



Análise da metilação do gene *E-caderina* no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e leucoplasia bucal

Priscila Máximo Lima, Patrícia Luciana Batista Domingos, Marcela Gonçalves de Souza, Carlos Alberto de Carvalho Fraga, Ludmilla Regina de Souza, Lucyana Conceição Farias, Andre Luíz Sena Guimarães

Introdução

O Carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna mais comum na região de cabeça e pescoço, representando aproximadamente 90% dos tumores malignos da cavidade bucal [1,2]. Essa neoplasia pode acometer a cavidade bucal, orofaringe, laringe ou hipofaringe [1]. A etiopatogênese do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) está relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos ao hospedeiro. Dentre os fatores intrínsecos, destacam-se uma complexidade de desequilíbrios ou instabilidades em grupos específicos de genes relacionados aos fenômenos de crescimento e diferenciação celular, morte celular por apoptose, reparo do DNA, resposta imunológica e alterações epigenéticas, especialmente o evento de silenciamento gênico pela metilação do DNA [3,4]. Com relação aos fatores extrínsecos, destacam-se o uso de tabaco e seus subprodutos, associados ou não ao etilismo [1]. O CECP tem uma maior incidência em indivíduos do gênero masculino que apresentam uma faixa etária acima de 50 anos, grupo conhecido como “indivíduos clássicos” para esse tipo de carcinoma [2]. O fenômeno da carcinogênese em cabeça e pescoço é um processo complexo que ocorre através de múltiplos eventos genéticos e epigenéticos que alteram as funções normais dos oncogenes e dos genes supressores de tumor [3,4]. O carcinoma epidermóide de boca pode ser precedido por lesões potencialmente cancerizáveis, sendo a leucoplasia bucal (LB) a mais comum delas, com prevalência populacional estimada em 2,6% [5,6]. A LB acomete principalmente mucosa jugal e mucosa alveolar, em homens com mais de 40 anos [8,11]. É uma lesão que se apresenta, clinicamente, como uma mancha ou placa branca, hiperqueratótica, não removível à raspagem e que não pode ser classificada clínica ou patologicamente como outra enfermidade. Sua etiologia está relacionada a desregulações genéticas e, em muitos casos, a hábitos como tabagismo, e outras vezes, é considerada idiopática [6].

A adesão célula-célula é controlada por um sistema de proteínas de membrana, conhecido como complexo juncional, sendo importante para a manutenção da integridade do tecido, morfogênese, comunicação celular, crescimento e diferenciação celular. Dentre as moléculas envolvidas na adesão celular, as caderinas estão envolvidas na formação e manutenção dos tecidos sólidos, bem como, na manutenção do fenótipo epitelial [7]. Sendo assim, o objetivo do estudo foi investigar se o perfil de metilação do gene *E-caderina* apresenta um caráter distinto entre os grupos de LB e CECP, em relação a tecido não-neoplásico.

Material e métodos

A. Casuística

Esse estudo, de caráter transversal, envolveu a utilização de amostras de tecidos e análises de dados sócio-demográficos e clínico-patológico de indivíduos acometidos por LB e CECP. Amostras de mucosa bucal normal foram utilizadas como grupo de comparação do estudo. Os materiais biológicos e dados clínicos serão provenientes do Banco de Materiais Biológicos Humano do Norte do Estado de Minas Gerais (Biobanco Institucional - UNIMONTES/ Registro CONEP: B-013) O estudo envolveu a análise de dados clínicos e material biológico de uma amostra total de 71 indivíduos, sendo mucosa bucal normal (n = 15), LB (n = 20) e CECP (n = 36).

*B. Análise da metilação da região promotora do gene *E-caderina**

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras criopreservadas a -80°C, utilizando o kit Dneasy TissueKit QIAGEN®, de acordo com o protocolo do fabricante. Após a extração, o DNA foi tratado com bissulfato de sódio, que converte as citosinas não metiladas em uracila, as citosinas metiladas são resistentes a essa modificação. Essa reação permite a identificação do perfil de metilação do gene. O DNA foi amplificado através da técnica de PCR específica para metilação (PCR-MSP). Nessa técnica, são utilizados primers específicos para identificar perfil metilado e o perfil



FÓRUM ENSINO • PESQUISA
EXTENSÃO • GESTÃO

FEPPEG

UNIVERSIDADE: SABERES E PRÁTICAS INOVADORAS

Trabalhos científicos • Apresentações artísticas
e culturais • Debates • Minicursos e Palestras



24 a 27
setembro

Campus Universitário Professor Darcy Ribeiro

www.fepeg.unimontes.br

não metilado, em ampliações distintas. Através da eletroforese em gel de poli-acrilamida, foram verificados os produtos da PCR e analisado o perfil de metilação para cada amostra, podendo ser metilado ou não metilado.

C. Análises estatísticas

Para análise dos dados foi empregado o programa de estatística SPSS[®], versão 18.0, para Windows[®]. Os resultados obtidos submetidos a tratamentos estatísticos específicos. O nível de significância a ser considerado nos testes estatísticos foi fixado em 95% ($p < 0.05$).

Resultados

Os dados relativos à idade e distribuição dos grupos de acordo com o perfil de metilação do gene *E-caderina* estão apresentados na Tabela 1.

Discussão

O CECP tem uma maior incidência em indivíduos do gênero masculino que apresentam uma faixa etária acima de 50 anos. Contudo, a proporção crescente de pacientes jovens acometidos mostra-se um fator de grande interesse investigativo frente ao pouco tempo de exposição aos fatores de risco [4].

Leucoplasias na mucosa bucal apresentam-se como lesões com potencial de transformação maligna. Nessas lesões, o grau de displasia epitelial parece ser primordial para tal consequência, interferindo diretamente na conduta clínica. Pesquisas tem buscado identificar perfis distintos de expressões gênicas entre a LB e o CECP, com o objetivo de caracterizar aspectos moleculares distintos entre os dois processos patológicos [5,6].

A literatura aponta que a expressão da *E-caderina* está associada ao estadiamento clínico no CECP, sendo sugerida uma perda da expressão dessa proteína em tumores em estádios avançados [8,9]. A perda da função da *E-caderina* está relacionada com o processo de diferenciação, perda da adesão celular e metástases nessas neoplasias [9]. Embora a perda da expressão da *E-caderina* seja comum nessa doença, tal alteração funcional, causada pelo mecanismo da metilação do DNA, por exemplo, não tem sido investida na literatura. Os resultados parciais desse estudo sugerem que o perfil de metilação do gene da *E-caderina* não é um evento distinto entre os grupos LB e CECP.

Conclusão

Apesar dos resultados desse estudo terem sugerido que o perfil de metilação do gene da *E-caderina* não é um evento distinto entre os grupos LB e CECP, os dados parciais do estudo não revelaram, ainda, se no CECP, o perfil de metilação desse gene interfere em parâmetros clínicos, como tamanho do tumor e metástases locorregionais.

Referências

- [1] Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology*. 2009;21(3):194-200.
- [2] Chen YC, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2005;55(1):45-54.
- [3] Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(1):9-22.
- [4] Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Udagama MN, Ogawa I, Kudo Y, et al. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(6):357-62.
- [5] Freitas MD, Blanco-Carrion A, Gandara-Vila P, Antunez-Lopez J, Garcia-Garcia A, Gandara Rey JM. Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;102(2):199-203.
- [6] Hamadah O, Hepburn S, Thomson PJ. Effects of active non-smoking programmes on smoking behaviour in oral precancer patients. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2007;36(8):706-11.
- [7] Ozawa M, Kobayashi W. Cadherin cytoplasmic domains inhibit the cell surface localization of endogenous e-cadherin, blocking desmosome and tight junction formation and inducing cell dissociation. *PLoS One*. 2014;9(8):e105313.
- [8] Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulis V, Burtneß B, Zaramboukas T, Rimm D, Fountzilias G, Psyrii A Markers of epithelial to mesenchymal transition in association with survival in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One*. 2014;9(4):e94273
- [9] Luo SL, Xie YG, Li Z, Ma JH, Xu X. E-cadherin expression and prognosis of oral cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol*. 2014;35(6):5533-7.

Tabela 1. Parâmetros clínicos e distribuição dos grupos de acordo com o perfil de metilação do gene *E-caderina*

Variáveis	Metilação E-caderina		Valor <i>p</i>
	Não metilado	Metilado	
Idade	52,60 (± 15,8)	56,75 (± 17,6)	0,492
Grupos			
Mucosa normal	14	1	0,742
Leucoplasia bucal	17	3	
CECP	32	4	