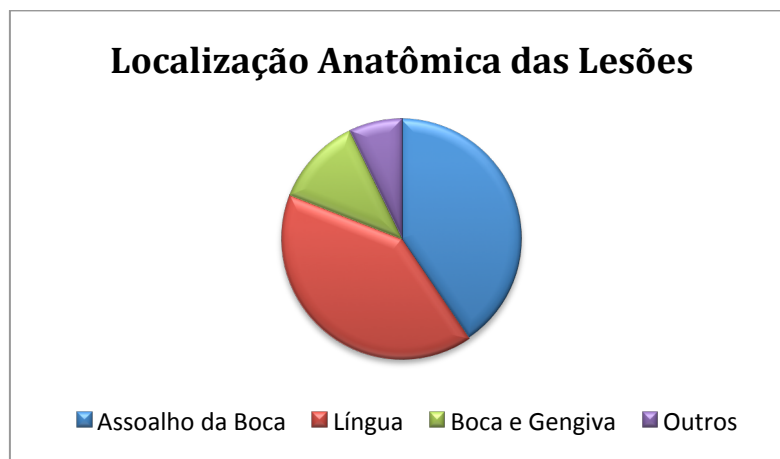
Na coleta dos dados clínicos dos pacientes com câncer de boca foi possível perceber que a maioria pertencia ao sexo masculino, correspondendo a 38 do total de pacientes, sendo apenas 4 do sexo feminino, como mostrado no Gráfico 1, onde M representa o sexo masculino e F o sexo feminino.

Gráfico 1: Gênero dos pacientes com câncer de boca incluídos no estudo.



Quanto ao local da lesão notou-se que as principais áreas anatômicas de ocorrência do câncer de boca nestes pacientes foram o assoalho da boca e a língua, com representação de 17 pacientes cada, somando ao todo 34 pacientes que tiveram câncer nessas áreas anatômicas, como mostra o Gráfico 2. Os dados clínicos são muito importantes, pois associam características dos pacientes com a doença e a expressão gênica estudada, auxiliando assim no processo de entendimento da carcinogênese de boca.

Gráfico 2: Localização anatômica das lesões de câncer de boca de acordo com os dados clínicos dos pacientes.



As amostras foram analisadas simultaneamente para *β-actina* (gene endógeno) e os genes *SUV420H1* e *SUV420H2*. Foram feitas 7 placas de 96 poços, com a análise das 3 sondas juntas para uma mesma amostra, significando que os três genes foram analisados na mesma placa, sob as mesmas condições. Em seguida foram feitas 3 placas de repetição, para confirmação de alguns resultados que se mostraram duvidosos ou imprecisos. Do total de amostras, 12 normais (destacadas em vermelho na Tabela 1) foram excluídas do estudo por não terem expressado o gene endógeno, provavelmente por estarem muito degradadas.

Tabela 1: Amostras utilizadas para análise de PCR quantitativa.

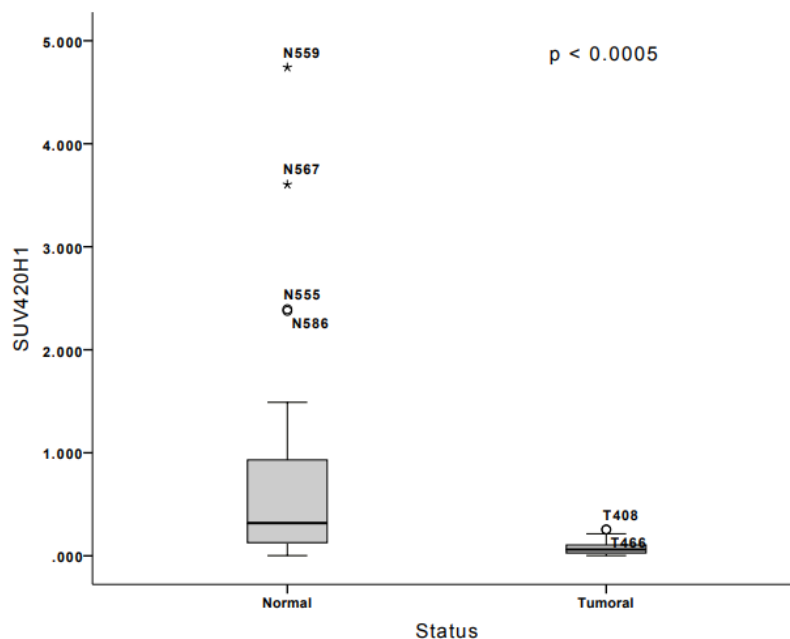
AMOSTRAS			
NORMAL		TUMORAL	
N554	N580	T396	T429
N555	N581	T398	T430
N556	N582	T399	T431
N557	N583	T400	T432
N559	N584	T401	T462
N560	N585	T404	T463
N561	N586	T406	T464
N562	N587	T408	T465
N563	N588	T409	T466
N564	N590	T410	T467
N565	N591	T411	T468
N566	N592	T412	T469

N567	N593	T414	T470
N568	N595	T415	T471
N569	N596	T416	T472
N571	N599	T418	T473
N572	N601	T419	T474
N573	N602	T420	T475
N574	N603	T421	T476
N575	N604	T423	
N576	N605	T424	
N577	N606	T426	
N579		T428	

Em vermelho, amostras excluídas da análise.

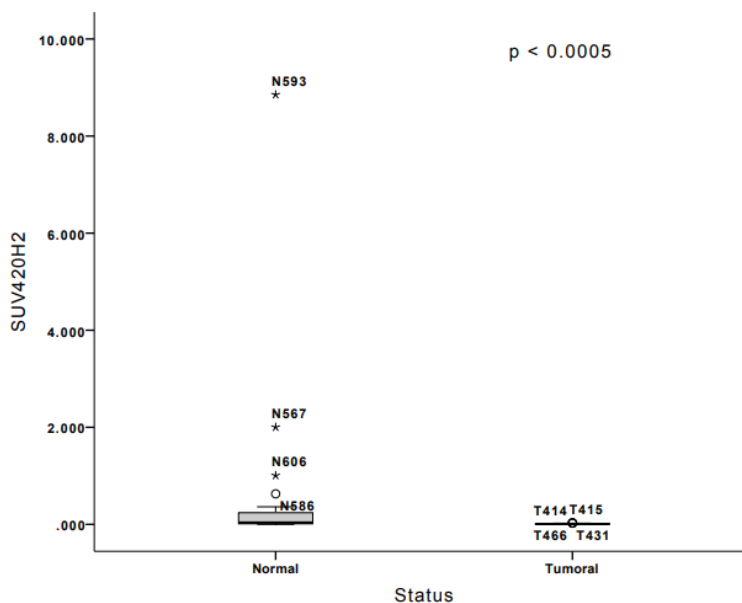
De acordo com os resultados obtidos da análise estatística realizada com os dados da quantificação relativa, é possível perceber que as amostras normais apresentaram uma expressão maior dos genes das metiltransferases *SUV420H1* e *SUV420H2* quando comparadas com a expressão das amostras tumorais (Gráficos 3 e 4), com diferença significativa ($p < 0.0005$) entre as médias. É possível notar que para as amostras normais o resultado de expressão gênica foi bem heterogêneo, sendo bem visível a presença de *outliers*, enquanto que para as amostras tumorais notou-se um resultado mais homogêneo e consistente. Quanto à diferença de expressão entre as metiltransferases, notou-se que *SUV420H1* tem uma expressão geral maior do que *SUV420H2* (*SUV420H1* em tecidos normais (média de QR: 0,795) e em tecidos tumorais (média de QR: 0,078); *SUV420H2* em tecidos normais (média de QR: 0,457) e em tecidos tumorais (média de QR: 0,009).

Gráfico 3: Expressão de *SUV420H1* em amostras normais e tumorais em análise de qPCR, pelo cálculo matemático $2^{-\Delta Ct}$.



	Normal	Tumoral
Média da Expressão de <i>SUV420H1</i> (QR)	0,795	0,078

Gráfico 4: Expressão de *SUV420H2* em amostras normais e tumorais em análise de qPCR, pelo cálculo matemático $2^{-\Delta Ct}$.

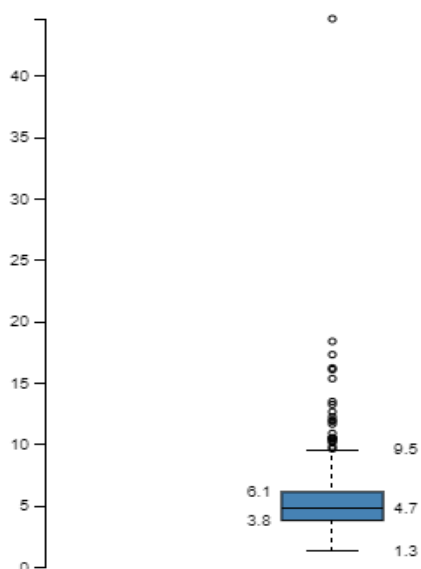


	Normal	Tumoral
Média da Expressão de <i>SUV420H2</i> (QR)	0,457	0,009

5.2 PESQUISA *IN SILICO*

Com base nos dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), o The Human Protein Atlas analisou o RNAm de *SUV420H1* em 499 amostras de câncer de cabeça e pescoço, que inclui a região da boca, orofaringe, faringe e laringe, de pacientes de diferentes idades, tanto do sexo feminino quanto masculino. A quantificação da expressão do RNAm de *SUV420H1* pela mediana de FPKM se encontra no Gráfico 5, onde é possível notar que a sua expressão é mais homogênea entre os pacientes quando comparado com a de *SUV420H2*. A expressão de *SUV420H1* foi maior que a de *SUV420H2*.

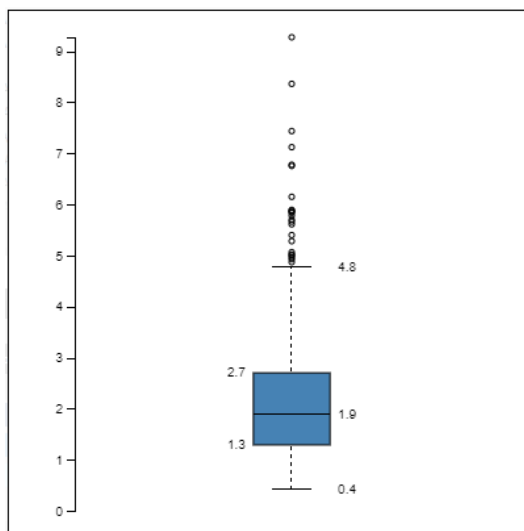
Gráfico 5: Expressão de RNAm de *SUV420H1* pela técnica de RNA-seq em 499 pacientes com câncer de cabeça e pescoço relatada pela mediana de FPKM pelo TCGA (The Cancer Genome Atlas).



Fonte: *The Human Protein Atlas*. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110066-KMT5C/pathology/tissue/head+and+neck+cancer>>. Acesso em 20 de set de 2018.

O The Human Protein Atlas, usando dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) também analisou o RNAm de *SUV420H2* em 499 amostras de câncer de cabeça e pescoço. A quantificação do RNAm de *SUV420H2* pela mediana de FPKM se encontra no Gráfico 6, onde é possível ver que a expressão é bem heterogênea entre os pacientes, mostrando uma baixa expressão geral dos 499 pacientes.

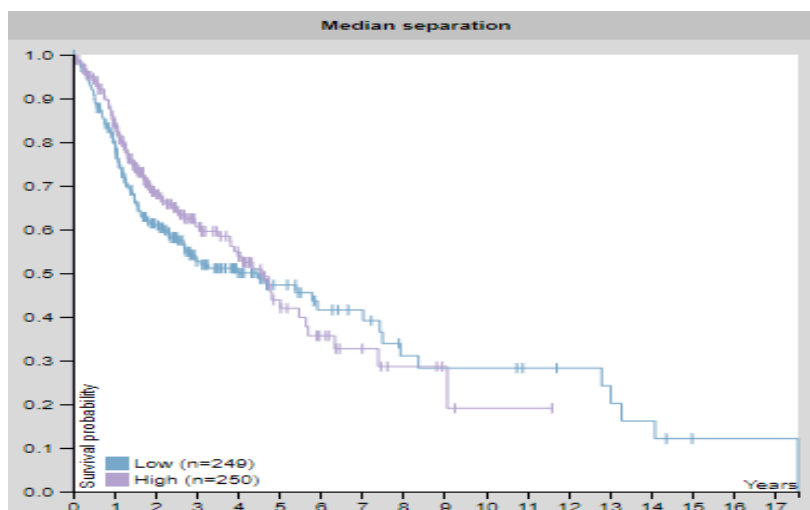
Gráfico 6: Expressão de RNAm de *SUV420H2* pela técnica de RNA-seq em 499 pacientes com câncer de cabeça e pescoço relatada pela mediana de FPKM pelo TCGA (The Cancer Genome Atlas).



Fonte: *The Human Protein Atlas*. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110066-KMT5C/pathology/tissue/head+and+neck+cancer>>. Acesso em 20 de set de 2018.

Foi realizada também uma curva de sobrevivência, pelo The Human Protein Atlas, usando-se o teste de Kaplan-Meier, correlacionando os resultados do nível de expressão de mRNA de *SUV420H2* e a sobrevivência dos pacientes, em anos. De acordo com o valor de FPKM para RNAm, foi definido um ponto de corte e os pacientes foram distribuídos em dois grupos, de alta e baixa expressão, e examinou-se o prognóstico, sendo excluídos aqueles com valor de FPKM menor que 1 por serem considerados valores muito baixos. Para o Gráfico 7 foi estabelecido o ponto de corte de 1.9 FPKM.

Gráfico 7: Taxa de sobrevivência total em 499 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, de acordo com o nível de expressão de RNAm de *SUV420H2* pelo método de RNA-seq.



Fonte: *The Human Protein Atlas*. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000110066-KMT5C/pathology/tissue/head+and+neck+cancer>>. Acesso em 20 de set de 2018.

O Gráfico 7 indica uma menor sobrevida para aqueles pacientes que apresentaram uma maior expressão do mRNA de *SUV420H2*. Entretanto, devemos ressaltar que os grupos de maior e menor expressão foram determinados em relação ao ponto de corte de 1.9 FPKM, que representa uma expressão relativamente baixa, sendo os pacientes com menor sobrevida aqueles que possuem uma maior expressão relativa a um parâmetro baixo.

No THPA também foram analisados resultados de imuno-histoquímica disponíveis, onde foi utilizado o anticorpo HPA052294 da empresa Atlas Antibodies – Suíça anti-SUV420H2 em 4 amostras parafinizadas de câncer de cabeça e pescoço, tendo sido observada uma marcação citoplasmática e nuclear em 3 amostras e citoplasmática membranosa em 1. A marcação observada foi considerada forte em 2 amostras, moderada em 1 amostra e fraca em 1 amostra (Figura 6, abaixo).

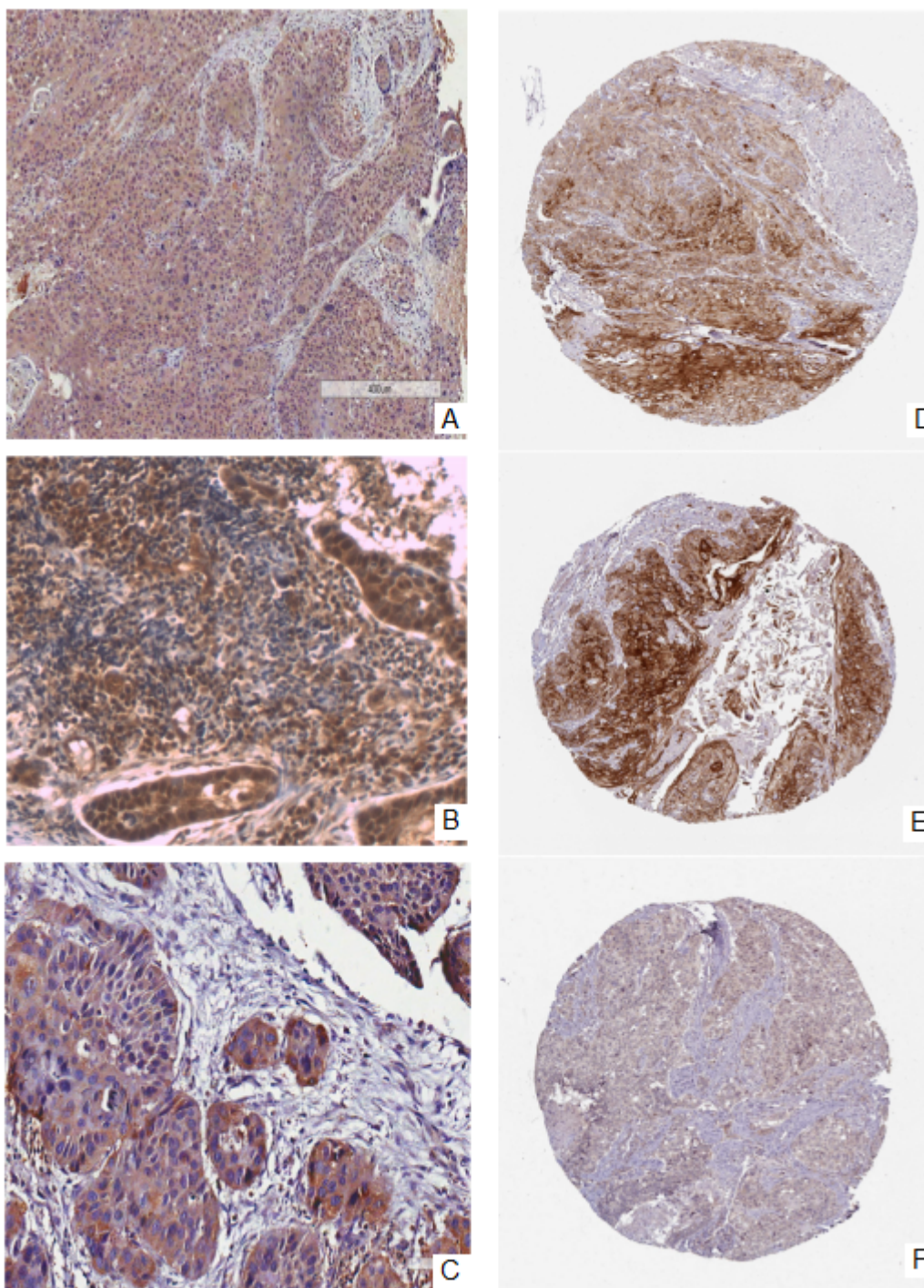
5.3 EXPRESSÃO DAS ENZIMAS SUV420 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

Nas 10 amostras de pacientes com câncer de boca, foi detectada marcação leve nos núcleos, resultado esperado devido à função nuclear desempenhada pela enzima. Entretanto, foi observada também uma marcação na região do citoplasma das células do tecido tumoral de biópsia, de moderada a forte, tanto para SUV420H1 quanto para SUV420H2. Foram realizados vários testes durante a fase de padronização dos anticorpos, com tecidos diferentes como mucosa de útero, e o experimento foi repetido com as amostras de câncer de boca, tendo a marcação do citoplasma persistido em todos, mesmo com os ajustes finos da técnica.

Apesar de o citoplasma não ser uma região esperada para as enzimas metiltransferases, algumas delas mostram atividade em proteínas do citoplasma e o resultado é compatível com a pesquisa *in silico*, que também demonstrou uma marcação citoplasmática de moderada a forte em amostras também de carcinoma de células escamosas em câncer de cabeça e pescoço, como pode ser observado na Figura 6. As metiltransferases SUV420H2 não estão presentes no citoplasma apenas em células de

câncer de cabeça e pescoço e de acordo com a pesquisa *in silico* realizada, é possível notar essa marcação positiva no citoplasma em muitos casos de câncer colorretal, câncer de ovário, câncer de tireóide e em menor quantidade em casos de câncer de mama, pâncreas, próstata e estômago, juntamente com a presença de positividade de marcação no núcleo.

Figura 6: Comparação dos resultados de imuno-histoquímica obtidos com as amostras de tecido tumoral de câncer de boca dos pacientes do HUB usando o anticorpo anti-SUV420H2 1:150, com a pesquisa *in silico* feita no banco de dados The Human Protein Atlas. Nas imagens A, B e C, amostras de câncer de boca dos pacientes do HUB. É possível perceber marcação de moderada a forte no citoplasma e leve no núcleo das células tumorais, sem haver marcação do estroma. Nas imagens D, E e F, do The Human Protein Atlas, amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço com marcação igualmente forte e moderada no citoplasma e marcação leve no núcleo, também sem marcação do estroma.



Na análise quantitativa automatizada feita pelo programa Positive Pixel Count Algorithm (ScanScope Aperio Software, Leica, Wetzlar, Germany), foi possível quantificar a intensidade da marcação da reação no tecido por área, sendo as áreas sem marcação consideradas negativas e as áreas com marcação, áreas positivas que são categorizadas em níveis, sendo eles: marcação leve, moderada ou forte. É possível perceber que para SUV420H1 houve um pouco mais de intensidade de marcação do que para SUV420H2, sendo as maiores intensidades 0,762123 e 0,605033 para cada enzima, respectivamente, e as médias de intensidade 0,356 para SUV420H1 e 0,344 para SUV420H2, em células tumorais (Tabela 2). Para SUV420H1, na maioria das lâminas havia pleomorfismo celular de baixo a moderado, com marcação citoplasmática de moderada a forte e presença de infiltrado inflamatório. Já para SUV420H2 o pleomorfismo celular se mostrou alto, com marcação citoplasmática heterogênea, de fraca a forte.

Tabela 2: Intensidade da marcação positiva nas amostras normais (N) e tumorais (T) pela técnica de imunohistoquímica.

Intensidade da Marcação IHC			
Amostra	Classificação	SUV420H1	SUV420H2
ABS N	N	0,0980493	0,516137
144491	N	0,0144003	0,575879
134424	N	0,445364	0,570844
133848	N	0,482808	0,605033
132319	N	0,442266	0,26749
111542_1	N	0,534741	0,0884016
ABS T	T	0,687158	0,413817
144491	T	0,0936078	0,0816112
142765	T	0,417107	0,485802
134424	T	0,0905762	0,0152471
133848	T	0,497959	0,158716
132319	T	0,207998	0,527329
131761	T	0,762123	0,276834
131006	T	0,230245	0,247325
111442_1	T	0,348295	0,33998

A intensidade da marcação foi ainda comparada entre as amostras de tecido de margem normal e tecido tumoral para SUV420H1 e SUV420H2 e como é possível observar nos Gráficos 8 e 9, a marcação foi maior nas amostras tumorais para SUV420H1 e SUV420H2.

Gráfico 8: Intensidade da positividade de marcação para SUV420H1 em amostras de carcinoma oral de células escamosas (Normais=6 e Tumerais=9). Média de intensidade 0,356.

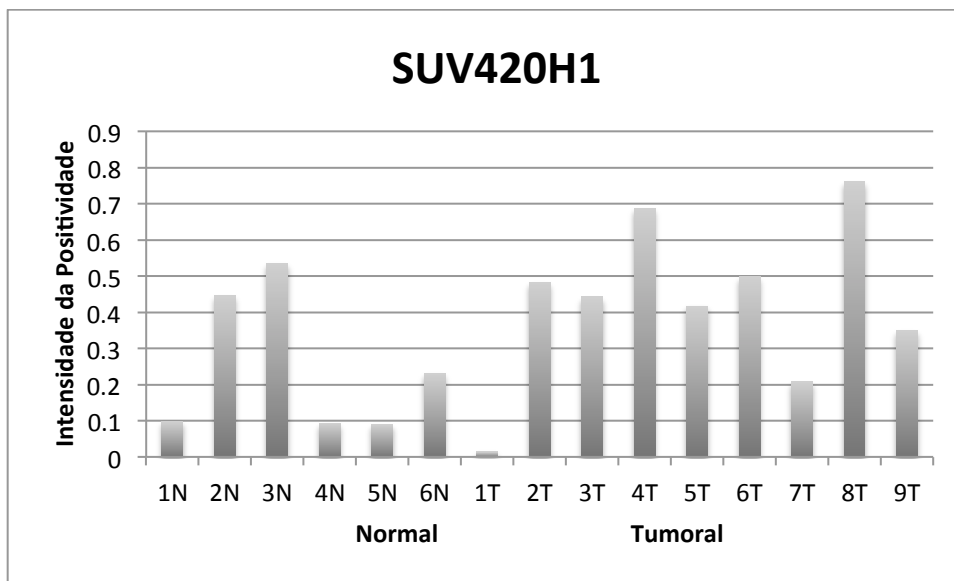
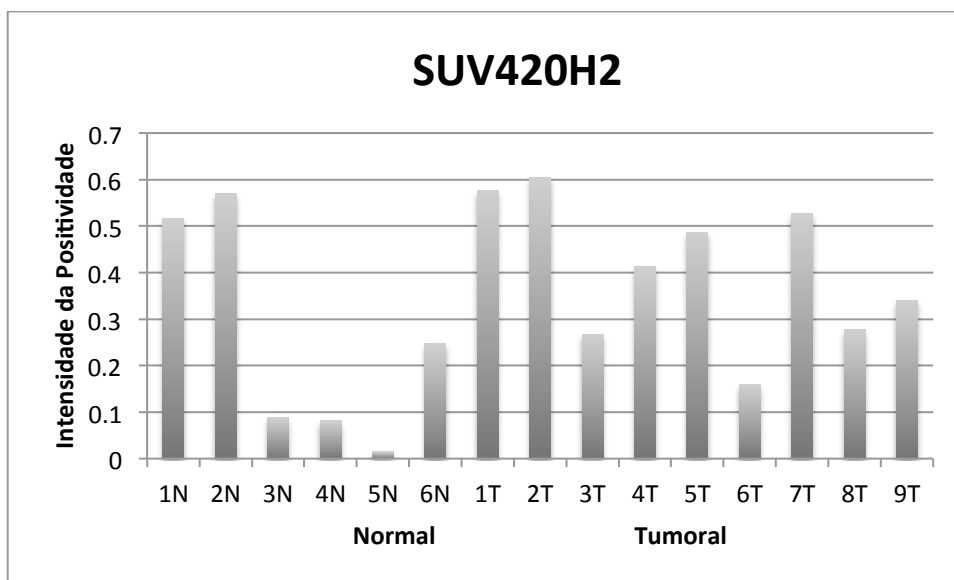


Gráfico 9: Intensidade da positividade de marcação para SUV420H2 em amostras de carcinoma oral de células escamosas (Normais=6 e Tumerais=9). Média de intensidade 0,344.



6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As enzimas SUV420H1 e SUV420H2 possuem um papel fundamental na normalidade das células por preservarem o genoma através da sinalização para proteínas efetoras que irão reparar as lesões no material genético e fazer sinalização para silenciamento dos genes, para que não haja a produção desenfreada de fatores oncogênicos, gerando uma situação propícia para carcinogênese. A regulação exercida por estas enzimas nas células é muito importante e sua desregulação tem sido associada a vários tipos de câncer, como câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer de rim [SELIGSON et al, 2008] e câncer de mama [YOKOYAMA et al, 2014]. Porém, ainda não há artigos publicados sobre estas enzimas na carcinogênese oral.

Neste estudo, os baixos níveis de expressão demonstrados pela quantificação relativa da qPCR em tumores são reforçados pela análise *in silico*, que demonstrou uma expressão entre 1.3 e 2.7 em um grupo amostral maior, mesmo que mais heterogêneo. O resultado é compatível com o *status* celular de malignidade, uma vez que a dimetilação e a trimetilação realizadas pelas enzimas SUV420 são responsáveis por ações protetivas, já tendo sido relatada a perda da marca da trimetilação realizada por SUV420H2 em câncer de mama e testes *in vitro*, influenciando no prognóstico [YOKOYAMA et al, 2014; SEPSA et al, 2015; WONGTAWAN et al, 2011], corroborando com os resultados deste estudo.

A diferença entre a expressão de *SUV420H1* e *SUV420H2* foi percebida nos nossos resultados de qPCR e na análise *in silico*, com uma maior expressão de *SUV420H1* e *SUV420H2* em tecidos normais e uma menor expressão em amostras tumorais, sendo uma expressão baixíssima para *SUV420H2* (QR=0,009). Além disso, a expressão de *SUV420H1* foi maior que *SUV420H2* nas amostras normais. Na normalidade, essa diferença pode ser explicada pela diferença de funções desempenhadas por SUV420H1 e SUV420H2, sendo que cada uma é responsável por um estágio de metilação diferente, que possuem interpretações diferentes no funcionamento das células e que possuem uma relação de interdependência, pois o estado de trimetilação depende da dimetilação como substrato para que a reação ocorra. Assim, a maior presença de SUV420H1 pode ser explicada, pois o estado de dimetilação deve primeiro atingir um platô para que em seguida seja recrutada SUV420H2 e só então comece as reações de trimetilação [WONGTAWAN et al, 2011].

Apesar de mantida essa proporcionalidade de expressão entre *SUV420H1* e *SUV420H2* nas amostras tumorais, mais estudos são necessários para entendermos a dinâmica das enzimas SUV420 no câncer.

A baixa expressão em células de tumor pode ainda estar relacionada com uma supressão do gene, já que ambos *SUV420H1* e *SUV420H2* apresentam uma alta frequência de deleção em câncer de cabeça e pescoço, correspondendo ao total de 12,9% de deleções em *SUV420H1* e a 17,2% de deleções em *SUV420H2*, segundo uma pesquisa *in silico* realizada pelo nosso grupo de pesquisa no banco de dados *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma* do CBIO (www.cbioportal.org), que analisou 530 amostras de acordo com a identificação de 5 eventos de alteração genética, caracterizando assim a frequência de cada tipo de alteração genética em *SUV420H1* e *SUV420H2* (dados ainda não publicados).

Associando os dados clínicos dos pacientes com o nível de expressão das enzimas SUV420, é possível perceber a consistência dos dados da literatura com a pesquisa realizada. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, 38 do total de 42 pacientes, correspondendo à 90% dos casos, seguindo o perfil epidemiológico do câncer de boca. Os homens ainda possuem um maior hábito de consumir bebidas alcóolicas e tabaco do que as mulheres, estando assim mais expostos aos fatores etiológicos. Essa maior exposição gera maior chance de danos às células e de iniciar, assim, um câncer de boca [BRENER et al, 2007; CHOI e MYERS, 2008; IARC, 2005]. As principais regiões anatômicas de ocorrência do câncer de boca são a região do assoalho bucal e língua, como descrito por MELCHERS et al, correspondendo a 34 dos 42 casos, totalizando 80% dos casos analisados neste estudo.

Os estudos de imuno-histoquímica mostraram uma diferença notável entre a marcação das amostras normais e tumorais, sendo presente uma marcação positiva de forte a moderada inclusive na região citoplasmática das células tumorais além da marcação positiva leve no núcleo, resultado este corroborado pela análise *in silico*. Tal marcação na região citoplasmática foi percebida desde o começo dos experimentos, estando presente nos tecidos desde a fase de padronização dos anticorpos, mesmo testando-se várias diluições, desde as mais concentradas como 1:50 até as mais diluídas como 1:500. Deve ser levado em consideração que os anticorpos anti-SUV420 comercializados tem mostrado baixa especificidade, tendo sido recomendado a este grupo de pesquisa o uso de mais de um anticorpo, de fornecedores diferentes, para tentar reproduzir estes resultados, com o

objetivo de garantir assim, que a marcação não é inespecífica, embora nossos dados estejam de acordo com os resultados de imuno-histoquímica encontrados na pesquisa *in silico* no THPA, que usaram anticorpos diferentes dos usados no nosso estudo.

Mesmo que sejam necessários mais estudos sobre a localização citoplasmática de SUV420H1 e SUV420H2 nas reações de imuno-histoquímica, a presença destas enzimas no citoplasma das células de tecido tumoral de câncer de boca, abre questionamentos sobre o porquê deste resultado, confirmado na pesquisa *in silico* no *The Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org), não apenas em câncer de cabeça e pescoço, mas em outros casos como câncer de ovário e câncer de tireóide. Será importante confirmar estes resultados, para entendermos se há fuga destas enzimas do núcleo para o citoplasma e se as enzimas têm outras funções no citoplasma, metilando outras proteínas, como já foi observado para a metiltransferase SMYD3, que catalisa a metilação em resíduos de lisina da tirosina cinase VEGFR1, observando-se um ganho de função na proteína metilada como descrito em Kunizaki et al, demonstrando a importância das enzimas metiltransferase como possíveis reguladoras de vias de sinalização celular durante o processo de carcinogênese pela metilação de proteínas não histona.

Assim, este estudo demonstrou como as metiltransferases SUV420H1 e SUV420H2 tem expressão alterada em tecidos tumorais, em comparação aos tecidos normais. Nos próximos passos, concluiremos a análise de associação com os dados clínicos dos pacientes, incluindo taxa de sobrevivência, para checarmos se estas enzimas podem estar associadas com prognóstico no câncer de boca, considerando que ela é determinante em outros tipos de câncer. Também será feito o estudo de imuno-histoquímica para a trimetilação de H20K4, para checar se a marcação das enzimas SUV420 se associa com a marcação de sua atividade de metilação, nos mesmos sítios. Embora, estudos complementares sejam necessários, este estudo é o primeiro a avaliar as enzimas SUV420 no contexto de câncer de boca.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BANNISTER, ANDREW J, and TONY KOUZARIDES. “Regulation of Chromatin by Histone Modifications.” *Cell Research* 21.3 (2011): 381–395. *PMC*. Web. 14 June 2018.

CHOI S.and MYERS J. N. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. *J Dent Res* 2008, 87(1):14-32

GURSOY-YUZUGULLU O, CARMAN C, SERAFIM RB, MYRONAKIS M, VALENTE V, PRICE BD. Epigenetic therapy with inhibitors of histone methylation suppresses DNA damage signaling and increases glioma cell radiosensitivity. *Oncotarget*. 2017;8(15):24518-24532.

IARC Publications - *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*, 3rd Edition, Volume 9, 2005, pg 168-175. Disponível em: <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Head-And-Neck-Tumours-2005>. Acesso em 11 de abril de 2018.

INCA - Estimativa de Câncer no Brasil. Disponível em:

<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>>, acessado em 20 jun 2018.> Acesso em 20 de jun de 2018.

JØRGENSEN, STINE, GUNNAR SCHOTTA, AND CLAUS STORGAARD SØRENSEN. “Histone H4 Lysine 20 Methylation: Key Player in Epigenetic Regulation of Genomic Integrity.” *Nucleic Acids Research* 41.5 (2013): 2797–2806.

KAPOOR-VAZIRANI, PRIYA, JACOB D. KAGEY, AND PAULA M. VERTINO. “SUV420H2-Mediated H4K20 Trimethylation Enforces RNA Polymerase II Promoter-Proximal Pausing by Blocking hMOF-Dependent H4K16 Acetylation .” *Molecular and Cellular Biology* 31.8 (2011): 1594–1609.

LU, C., YANG, D., SABBATINI, M. E., COLBY, A. H., GRINSTAFF, M. W., OBERLIES, N. H., PEARCE, C., ... LIU, K. “Contrasting Roles of H3K4me3 and H3K9me3 in Regulation of Apoptosis and Gemcitabine Resistance in Human Pancreatic Cancer Cells.” *BMC Cancer* 18 (2018): 149.

MELCHERS, L. J., CLAUSEN, M. J., MASTIK, M. F., SLAGTER-MENKEMA, L., VAN DER WAL, J. E., WISMAN, G. B., ROODENBURG, J. L., SCHUURING, E. “Identification of Methylation Markers for the Prediction of Nodal Metastasis in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma.” *Epigenetics* 10.9 (2015): 850–860.

NAGATA, S., HAMADA, T., YAMADA, N. , YOKOYAMA, S. , KITAMOTO, S. , KANMURA, Y. , NOMURA, M., KAMIKAWA, Y. , YONEZAWA, S. AND SUGIHARA, K. (2012), Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse. *Cancer*, (2012) vol.118. 4298-308

OMS. Ficha Técnica sobre o Câncer. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em 19 de agosto de 2018.

ONU. Câncer mata 88 milhões de pessoas anualmente no mundo. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/oms-cancer-mata-88-milhoes-de-pessoas-anualmente-no-mundo/>. Acesso em 22 mar 2018.

POGRIBNY, IGOR, VOLODYMYR P. TRYNDYAK, LEVAN MUSKHELISHVILI, IVAN RUSYN, SHARON A. ROSS; Methyl Deficiency, Alterations in Global Histone Modifications, and Carcinogenesis, *The Journal of Nutrition*, Volume 137, Issue 1, 1 2007, Pages 216S–222S.

POZZI V, SARTINI D, MORGANTI S, GIULIANTE R, DI RUSCIO G, SANTARELLI A, ET AL. “RNA-Mediated Gene Silencing of Nicotinamide N-Methyltransferase Is Associated with Decreased Tumorigenicity in Human Oral Carcinoma Cells.” Ed. Xin-Yuan Guan. *PLoS ONE* 8.8 (2013): e71272.

ROBBINS & COTRAN. Capítulo 8: Neoplasias. In: **Bases Patológicas do Câncer**. 10ª Edição. Editora Elsevier, 2018. 281-286.

SCHOTTA, G., SENGUPTA, R., KUBICEK, S., MALIN, S., KAUER, M., CALLÉN, E., CELESTE, A., PAGANI, M., OPRAVIL, S., DE LA ROSA-VELAZQUEZ, I. A., ESPEJO, A., BEDFORD, M. T., NUSSENZWEIG, A., BUSSLINGER, M., ... JENUWEIN, T. “A Chromatin-Wide Transition to H4K20 Monomethylation Impairs Genome Integrity and Programmed DNA Rearrangements in the Mouse.” *Genes & Development* 22.15 (2008): 2048–2061.

SEPSA A, LEVIDOU G, GARGALIONIS A, ADAMOPOULOS C, SPYROPOULOU A, DALAGIORGOU G, THYMARA I, BOVIATIS E, THEMISTOCLEOUS MS, PETRAKI K, VRETTAKOS G, SAMARAS V, ZISAKIS A, PATSOURIS E, PIPERI .“Emerging Role of Linker Histone Variant H1x as a Biomarker with Prognostic Value in Astrocytic Gliomas. A Multivariate Analysis Including Trimethylation of H3K9 and H4K20.” Ed. Wei-Guo Zhu. *PLoS ONE* 10.1 (2015): e0115101.

SERRANO, L., MARTÍNEZ-REDONDO, P., MARAZUELA-DUQUE, A., VAZQUEZ, B. N., DOOLEY, S. J., VOIGT, P., BECK, D. B., KANE-GOLDSMITH, N., TONG, Q., RABANAL, R. M., FONDEVILA, D., MUÑOZ, P., KRÜGER, M., TISCHFIELD, J. A., ..., VAQUERO, A. “The Tumor Suppressor SirT2 Regulates Cell Cycle Progression and Genome Stability by Modulating the Mitotic Deposition of H4K20 Methylation.” *Genes & Development* 27.6 (2013): 639–653.

SOUTHALL, STACEY M., NORA B. CRONIN, AND JON R. WILSON. “A Novel Route to Product Specificity in the Suv4-20 Family of Histone H4K20 Methyltransferases.” *Nucleic Acids Research* 42.1 (2014): 661–671.

TSANG, LEANNA W. K., NINGHE HU, AND D. ALAN UNDERHILL. “Comparative Analyses of SUV420H1 Isoforms and SUV420H2 Reveal Differences in Their Cellular Localization and Effects on Myogenic Differentiation.” Ed. Fatah Kashanchi. *PLoS ONE* 5.12 (2010): e14447.

UHLEN M, OKSVOLD P, FAGERBERG L, LUNDBERG E, JONASSON K, FORSBERG M, ZWAHLEN M, KAMPF C, WESTER K, HOBER S, WERNERUS H, BJÖRLING L, PONTEN F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol.* 2010 28(12):1248-50.

UHLEN M, ZHANG C, LEE S, SJÖSTEDT E, FAGERBERG L, BIDKHORI G, BENFEITAS R, ARIF M, LIU Z, EDFORS F, SANLI K, VON FEILITZEN K, OKSVOLD P, LUNDBERG E, HOBER S, NILSSON P, MATTSSON J, SCHWENK JM, BRUNNSTRÖM H, GLIMELIUS B, SJÖBLÖM T, EDQVIST PH, DJUREINOVIC D, MICKE P, LINDSKOG C, MARDINOGLU A, PONTEN F. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science.* 2017 357(6352)

YAMAMOTO, Koji et al. “Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type-2 (HAI-2)/*SPINT2* Contributes to Invasive Growth of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells.” *Oncotarget* 9.14 (2018): 11691–11706.

PFAFFL, MICHAEL W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.

PATIL B R, BHAT K, SOMANNAVAR P, HOSMANI J, KOTRASHETTI V, NAYAK R. Comparison of immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and CD105 in oral squamous cell carcinoma: Its correlation with prognosis. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2018;14:421-7

HUGO GENE NOMENCLATURE COMMITTEE (HGNC). *Gene Family – Lysine methyltransferases*. Disponível em: <<https://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/487>>. Acesso em 19 de out de 2018.

SELIGSON, D. B., HORVATH, S., MCBRIAN, M. A., MAH, V., YU, H., TZE, S., WANG, Q., CHIA, D., GOODGLICK, L., ... KURDISTANI, S. K. Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers. *The American journal of pathology*. (2009). 174(5), 1619-28.

YOKOYAMA Y., MATSUMOTO A., HIEDA M., SHINCHI Y., OGIHARA E., HAMADA M., NISHIOKA Y., ..., MATSUURA N. Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity. *Breast Cancer Research*. 2014 n°16. R66

MOHAN M, JAGANNATHAN N. Oral field cancerization: an update on current concepts. *Oncol Rev*. 2014;8(1):244.

KUNIZAKI M, HAMAMOTO R, SILVA FP, YAMAGUCHI K, NAGAYASU T, SHIBUYA M, NAKAMURA Y, FURUKAWA Y. The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res*. 2007 Nov 15;67(22):10759-65.

WONGTAWAN T, TAYLOR JE, LAWSON KA, WILMUT I, PENNING S. Histone H4K20me3 and HP1 α are late heterochromatin markers in development, but present in undifferentiated embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2011 Jun 1;124(Pt 11):1878-90.

BECK DB, ODA H, SHEN SS, REINBERG D. "PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription." *Genes Dev*. 2012;26(4):325-37.