

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA
no promotor dos genes *MHL1*, *hTERT* e *TP53* em
células epiteliais da mucosa bucal**

Sabrina Rocha Luna de Oliveira

SAPIENTIA AEDIFICAT

2014

Sabrina Rocha Luna de Oliveira

**Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor dos genes
MHL1, *hTERT* e *TP53* em células epiteliais da mucosa bucal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Diagnóstico Oral.

Orientador: Prof^a Dr^a Naila Francis Paulo de Oliveira

João Pessoa

2014

O48e *Oliveira, Sabrina Rocha Luna de.*

Efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor de genes MHL1, hTERT e TP53 em células epiteliais da mucosa bucal / Sabrina Rocha Luna de Oliveira.-- João Pessoa, 2014.

58f. : il.

Orientadora: Naila Francis Paulo de Oliveira

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS

NOME DO ALUNO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

Banca Examinadora

Profª Drª Naila Francis Paulo de Oliveira
Orientador - UFPB

Profª Drª Marize Raquel Diniz da Rosa
Examinador - UFPB

Profª Drª Darlene Camati Persuhn
Examinador - Instituição

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que me deram o dom da vida e tanto se esforçaram para garantir a minha educação moral e acadêmica, além de todo o amor que sempre me dedicaram.

Ao meu esposo que sempre esteve ao meu lado e muito me ajudou para possibilitar a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu protetor e guia, suporte em toda minha trajetória de vida.

Aos meus pais, Osman e Socorro, que são a base de toda a minha educação e formação como ser humano.

Aos meus irmãos Leônia, Osman, Tiago e Silvânia que me ensinaram a compartilhar os bons momentos da vida.

Ao meu esposo, Dimitri, por todo o carinho e apoio em todos os meus sonhos e projetos.

Aos meus sobrinhos, em especial a Hipólito Filho, por ser meu companheiro de todas as horas.

À amiga Isabelle, pela ajuda na peregrinação da coleta em busca de voluntários para pesquisa e pelo companheirismo em todas as fases do mestrado.

Aos amigos de laboratório, Bruno, Stefhane, Isabela, Ludimila e Haline que dividiram comigo diversas etapas dessa pesquisa.

Aos colegas do mestrado que compartilharam comigo momentos de alegria, dúvida, insegurança e aprendizado.

Ao amigo, George Ramalho, por ter me ajudado a concretizar o sonho da realização do mestrado.

Aos professores do mestrado que muito contribuíram para o meu aprendizado.

Ao professor Dr. Paulo Bonan, pela generosidade de todos os conhecimentos repassados em estomatologia no projeto do CEO de Jaguaribe.

Aos professores da banca examinadora por nos auxiliarem no aperfeiçoamento do nosso trabalho.

Em especial, a minha orientadora, Prof^a Dr^a Naila Francis Paulo de Oliveira, por toda a paciência, dedicação e empenho que dedicou a mim e a todos os seus orientandos.

RESUMO

A metilação de DNA é uma modificação química na molécula de DNA, e consiste na presença de um radical metil em dinucleotídeos CpG, presente principalmente em regiões promotoras do gene. Uma das principais funções da metilação de DNA é regular a transcrição gênica, sendo que a presença do radical metil pode suprimir por completo a expressão gênica. Estudos mostram que o meio ambiente pode modular a metilação de DNA. Como exemplo de fatores ambientais temos: a radiação ultravioleta, agrotóxicos, dieta, fármacos, uso crônico do álcool e o hábito de fumar. O fumo é frequentemente associado ao risco de câncer em diversos tecidos e doenças cardiovasculares, sendo considerado a maior causa de morte evitável. O gene *MLH1* está relacionado ao reparo de bases mal pareadas do DNA (DNA mismatch repair (MMR)). O gene *hTERT* compõe a subunidade catalítica da enzima telomerase, a qual é considerada um relógio biológico, um marcador que indica que a senescência celular poderá se instalar de forma inevitável. O *TP53* é um gene supressor tumoral e sua hipermetilação está relacionada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA em genes relacionados ao câncer, *MLH1*, *hTERT* e *TP53* em células da mucosa bucal de indivíduos saudáveis. Para tanto, amostras de epitélio da mucosa bucal de indivíduos fumantes, não fumantes e ex-fumantes foram coletadas por bochecho e o DNA dessas células foi extraído. Após esse processo, a análise de metilação de DNA foi feita utilizando o método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação, utilizando-se de duas enzimas de restrição, a *HhaI* e a *HpaII*, as quais clivam sítios diferentes. Em seguida à digestão enzimática, DNA foi amplificado por PCR, submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e corado pelo nitrato de prata. A análise estatística foi realizada pelo Teste de Qui-Quadrado ao nível de significância de 5%. Os dinucleotídeos CpG localizados nos sítios *HhaI* e *HpaII* no promotor do gene *MLH1* mostraram-se totalmente metilados na maioria dos indivíduos do grupo fumante e diferenças significativas foram observadas entre fumantes e não fumantes e entre fumantes e ex-fumantes ($p < 0,05$). O mesmo foi observado para o sítio *HhaI* no promotor do gene *hTERT* ($p < 0,05$) e para o sítio *HpaII* a condição não metilada foi mais frequente em fumantes em comparação com não fumantes ($p < 0,05$). Para o gene *TP53* não foram encontradas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$), sendo a condição totalmente metilada um evento usual das células saudáveis da mucosa bucal. Assim, concluímos que o fumo está associado a alterações no perfil de metilação de DNA em genes relacionados ao câncer, como *MLH1* e *hTERT* em células epiteliais saudáveis da mucosa bucal e a cessação do hábito de fumar reverteu o processo.

Palavras-chave: Metilação de DNA, epigenética, fumo, gene de reparo do DNA, gene da telomerase, *TP53*, mucosa bucal.

ABSTRACT

DNA methylation, characterized by the addition of a methyl group in cytosines within CpG dinucleotides can modify gene transcription, leading to decrease or even silence a gene. The ability of the environmental factors to induce epigenetic changes has been investigated and many studies have shown a relationship between them. Studies show that pesticides, metal ions, drugs, diet, alcohol dependence and smoking are associated with epigenetic changes. Smoking is often associated with the risk of cancer in various tissues and cardiovascular diseases, being considered the leading cause of preventable death. The *MLH1* gene is related to the repair of badly paired bases of DNA (DNA mismatch repair (MMR)). The *hTERT* gene comprises the catalytic subunit of telomerase enzyme, which is considered a biological clock, a marker indicating that the cellular senescence can be installed inevitably form. The *TP53* is a tumor suppressor gene and its hypermethylation is related to the development of various cancers. The aim of this work was to investigate the smoking habit influence on DNA methylation status in the promoter of cancer-related genes, *MLH1*, *hTERT* and *TP53* in oral epithelial cells of healthy subjects. Samples of oral epithelium of smokers, nonsmokers and former smokers were collected by rinsing and DNA was extracted. After, DNA Methylation analysis was performed by Methylation Sensitive Restriction Enzymes, using two restriction enzymes, the *HpaII* and *HhaI*, which cleave different sites. Following the enzymatic digestion, DNA was amplified by PCR, subjected to electrophoresis on a 6% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Statistical analysis was performed by Chi-square test at a significance level of 5%. The investigated CpG dinucleotides located at *HhaI* and *HpaII* sites in the *MLH1* gene promoter were observed to be fully methylated in DNA majority samples from the smoker group and statistical differences were found between nonsmokers and smokers and between smokers and former smokers ($p < 0.05$). The same was observed in the *hTERT* gene promoter at *HhaI* site ($p < 0.05$) and for *HpaII* site the unmethylated condition was more frequent in smoker in comparison to nonsmokers ($p < 0.05$). For *TP53* no differences were found among groups ($p > 0.05$) which the fully methylated condition was found to be an usual event in healthy oral epithelial cells. We conclude that smoking may induce changes in DNA methylation status in cancer-related genes, such as *MLH1* and *hTERT* of healthy oral epithelial cells and the cessation of smoking reversed the process.

Key Words: DNA methylation, epigenetics, smoke, DNA repair gene, telomerase gene, TP53, buccal mucosa.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 - activator protein 1

CpG - Citosina/ ligação fosfodiéster/ citosina

CCR- Câncer colorretal

CCEO- Carcinoma de células escamosas oral

CYP1A1- Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

DAPK - Death-associated protein kinase 1/ gene relacionado ao ciclo celular.

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DNMT- DNA metiltransferase

EDNRB - Endothelin receptor type B

FASLG - Fas ligand (TNF superfamily, member 6)

FHIT- Fragile histidine triad protein

FLT1- Vascular endothelial growth factor receptor 1

F2RL3 -Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3

GPR15G-protein coupled receptor 15

hMLH1-Homo sapiens MutL homolog 1

HNPCC - Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer

hTERT-Homo sapiens Telomerase Reverse Transcriptase

M - Molar

µL- microlitro

mL - mililitro

MBP – Methyl Binding Proteins/Proteínas ligadoras de metil-CpG

5-MeC - 5-metilcitosina

MeCP - Methyl cytosine binding protein

MLH1 - Homólogo 1 mutL

MLH3 - Homólogo 3 mutL

MSH2 - Homólogo 2 mutS

MSH3 - Homólogo 3 mutS

MSH6 - Homólogo 6 mutS

MMR - DNA mismatch repair

MSI - Instabilidade de microssatélite

MYLK - myosin light chain kinase

NF-KB - nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

ng–nanograma

OCT-1 - Octamer-binding transcription factor-1

OCT-2 - Octamer-binding transcription factor-2

PCR - polymerase chain reaction/ reação em cadeia de polimerase

Primer - oligonucleotídeo iniciador

PTGS2 - Prostaglandin-Endoperoxide Synthase2

RAR β – Retinoic acid receptor beta

RPM - rotações por minuto

SAM - S- adenosil metionina

SL - Síndrome de Lynch

SOCS1 - Suppressor of cytokine signaling 1

Sp1 - Specificity protein 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Epigenética: Metilação de DNA.....	3
2.2 Metilação de DNA e Fumo.....	8
2.3 <i>MLH1</i>	10
2.4 <i>hTERT</i>	12
2.5 <i>TP53</i>	13
3. PROPOSIÇÃO.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Ética em Pesquisa.....	17
4.2 Amostra	17
4.3 Obtenção de DNA.....	18
4.4 Análise da Metilação.....	18
4.5 Análise Estatística.....	22
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	58
ANEXO 1-Certificado do Comitê de Ética	
ANEXO 2-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
ANEXO 3 - Ficha Clínica	

1. INTRODUÇÃO

A epigenética é descrita como modificações no genoma que são herdadas durante a divisão celular e que não estão relacionadas com a mudança na sequência do DNA.¹ Os principais mecanismos envolvidos na epigenética relacionam-se a alterações nas histonas e ao padrão de metilação do DNA, que envolve modificações na estrutura das ligações covalentes do mesmo.²

Os tecidos que compõe a cavidade oral tem diferentes estruturas de acordo com cada localização. Em regiões sujeitas à força mecânica associada à mastigação (gengiva e palato duro) ocorre à presença de epitélio queratinizado. Na mucosa mastigatória, o epitélio queratinizado está intimamente ligado aos tecidos subjacentes pelo colágeno do tecido conjuntivo ou pela lâmina própria. O assoalho da boca e outras regiões, bem como a porção interna das bochechas requerem maior flexibilidade para acomodar a mastigação, fala ou deglutição do bolo alimentar e, portanto, são recobertos por epitélio não queratinizado.³

O tabagismo é a principal causa de doença e morte no mundo. Estima-se que as mortes causadas pelo cigarro irão aumentar e serão responsáveis por 10% de todas as mortes no mundo em 2030.⁴ O cigarro é composto por uma mistura complexa, dinâmica e reativa de um número estimado de 7.000 substâncias químicas que afeta todos os órgãos do corpo e resulta em um grande espectro de doenças pulmonares obstrutivas crônicas, cardiovasculares e vários tipos de câncer, em especial, oral e pulmonar.^{5,6,7,8,9}

O uso do tabaco afeta o epitélio superficial resultando em mudanças na aparência dos tecidos da mucosa bucal. Essas mudanças abrangem o aumento da pigmentação e o espessamento do epitélio. Ainda, o tabaco pode irritar as glândulas salivares menores e o palato duro e aumentar o risco para a doença periodontal e o câncer bucal.¹⁰ Na mucosa bucal de fumantes clinicamente saudáveis foi observado algumas mudanças tais como: alta taxa de proliferação das células epiteliais¹¹, alterações nucleares e citoplasmáticas¹², como também um aumento no número de células queratinizadas.¹³

Além disso, vários estudos mostram que o fumo pode causar alterações no epigenoma das células, e essas alterações por sua vez pode levar a mudança no

padrão de expressão gênica.^{14,15,16,17} A alteração mais frequentemente observada é a metilação de DNA, que leva a diminuição ou até mesmo repressão gênica.¹⁸ Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito do tabaco sobre o perfil de metilação de DNA em células epiteliais da mucosa bucal, nos genes *MLH1*, *hTERT* e *TP53*. Esses genes relacionam-se com o processo de tumorigênese em diversos estudos.^{19,20,21}

O gene *MLH1*(*mutL homolog 1*) está envolvido no reparo de bases mal pareadas do DNA e contribui para estabilidade do genoma.²² O gene *hTERT* relaciona-se com o mecanismo da telomerase, regulando a atividade replicativa e mantendo o comprimento dos telômeros.²³ O mesmo é alvo de diversos estudos envolvendo sua função no envelhecimento, câncer e imortalização celular.²⁴ Já o *TP53* é um gene supressor tumoral, que quando está silenciado pela metilação favorece a proliferação de diversos tumores ²⁵, e é o mais frequentemente implicado com o desenvolvimento de câncer.²⁶

Baseado nesses fatos, o estudo da metilação de DNA nos promotores dos genes *MHL1*, *hTERT* e *TP53* em indivíduos fumantes é bastante interessante e pode contribuir com o entendimento do efeito do tabagismo nas células epiteliais da mucosa bucal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epigenética: Metilação de DNA

O termo epigenética, foi descrito pela primeira vez por Conrad Waddington (1942)²⁷ que relacionou a regulação da atividade gênica com o desenvolvimento celular. Posteriormente, Griffith & Mahler (1969)²⁸ sugeriram que a metilação do DNA poderia estar relacionada à expressão gênica e que esse padrão de metilação era condicionado ao papel de enzimas metilases específicas que agiam no DNA durante o desenvolvimento do indivíduo. Atualmente, a epigenética é definida como o estudo das modificações do DNA e histonas que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA. Entre as modificações que as histonas podem sofrer, estão: metilação, fosforilação e acetilação (Figura 1). Entretanto, na molécula de DNA, ocorre apenas metilação.²⁹

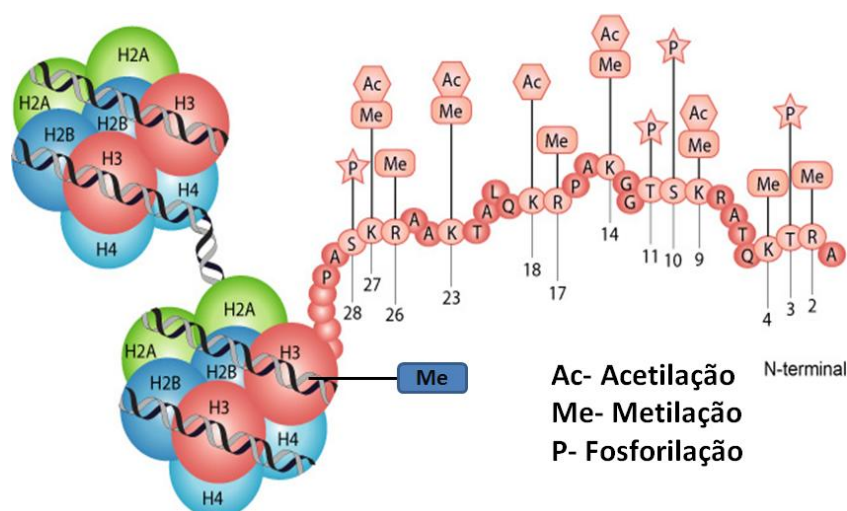


Figura 1. Modificações químicas nas histonas por metilação (Me), acetilação (Ac) ou fosforilação (P); ou ainda metilação de DNA. Fonte: <http://stke.sciencemag.org/>³⁰

A metilação do DNA corresponde a um importante efeito epigenético, cuja função crítica no DNA está relacionada à regulação dos genes e mecanismos de diferenciação celular.³¹ A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3) é transferido da S-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina

(dinucleotídeo CpG), pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA-metiltransferase (DNMT) (Figura 2).

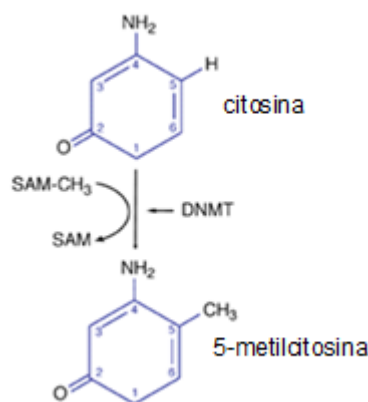


Figura 2. Esquema do processo de formação da 5-Metilcitosina (5-MeC) pela DNA metiltransferase. Fonte: STRATHDEE, BROWN, 2002.³²

As DNAs metiltransferases estão divididas em duas classes de representantes: aquelas envolvidas na metilação de fitas hemimetiladas do DNA conhecidas como metilases de manutenção, como a DNMT1, e outro grupo responsável pela maioria dos processos de metilação *de novo*, que ocorrem em sítios sem nenhum tipo de indicação de metilação, ou seja, sem a presença de metilação prévia, como as DNMT2, DNMT3A e DNMT3B (Figura 3).³³ A ação destas enzimas requer um substrato que atue como doador de radical metil e estes são obtidos da dieta, como o folato, a metionina, a colina e a vitamina B12.^{34,35}

Outro grupo de enzimas é responsável pela desmetilação do DNA. O processo denominado de desmetilação ativa envolve as desmetilases e parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvimento ou em respostas às perturbações ambientais. A desmetilação ainda pode ocorrer de maneira passiva, quando não há envolvimento de desmetilases e ocorre quando a manutenção das marcas de metilação não ocorre devido à inibição da atividade das metiltransferases durante o ciclo celular.³⁶ Assim o nível e o padrão de 5-metilcitosina é dependente dos processos de metilação e desmetilação e a ação das enzimas envolvidas nesses processos são altamente reguladas pelas células.³³

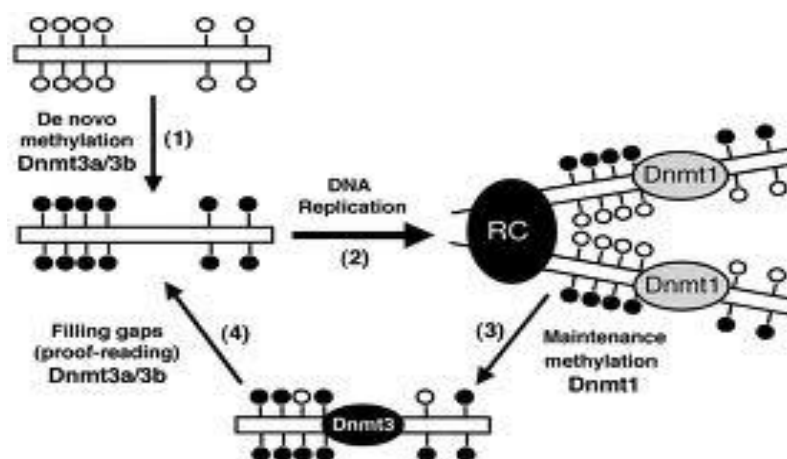


Figura 3. Representação esquemática do papel das DNMT1, DNMT3A e 3B no perfil de metilação do DNA. Fonte: CHEN *et al.*, 2003.³⁷

A metilação do DNA ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG em células diferenciadas e tem uma importante função na regulação da expressão gênica e no silenciamento de elementos repetitivos no genoma, podendo ser randômica ou sítio específica.³⁸ Os dinucleotídeos CpG aparecem esparsos pelos genomas eucariotos ou agrupados em regiões definidas como ilhas CpG, que são regiões do DNA maior que 200 pares de base contendo aproximadamente 50% de bases C e G e com uma presença esperada de aproximadamente 60% de dinucleotídeos CpG.³⁹ Estas ilhas são frequentes em regiões promotoras de certos genes, incluindo genes de manutenção.³⁹

Os dinucleotídeos CpG representam apenas cerca de 1% do genoma humano, a menor ocorrência de CpG é devido a uma alta taxa de mutações espontâneas de CpG metilados para TpGs.⁴⁰ Estima-se que as ilhas CpGs estejam presentes em cerca de 50 a 70% de todos os promotores de genes humanos, já as regiões com poucos CGs geralmente são localizadas em porções intergênicas e intrônicas.^{41,42}

Nas células saudáveis, as regiões com CGs distribuídas pelo genoma geralmente são metiladas, permanecendo as ilhas CpGs hipometiladas, adquirindo metilação para a regulação gênica. Nas fases iniciais do desenvolvimento, é verificado um nível baixo de metilação global, com cerca de 30% das regiões metiladas, entre elas, regiões envolvidas na regulação do

imprinting genômico (expressão diferencial de alelos de acordo com a origem parental e regulado por mecanismos epigenéticos, ou seja, apenas um dos alelos contém a marcação) e na inativação do cromossomo X. Com as múltiplas divisões celulares e durante a diferenciação tecidual, as marcas de metilação vão sendo colocadas, e disso resulta a metilação da grande maioria dos sítios CpGs no organismo formado, e deles permanece apenas uma pequena fração (1-2%) sem essa marca.^{43,44}

A transcrição gênica pode ser fortemente inibida pela adição de radical metil. A presença de um “capuz” metil sobre uma citosina que precede uma guanina pode inibir a ligação de fatores de transcrição a estas regiões. A ausência da ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos pode resultar na ausência ou diminuição da transcrição gênica. Ainda, proteínas chamadas MBPs (Methyl Binding Proteins), com afinidade pelo grupo metil, ligam-se às regiões CpGs localizadas nos promotores e impedem o acesso dos fatores de transcrição aos seus sítios.¹⁸ As primeiras MBPs foram isoladas no final dos anos 80 início dos anos 90.⁴⁵ Família de proteínas composta por pelo menos cinco membros sendo que as mais estudadas são a MeCP1 e MeCP2 (Methyl Cytosine Binding Protein).⁴⁶ A MeCP1 que se liga ao grupo metil necessita de múltiplos sítios CpG próximos para se ligar e assim promover a condensação da cromatina para a forma inativa, e a proteína MeCP2 pode se ligar a apenas um simples sítio CpG, promovendo alterações na cromatina semelhantes às promovidas pela proteína MeCP1 (Figura 4).

Padrões de hipermetilação aberrante em promotores de genes representam um dos principais mecanismos associados com a inativação de genes e freqüentemente ocorre em genes supressores de tumores no câncer.⁴⁷ Modificações no perfil de metilação do DNA têm sido descritos em todos os passos do processo de carcinogênese e o perfil de metilação de células neoplásicas, no geral, é marcado por hipometilação global, o que está envolvido com o aumento de instabilidade genética frequentemente verificado no câncer, hipometilação de algumas ilhas CpGs em regiões promotoras de oncogenes, além de hipermetilação geralmente em regiões promotoras de genes supressores tumorais e genes de reparo celular.^{48,49}

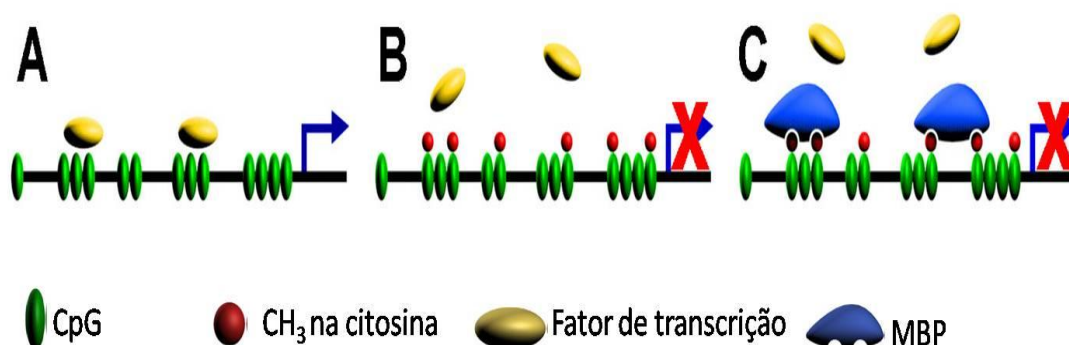


Figura 4. Mecanismo pelo qual a metilação de DNA inibe a transcrição gênica. **A.** região promotora desmetilada permitindo a ligação dos fatores de transcrição. **B.** Metilação do DNA impedindo a ligação dos fatores de transcrição. **C.** Proteínas que se ligam a metilcitosina em ilhas CpG impedem a ligação dos fatores de transcrição. Fonte: ATWOOD *et al.*, 2002.⁵⁰

Em 1953, foi proposto o conceito de “*Field Cancerization*” ou “*Cancer Field Effect*”, quando Slaughter⁵¹ e colaboradores descreveram aspectos histológicos de câncer em células escamosas do epitélio oral antes do desenvolvimento de carcinomas bucais. Baseou-se no fato de que a superfície epitelial do trato aerodigestivo é comumente exposta a muitas substâncias carcinogênicas como o cigarro e o álcool e, portanto, possui um risco maior de desenvolvimento de carcinomas, inclusive o de células escamosas de boca. Foi observado que o desenvolvimento de um segundo tumor primário no campo de cancerização ocorre em uma razão de 20 a 30%, apesar do controle local para prevenção de uma nova neoplasia.⁵²

Recentemente, alguns autores demonstraram um envolvimento de alterações epigenéticas na “*Field Cancerization*”. Isso já foi mostrado em amostras de estômago, fígado, esôfago, pulmão, mama entre outros.^{53,54,55,56,57} O desenvolvimento de campos com células mutadas é considerado uma etapa crítica na carcinogênese, com importante repercussão clínica, assim, o diagnóstico e tratamento das lesões malignas epiteliais deve abordar não somente o tumor isolado, mas todo o campo onde se desenvolveu a lesão.⁵⁸ O estudo de alterações epigenéticas em genes relacionados ao processo de tumorigênese, em áreas relacionadas ao campo de cancerização, e a compreensão do câncer como um processo amplo com múltiplos fatores envolvidos, permite novas modalidades de prevenção e tratamento do mesmo.

Padrões alterados de metilação também têm sido reportados em inflamações.^{59,60,61} A literatura mostra que há uma forte semelhança em eventos que ocorrem no câncer e na inflamação crônica, havendo mediadores químicos comuns aos dois processos.⁶² Alguns estudos epigenéticos mostram que a presença da inflamação crônica no pulmão ou na mucosa gástrica está associada ao padrão de metilação aberrante em genes supressores tumorais, que por sua vez está associado ao câncer pulmonar ou gástrico respectivamente.^{63,64}

A inflamação crônica da mucosa oral é outro fator de risco que pode, potencialmente, modificar o estado de metilação de vários genes em tumores como o carcinoma de células escamosas.⁶⁵ O hábito de fumar representa um fator de risco isolado para o desenvolvimento da periodontite⁶⁶, alterando a função dos neutrófilos e provocando aumento na síntese de algumas citocinas da inflamação, entre elas, o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-8 (interleucina 8).^{67,68}

Estudos revelam que o padrão epigenético é influenciado pelo meio ambiente, e, alterações epigenéticas são mais frequentes que mutações.⁶⁹ Dentre os fatores ambientais, podemos citar: radiação solar, poluição do ar, poluentes orgânicos persistentes, medicamentos, agrotóxicos, álcool e a fumaça do cigarro.^{29,70}

2.2 Metilação de DNA e Fumo

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável e um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. A fumaça do cigarro é uma mistura química complexa a qual contém mais de 400 diferentes compostos, sendo que em torno de 69 deles são muitos estudados e altamente associados ao câncer.⁶ Estudos revelam que o uso do cigarro pode levar à formação de adutos de DNA, micronúcleos, quebras da dupla hélice de DNA e aberrações cromossômicas.⁷¹

Estudos com recém-nascidos também revelaram mutações gênicas nos bebês expostos à fumaça do cigarro produzida pela mãe. Além disso, em espermatozóides de fumantes alta frequência de aneuploidias, quebras na

molécula de DNA, estresse oxidativo e adutos de DNA também foram encontrados. O efeito genotóxico do cigarro foi encontrado em diversos órgãos e tecidos como: bucal/nasal, esôfago, laringe e faringe, pulmão, pâncreas, órgãos mielóides, bexiga/uretra e cervix uterino.⁷¹

Mais recentemente, o efeito do tabagismo no epigenoma também tem sido investigado. Estudos revelam hipermetilação em genes supressores tumorais, tais como *p16*, genes relacionados ao ciclo celular, como: *DAPK*, genes envolvidos na apoptose, como o *Bcl2* e ainda outros genes, envolvidos nas mais diversas vias do metabolismo celular: *RARβ* - receptor de ácido retinóico, *FHIT* - enzima relacionada ao metabolismo de histidina, *CYP1A1* - enzima do citocromo P450, *PTGS2* - enzima envolvida na biossíntese de prostaglandina, *EDNRB* - subunidade da proteína G, *SOCS1* - supressor de citocina, entre outros.^{14,15,16, 49, 72,73,74} Alguns dos estudos acima citados revelaram alterações epigenéticas em células da cavidade oral, faringe, laringe e do pulmão, e outros mostraram alterações mesmo em órgãos não diretamente expostos a fumaça do cigarro, tais como: o pâncreas, a bexiga, o útero e o intestino, sugerindo que o cigarro tem um efeito generalizado, provavelmente alterando de alguma forma todo o sistema do indivíduo. Em adição, outros estudos relatam alterações epigenéticas em células de tecidos e órgãos saudáveis de fumantes, como pulmão, sangue e secreções como o escarro.^{75,76,77} Já foi sugerido que o padrão de metilação do epitélio oral poderia ser um importante marcador para predizer a situação dos pulmões, já que ambos sofrem ação de substâncias carcinogênicas do cigarro.⁷⁸

Um estudo recente investigou 27578 sítios CpG em 14475 genes e identificou alteração epigenética associada ao hábito de fumar em um novo *locus*, o *GPR15* (protein coupled receptor 15/ co-receptor para o vírus da imunodeficiência humana) e sugeriu que as alterações no padrão de metilação de DNA em resposta ao uso do cigarro são dinâmicas, sítio-específicas e permanecem após a cessação do hábito de fumar.¹⁷ Outro estudo recente analisou 25000 *loci* em macrófagos alveolares e revelou que para os genes relacionados ao sistema imune e processo inflamatório houve diferenças nos níveis de transcritos de RNAm em comparação aos indivíduos não fumantes, e em adição, o padrão de metilação dos genes citados estavam alterados e consistentes com o padrão de expressão. Dentre os genes estudados, o que

apresentou diferença mais proeminente foi o *FLT1*(Vascular endothelial growth factor receptor 1/ controle da proliferação celular).⁷⁹

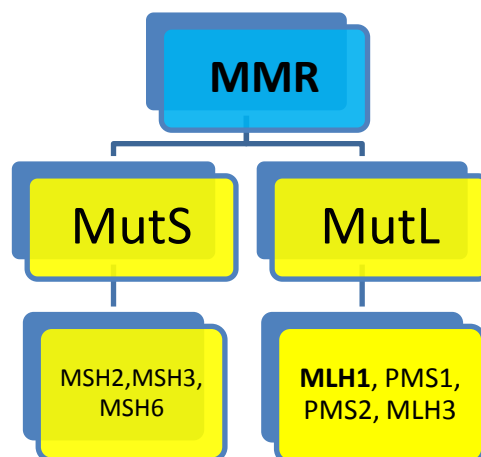
2.3 MutL homolog 1 (*MLH1*)

Podemos encontrar quatro sistemas principais de reparo ao DNA: reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo por erro de pareamento (MMR) e reparo de quebra de fita dupla (DSBR).²²

O Sistema de reparo MMR (DNA Mismatch Repair) está envolvido nos processos de replicação, recombinação e reparo que são necessários para manter a estabilidade do genoma em procariotos e eucariotos.⁸⁰ É composto por dois complexos proteicos: o complexo MutS que inclui as proteínas MSH2, MSH3 e MSH6 e o complexo MutL que engloba MLH1, PMS1, PMS2 e MLH3 . Para o funcionamento do sistema MMR é necessário que o complexo protéico MutL se ligue a MutS- α (MSH2 e MSH6) ou MutS- β (MSH2 e MSH3).^{81,82}

SISTEMAS DE REPARO AO DNA

- Reparo por excisão de base (BER)
- Reparo por excisão de nucleotídeo (NER)
- **Reparo por erro de pareamento (MMR)**
- Reparo de quebra de fita dupla (DSBR)



O complexo visa reparar disparidades de inserção/deleção de bases, *loops* que ocorrem durante a replicação, recombinação homóloga e dano ao DNA, que surgem como consequência do erro da DNA polimerase durante a síntese de DNA⁸², impedindo, desta forma, a transmissão destas mutações a futuras gerações celulares.⁸⁴ As células deficientes em MMR mostram um fenótipo mutante com elevadas taxas de mutação espontânea, particularmente em microssatélites (instabilidade de microssatélites), evidenciada pelo aparecimento de alelos adicionais de diferentes comprimentos ou modificação no mesmo.⁸⁰

Nos seres humanos, o reparo de bases mal pareadas (*mismatch*) do DNA é mediado pelas proteínas MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2 e PMS1.⁸⁰ Essas proteínas possuem a capacidade de remover um segmento de DNA contendo uma alteração na sequência de bases (A-T;C-G) e introduzir um novo segmento contendo a sequência correta, o que é feito baseado na sequência existente no “molde” da fita complementar do DNA. A ausência de um sistema eficiente em MMR causa grande instabilidade no genoma, ou seja, os defeitos na sequência do pareamento de bases, não poderão ser reparados adequadamente.⁸⁴

Em particular, o papel crucial da proteína MLH1 como guarda de estabilidade do genoma é exemplificado pelo Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC–Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), também chamada de Síndrome de Lynch (SL)^{85,86}, uma predisposição hereditária de cólon, reto e de outros tipos de câncer associada a mutações da linhagem germinativa em MMR.⁸⁷ Mutações nos genes MMR conferem um risco cumulativo entre 70% a 90% de desenvolver câncer colorretal e, entre mulheres, há um risco adicional de 25% a 60% de desenvolver câncer de endométrio.^{88,89,90} Está associado também a neoplasias na tireóide e trato urogenital.^{91,92}

O gene *MLH1* (MIM#120436) está localizado no cromossomo 3p21.3, com 57.36 Kb e dezenove éxons. Esse gene apresenta ilhas CpG em sua região promotora, as quais são alvos de ligação para o fator de transcrição Sp1, sugerindo que a metilação de DNA pode regular sua expressão.⁹³ De fato, já foi mostrado que metilação em sítios CpG na região proximal do promotor do *MLH1* pode inibir a expressão gênica.^{93,94}

Padrões alterados de metilação nesse gene têm sido relacionados a vários tipos de câncer, como o câncer colorretal⁹⁵, câncer de tireóide⁹⁶, câncer gástrico⁹⁷

câncer esofágico²¹, câncer de mama⁹⁸, entre outros. Em adição à associação ao câncer, a hipermetilação desses genes também foi correlacionada ao aumento da idade nesses mesmos estudos.

2.4 Telomerase (*hTERT*)

A enzima telomerase é considerada um relógio biológico, um marcador a indicar que a senescência celular irá se instalar inevitavelmente, é dependente de RNA e sintetiza DNA telomérico.⁹⁹ Os telômeros são sequências de DNA associados a proteínas que formam um capuz na extremidade dos cromossomos lineares.¹⁰⁰ A ausência de atividade da telomerase impede a compensação da perda de DNA telomérico pela inabilidade da DNA polimerase replicar totalmente a molécula linear de DNA.¹⁰¹ A telomerase é formada por duas subunidades: HTERC e HTERT, sendo a primeira o RNA estrutural e a segunda a subunidade catalítica.¹⁰¹

O papel da telomerase de manter as extremidades dos cromossomos tem sido alvo de grandes estudos, relacionado à sua função no envelhecimento celular, câncer e immortalização celular.^{24,102,103}

Em células somáticas adultas, as extremidades dos cromossomos contêm repetições em série¹⁰⁴ que agem para preservar a integridade cromossômica evitando degradação dos mesmos.¹⁰⁵ Em condições normais nas células somáticas, cada divisão celular está associada com a perda de 30 ± 150 pares de bases de DNA telomérico.^{102,106} Esta perda nas extremidades dos cromossomos, eventualmente, resulta na redução do comprimento associado com a senescência celular.¹⁰⁷ Na presença da telomerase, os comprimentos dos telômeros são mantidos e a senescência replicativa é evitada.^{106,108}

Enquanto as células somáticas humanas normais não apresentam atividade telomerase detectável, células altamente proliferativas, como células germinativas, células hematopoiéticas, células do endométrio, e até 95% das células tumorais expressam telomerase em diferentes níveis.^{24,109,110}

O gene *hTERT* está localizado no cromossomo 5 e seu promotor foi clonado em laboratório e constatou-se a presença de uma grande ilha CpG¹⁰⁰,

sugerindo que a metilação do DNA e a estrutura da cromatina pode desempenhar um papel na regulação da expressão de *hTERT*.^{111,112}

A atividade da telomerase pode ser modulada por fatores epigenéticos, tais como a metilação do DNA e alterações nas histonas. A metilação na região promotora da grande maioria dos genes está associada com a repressão da expressão gênica, mas, no caso do *hTERT* essa correlação é o oposto do modelo geral¹¹³. Foi relatado que a maior parte do gene *hTERT* em células normais apresentam-se não metilados, no entanto encontram-se metilados nas células tumorais, as quais exibem atividade telomerase detectável em diferentes níveis.¹¹³

A ativação da telomerase é um marcador potencial no câncer de pulmão, o qual tem como principal fator etiológico, o fumo. Aproximadamente 85% dos casos de câncer de pulmão apresentam níveis elevados de atividade desta enzima.¹¹⁴ Em cânceres de tireóide¹¹⁵ e mama¹¹⁶, a mesma pode ser detectada nos estágios iniciais de malignidade.

Estudos realizados com várias linhagens de células sugerem que o promotor do gene *hTERT* pode se tornar metilado durante o desenvolvimento de alguns, mas não todos os tumores. Em contraste com os genes supressores de tumor, a hipermetilação em região promotora do *hTERT* não correlaciona-se com a progressão do tumor. Sugerindo que o controle da expressão *hTERT* é complexa e parece envolver mecanismos dependentes e independentes de metilação.¹¹⁷

2.5 Supressor tumoral (TP53)

A proteína p53 é considerada “guardiã do genoma”, pois, caso ocorra um erro na replicação do DNA, ela interrompe o ciclo para que os mecanismos de reparo atuem. Se o processo falhar, ativam-se eventos apoptóticos e há destruição da célula danificada, sendo o gene que codifica essa proteína considerado o de maior importância dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese.¹¹⁸

A p53 é fosfoproteína nuclear com peso molecular de 53 Kd (quilodaltons) e composta por 393 aminoácidos.^{119,120} As variadas funções da p53 são de importância crítica para a supressão tumoral, e a sua perda aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de malignidades.¹²¹

O gene que codifica a p53 é o *TP53* e compreende aproximadamente 20 Kb (quilobases) do DNA, é formado por 11 éxons e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13).^{119,122} Foi inicialmente reconhecido como um possível oncogene devido sua capacidade de alterar fibroblastos.¹²³ Atualmente tem seu papel reconhecido como gene supressor tumoral em mamíferos controlando diversas funções celulares em resposta aos mais diversos estímulos.¹²⁴ Desde sua descoberta, em 1979, foram necessários mais dez anos de estudos para reconhecer o gene *TP53* como um supressor de tumor.¹²⁵

Os genes supressores tumorais encontram-se freqüentemente alterados em diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, leucemias, linfomas, tumores cerebrais e carcinomas de muitos tecidos como a mama, pulmão e cólon, sendo considerado como importante marcador molecular.²⁵ No carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, essas mutações ocorrem em 50% dos casos¹²⁶ e é um evento precoce no seu desenvolvimento, estando presente no tecido clinicamente saudável distante dos tumores, no tecido de fumantes sadios e em lesões pré-malignas.¹²⁷ No câncer de pulmão, as alterações no gene *TP53* estão associadas diretamente a exposição à carcinógenos ambientais, destacando-se o fumo, com expressão anormal desse gene em 40% a 70% dos casos.¹²⁸

As mutações são frequentemente encontradas nos éxons 5 a 9 e as transversões nos códons 157, 173 e 273, e são consideradas decorrentes da exposição ao tabaco.¹²⁹ A associação entre o consumo de tabaco e álcool e a mutação do gene *TP53* é controversa, estudos relatam que a região mutada é diferente em pacientes que consomem somente cigarros e naqueles que fazem uso concomitante de álcool e fumo, assim também como naqueles portadores de câncer de lábio e sugerem que esses mecanismos relacionam-se com a presença de outros fatores exógenos como a radiação ultravioleta.¹³⁰

Pesquisa avaliando o padrão de metilação nos genes *P16*, *P21*, *P27*, *TP53* e *RB1* na polpa dental de indivíduos saudáveis e em tecidos de mixomas odontogênicos (tumor odontogênico benigno), observou que a metilação foi mais comumente detectada em células pulpare do que em mixoma odontogênico. Além disso, maior frequência de amostras não metiladas foi observada no grupo de indivíduos com mixoma odontogênico, quando comparado com amostras obtidas de polpa dentária de indivíduos saudáveis para os genes *P27*, *TP53*, e o *RB1*. O presente estudo demonstrou que a metilação para os genes avaliados é um evento normal em células pulpare saudáveis.¹³¹

3. PROPOSIÇÃO

Essa pesquisa teve como objetivo investigar o efeito do tabagismo no perfil de metilação de DNA no promotor dos genes *MLH1*, *hTERT* e *TP53* em células epiteliais da mucosa bucal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética em Pesquisa

Os procedimentos para a realização desta pesquisa respeitaram as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pela Resolução número 466, de 12 de dezembro de 2012 (publicada em 13/06/13) do Conselho Nacional de Saúde. O presente projeto foi encaminhado para avaliação ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (Anexo 01).

4.2 Amostra

A amostra é composta por 82 indivíduos brasileiros, saudáveis, de ambos os sexos, com faixa etária a partir de 30 anos, pertencentes à Universidade Federal da Paraíba, sendo alunos, professores e funcionários. Os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo com o hábito de fumar: Grupo Controle, n=25 (indivíduos que nunca fumaram), Grupo Fumante, n=25 (indivíduos que fumam há pelo menos 05 anos, 05 cigarros por dia) e Grupo Ex-Fumante, n=32 (indivíduos que fumaram por pelo menos 05 anos, 05 cigarros por dia). Todos os indivíduos assinaram um Termo de Informação e Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para a participação voluntária na pesquisa científica, de acordo com as normas do Comitê em Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPB (Anexo 02). Os indivíduos excluídos da amostra foram diabéticos, grávidas ou em período de lactação, com histórico médico de doença auto-imune, com história de hepatite e infecção por HIV, câncer bucal e que apresentem sinais clínicos visíveis de qualquer alteração no local avaliado (Anexo 03). Não foram excluídos pacientes pertencentes a qualquer grupo étnico racial, pois a tentativa de isolar determinadas características raciais é de pouco valor em um país altamente miscigenado racialmente.

4.3 Obtenção de DNA

O DNA foi purificado a partir de células epiteliais da mucosa bucal. Células da mucosa bucal foram obtidas a partir de um bochecho por 50 segundos com 5mL de dextrose autoclavada a 3% e centrifugadas durante 10 minutos a 3000 rpm para sedimentação.¹³² DNA genômico foi purificado utilizando acetato de amônio 8M segundo protocolo de Aidar & Line (2007).¹³³ Ao final, a quantidade de DNA purificado e sua pureza foram mensuradas em aparelho de espectrofotometria utilizando a razão OD 260/280. Foram considerados puros DNAs que apresentam a razão entre as duas leituras acima de 1,8.

4.4 Análise de Metilação

A análise de metilação para o promotor dos genes *MLH1*, *hTERT* e *TP53* foi realizada utilizando o método de Digestão Enzimática Sensível à Metilação (Specific Methylation–Sensitive Restriction Enzymes). O princípio da técnica se baseia na digestão do DNA genômico pelas enzimas de restrição sensíveis à metilação que não reconhecem a sequência de clivagem quando a citosina se apresenta metilada. Assim, a ausência de bandas após a amplificação indica ausência de metilação em CpG contido no sítio de restrição, enquanto a presença de bandas após a amplificação indica a presença de metilação em CpG contido no sítio de restrição. Ainda, a banda pode se apresentar menos espessa que a amostra controle (não sofreu digestão) e indicar que parte do DNA estava não metilado e foi digerido pela enzima, o que representa metilação parcial. O perfil parcialmente metilado indica que a metilação não está presente em todas as células, e/ou em todos os alelos. Foram utilizadas para análise, duas enzimas de restrição, permitindo a clivagem e análise em dois sítios diferentes, o sítio gcgc, reconhecido pela enzima *HhaI* e o sítio ccgg, reconhecido pela enzima *HpaII*.

Digestão Enzimática –DNA genômico foi submetido à digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação: *HhaI* e *HpaII* (New England Biolabs, Mississauga, ON, USA) em reações contendo 2U da enzima, tampão 1x, 100ng de DNA genômico e água durante 1h a 37°C em reações individuais de 20 µL.

Amplificação do DNA – foi realizada a partir da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) convencional. **MLH1**: solução da PCR foi realizada em volume total de 15µL contendo: 7,5µL GoTaq Green Master Mix (1X) (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 2µL do set de primers (10µM), 4µL (20ng) do volume de DNA digerido e 1,5µL de água. Amplificação do fragmento de 606pb do gene *MLH1* foi realizada em termociclador Biocycler em 35 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C, seguida de extensão final de 7 min a 72°C com primer senso 5'-cgctcgtagtagtgcgtgc-3' e primer anti-senso 5'-tcagtgcctcgtgctcac-3'⁸⁸ (Figura 5). **hTERT**: solução da PCR foi realizada em volume total de 15µL contendo: 7,5µL Go Taq Green Master Mix (1X) (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 2µL do set de primers (10µM), 2,4µL (12ng) do volume de DNA digerido e 3,1 µL de água. Amplificação do fragmento de 267 pb do gene *hTERT* foi realizada em termociclador Biocycler em 30 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 59°C, 1 min a 72°C, seguida de extensão final de 7 min a 72°C com primer senso (5'-agtgttgcagggaggcat-3') e anti-senso (5'-gcctaggctgtgggtaac-3'). A sequência de primers foi obtida a partir da sequência depositada no GenBank (accession number AF097365.1). **TP53**: a solução de PCR foi realizada em volume total de 15µL contendo: 7,5µL GoTaq Green Master Mix (1X) (Promega Corporations, Madison, Wi, USA), 2µL do set de primers (10µM), 2,4µL (12ng) do volume de DNA digerido e 3,1µL de água. Amplificação do fragmento de 186 pb do gene *TP53* foi realizada em termociclador Biocycler em 35 ciclos de: 1 min a 95°C, 1 min a 62°C, 1 min a 72°C, seguida de extensão final de 5 min a 72°C com primer senso: (5'-ctccccaactccatttcctt-3') e anti-senso (5'-tggaacggtggctctagactt-3'), com 186 pb (GenBank Acession Number J04238)¹³⁴

Deteção dos fragmentos – foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, onde foram aplicados 6µl das reações de PCR, aplicando-se voltagem de 60V por 1 hora e 40 minutos, seguido de coloração por nitrato de prata.

Como controle das condições de digestão pela enzima, uma amostra de DNA não metilado foi gerada a partir da amplificação pela PCR. Esses fragmentos foram digeridos nas mesmas condições que as amostras. Ainda, amostras de DNA não digerido foram incluídas como controle da reação de PCR, em paralelo às amostras digeridas e, ambas foram aplicadas no gel para eletroforese. Como

controle negativo, soluções de PCR contendo água como amostra também foram utilizadas.

Abaixo, esquema representativo das regiões escolhidas para análise no promotor dos genes *MLH1*, *hTERT* e *TP53*.

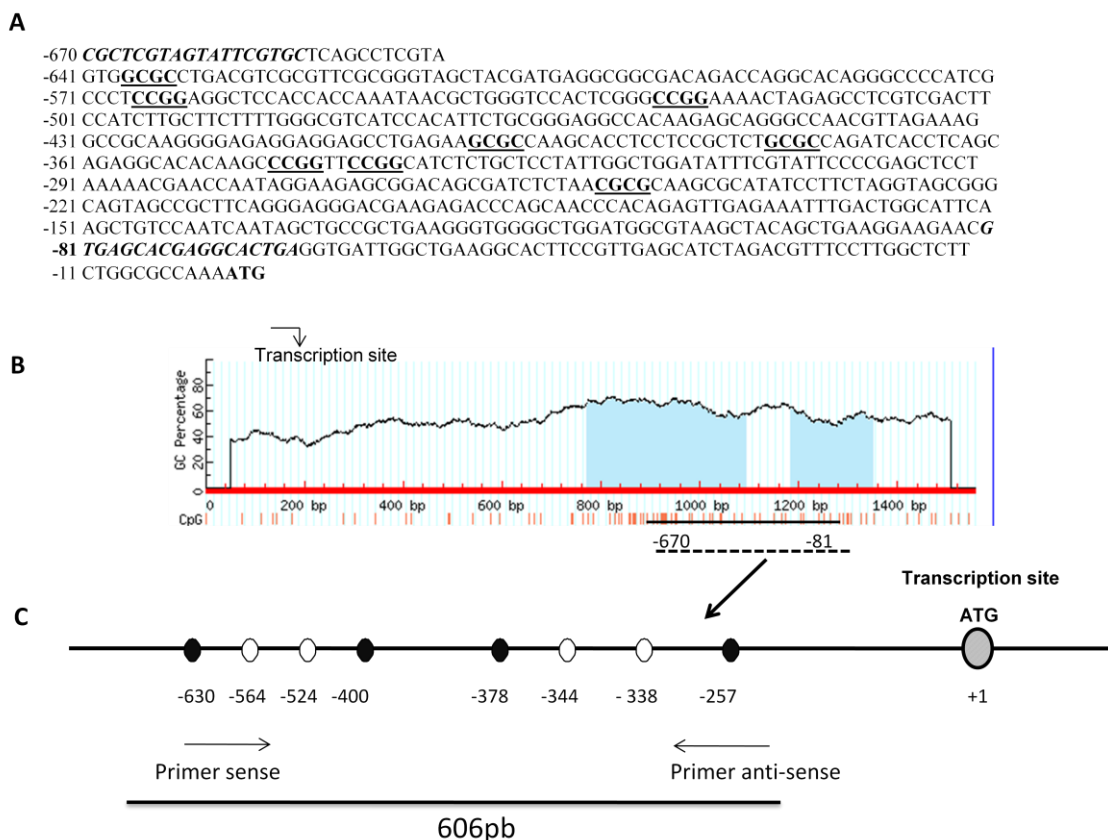


Figura 5. Região promotora do gene de reparo de DNA *MLH1* humano. **(A)** Região promotora abrangendo a região de nucleotídeos entre -670 à -81, região dos primers senso e anti-senso mostradas em itálico e negrito. **(B)** Representação diagramática do promotor do gene *MLH1*, destacando as ilhas CpG (azul). **(C)** Representação esquemática do promotor do gene *MLH1*. *HhaI* =preto e *HpaII* =branco.

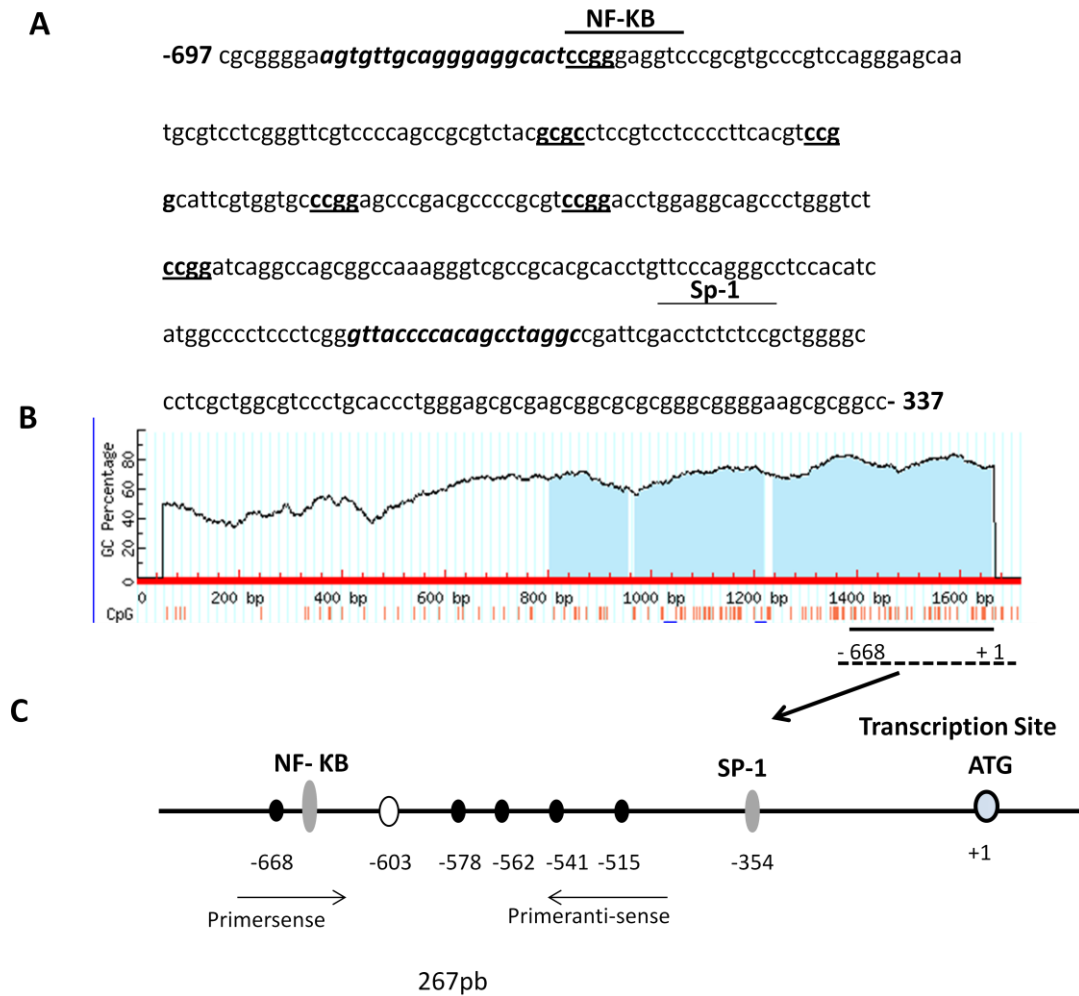


Figura 6. Região promotora do gene da telomerase humano (*hTERT*). **(A)** Região promotora abrangendo a região de nucleotídeos entre -697 à -337, região dos primers senso e anti-senso em itálico e negrito. **(B)** Representação diagramática do promotor do gene *hTERT*, destacando as ilhas CpG (azul). **(C)** Representação esquemática do promotor do gene *hTERT*. *Hha*I = preto e *Hpa*II = branco.

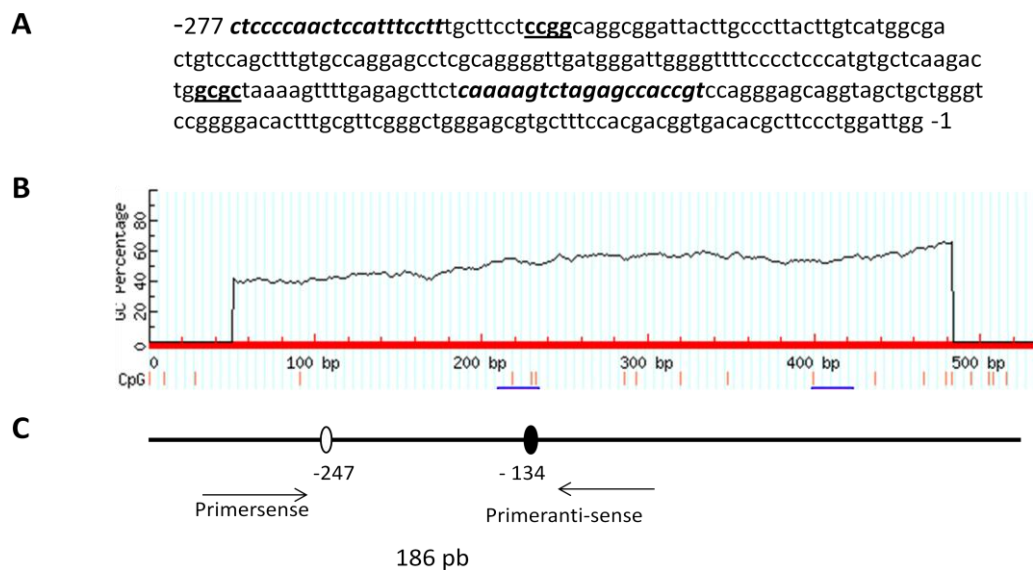


Figura 7. Região promotora do gene *TP53* humano. **(A)** Região promotora abrangendo a região de nucleotídeos entre -277 à -1, região dos primers senso e anti-senso mostradas em itálico e negrito. **(B)** Representação diagramática do promotor do gene *TP53*. **(C)** Representação esquemática do promotor do gene *TP53*. *HhaI* =preto e *HpaII*= branco.

4.5 Análise Estatística dos Resultados

A análise estatística foi realizada a partir do Software BioEstat 5.0 (Pará- Brasil). A frequência de metilação no DNA entre os grupos foi avaliada pelo teste Qui-Quadrado ao nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os dados demográficos das amostras para análise dos genes *MLH1*, *hTERT* e *TP53*.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros demográficos e consumo de cigarros da população estudada.

	Não Fumantes (n=25)	Fumantes (n=25)	Ex-fumantes (n=32)
Idade (anos)*	46,5 ± 9,7	50,0 ± 12,1	56,0 ± 11,3
% Homens**	40	59,2	65,6
% Mulheres	60	40,7	34,3
Cigarros/ dia	-----	15,5 ± 6,0	19,0 ± 14,5
Tempo de consumo de cigarros (em anos)	-----	28,9 ± 13,3	20,0 ± 12,4
Cessação do hábito de fumar (em anos)	-----	-----	14,5 ± 9,1

*p= 0,006, ANOVA; **p=0,0007, χ^2

MLH1

Para o sítio *HhaI* os dados mostraram que de um total de 25 amostras analisadas para o grupo não fumante, 14 amostras estavam metiladas (56%), 6 não metiladas (24%) e 5 parcialmente metiladas (20%). Para o grupo fumante, das 25 amostras utilizadas, foram obtidas 19 amostras metiladas (76%) e 4 não metiladas (16%) e 2 parcialmente metiladas (8%). Quando foi avaliado o grupo ex-fumante, das 32 amostras analisadas, 20 estavam metiladas (62,5%) e 6 não metiladas (18,7%) e 6 parcialmente metiladas (18,7%). Diferença significativa foi observada entre o grupo não fumante e fumante (p=0,007), bem como entre ex-fumantes e fumantes (p=0,05), sendo a condição metilada mais frequente em fumantes (Figura 8A).

Avaliando o sítio *HpaII*, os dados mostraram que de um total de 25 amostras estudadas para o grupo não fumantes foi observado 10 amostras metiladas (40%) e 5 não metiladas (20%) e 10 parcialmente metiladas (40%). Para o grupo fumante, das 25 amostras estudadas foi obtido um total de 16 amostras metiladas (64%) e 5 não metiladas (20%) e 4 parcialmente metiladas (16%). Para o grupo ex-fumante, das 32 amostras analisadas, 12 estavam metiladas (37,5%) e 6 não metiladas (18,7%) e 14 parcialmente metiladas

(43,8%). Diferença significativa foi observada entre o grupo não fumante e fumante ($p=0,0002$), bem como entre ex-fumantes e fumantes ($p<0,0001$), sendo a condição metilada mais frequente em fumantes (Figura 8B). O sítio *HpaII* ainda mostrou estar mais frequentemente parcialmente metilado em não fumantes e ex-fumantes ao contrário do sítio *HhaI* em que a condição parcialmente metilada e não metilada aparecem mais ou menos na mesma proporção em todos os grupos.

hTERT

Analisando o sítio *HhaI* para o grupo não fumantes, foi observado que de um total de 25 amostras, 21 estavam metiladas (84%), 4 estavam não metiladas (16%). Para o grupo de fumantes, de 25 amostras estudadas, foi verificado 24 amostras metiladas (96%) e 1 amostra não metilada (4%). No grupo de ex-fumantes, de um total de 28 amostras, foi obtido 21 amostras metiladas (75%) e 7 amostras não metiladas (25%). Diferença significativa foi observada entre o grupo não fumante e fumante ($p=0,0047$) e entre o grupo fumante e ex-fumante ($p<0,0001$) sendo a condição metilada a mais frequente em fumantes (Figura 9A).

Para o sítio *HpaII* para o grupo não fumante, foi encontrada de um total de 25 amostras, que 10 estavam metiladas (40%), 9 não metiladas (36%) e 6 parcialmente metiladas (24%). Para o grupo fumante, foi observado de um total de 25 amostras, que 9 estavam metiladas (36%), 13 não metiladas (52%) e 3 parcialmente metiladas (12%). No grupo ex-fumante foi verificado de um total de 28 amostras, que 10 estavam metiladas (35,7%), 13 estavam não metiladas (46,4%) e 5 parcialmente metiladas (17,8%). Diferença significativa foi observada entre o grupo não fumante e fumante ($p=0,027$) sendo a condição não metilada a mais frequente em fumantes (Figura 9B).

TP53

Ao analisar o sítio *HhaI*, foi observado que de um total de 25 amostras para o grupo de não fumantes, todas as amostras estavam metiladas (100%). O mesmo ocorreu para os grupos fumante e ex-fumante. Assim, não foi detectada diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 10A).

Para o sítio *HpaII*, ao avaliar um total de 24 amostras no grupo não

fumantes, foi observado 24 amostras metiladas (100%). O mesmo ocorreu para os grupos fumante e ex-fumante. Assim, não foi detectada diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 10B).

Uma vez que os dados demográficos (Tabela 1) apontaram diferenças em relação à idade e gênero entre os grupos, foi realizada análise estatística comparando-se esses fatores com o perfil de metilação de DNA independente do hábito de fumar, utilizando o teste Qui-Quadrado ao nível de significância de 5%. Quanto à idade foram formados dois grupos onde o primeiro foi composto por indivíduos de 30 a 45 anos e o segundo por indivíduos com mais de 45 anos. Os dados desta pesquisa revelaram que não há diferença significativa em relação à idade para o gene *MLH1* ($p=0,81$) nem para o gene *hTERT* ($p=0,28$). O mesmo foi observado em relação ao sexo, tanto para *MLH1* ($p=0,44$) quanto para *hTERT* ($p=0,57$).

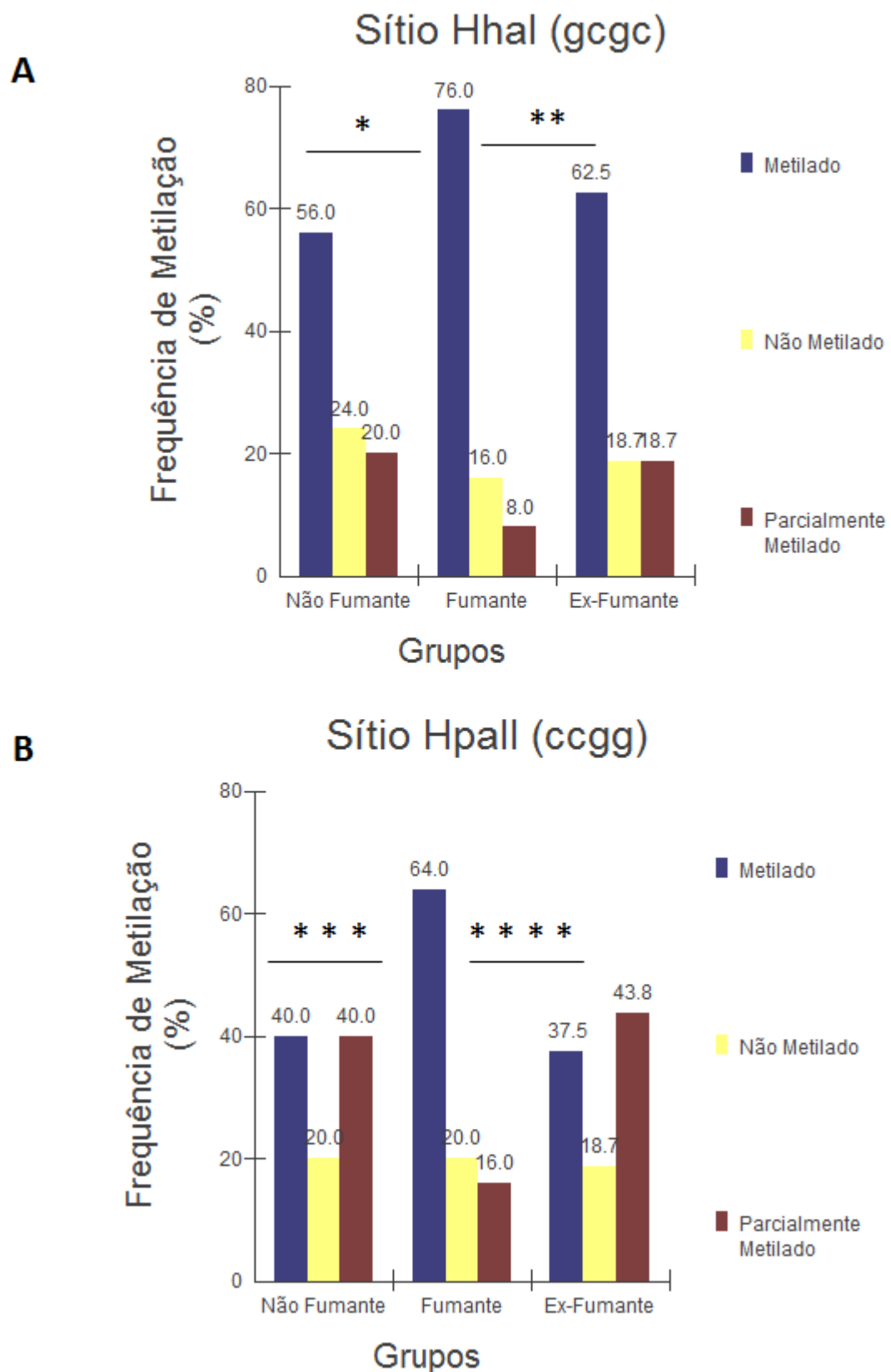


Figura 8: (A) Frequência de metilação no promotor do gene de reparo *MLH1* para o sítio *HhaI*. **(B)** Frequência de metilação no promotor do gene de reparo *MLH1* para o sítio *HpaII*. Não fumantes (n=25), fumantes (n=25) e ex-fumantes (n=32). * p=0,007, ** p=0,05, *** p=0,0002, **** p<0,0001; χ^2 .

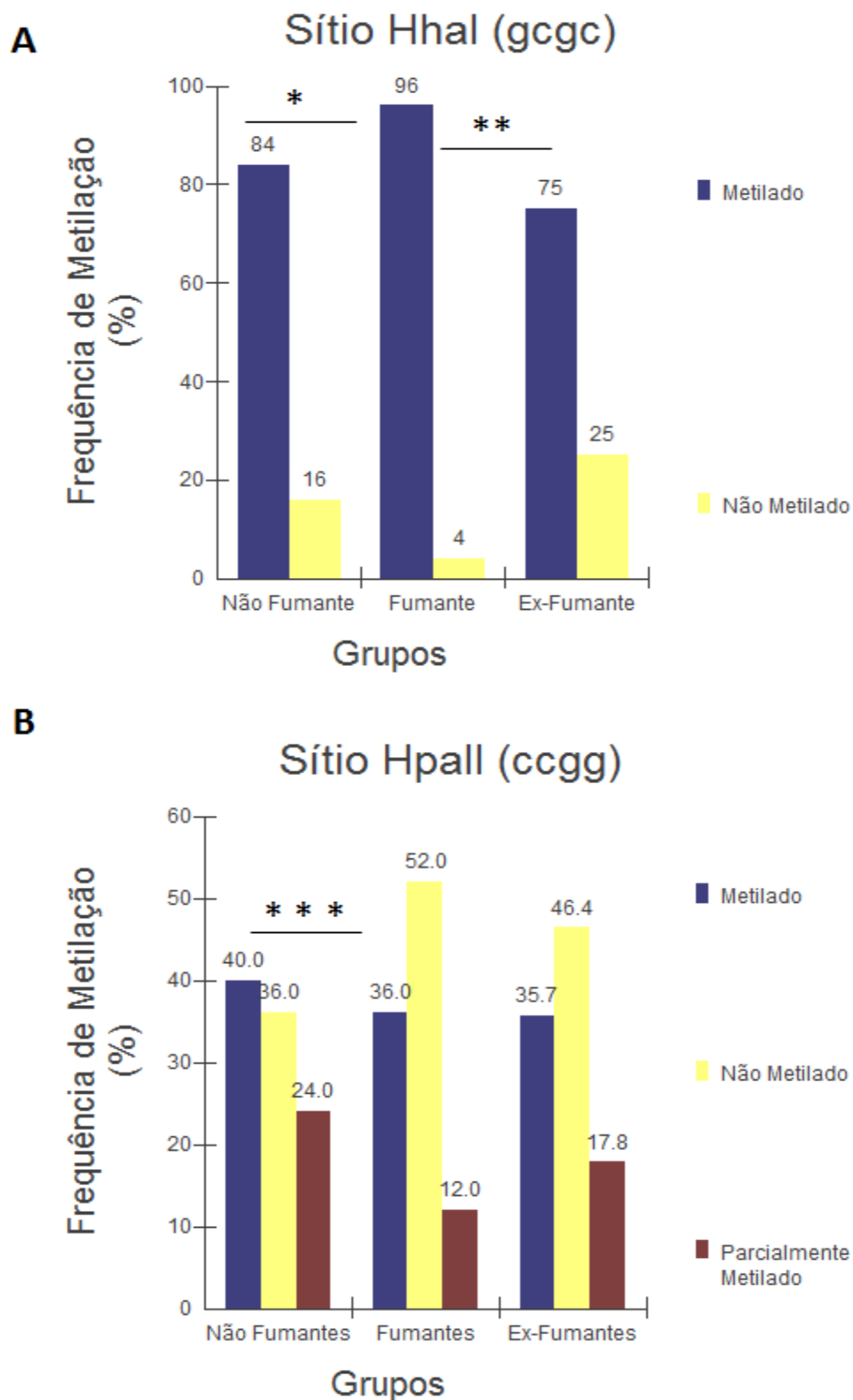


Figura 9: (A) Frequência de metilação no promotor do gene da telomerase *hTERT* para o sítio *HhaI*. (B) Frequência de metilação no promotor do gene da telomerase *hTERT* para o sítio *HpaII*. Não fumantes (n=25), fumantes (n=25) e ex-fumantes (n=28). * p=0,0047, ** p<0,0001, *** p=0,027; χ^2 .

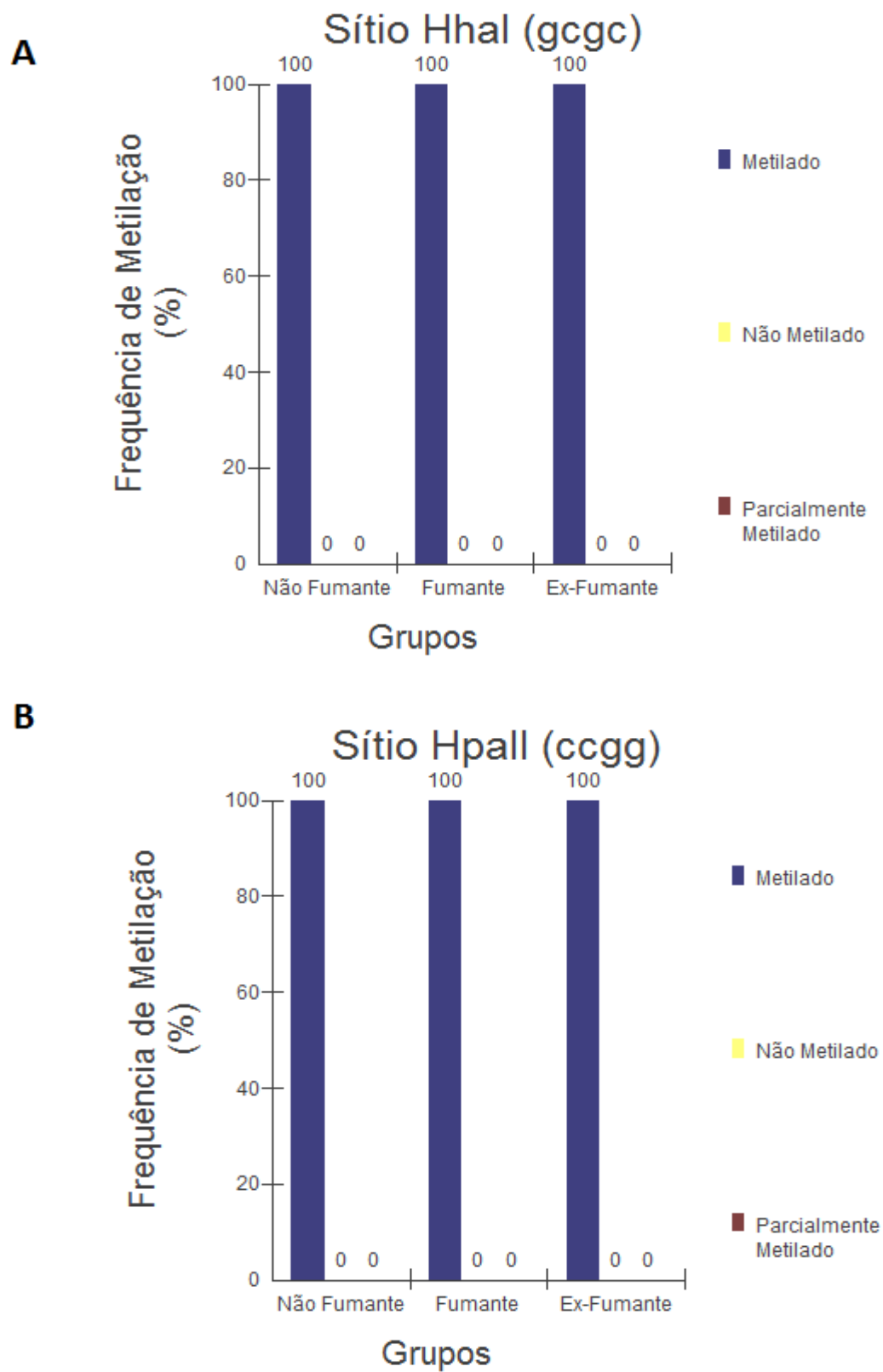


Figura 10:(A) Frequência de metilação no promotor do gene *TP53* para o sítio *HhaI*. (B) Frequência de metilação no promotor do gene *TP53* para o sítio *HpaII*. Não fumantes (n=24), fumantes (n=25) e ex-fumantes (n=32) $p > 0,05; \chi^2$.

6. DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos que envolvem a epigenética, relacionando a ativação e silenciamento de muitos genes e suas consequências no organismo humano esclarece muitas questões até então desconhecidas. Alterações epigenéticas incluem as modificações de histonas e a metilação do DNA, fundamentais para estabelecer a programação correta da expressão dos genes.

O padrão epigenético é reversível e pode ser influenciado por diversos fatores ambientais como radiação solar, envelhecimento, dieta e o fumo. Alguns genes podem ter sua expressão gênica influenciada por alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, definindo dessa forma como os mesmos agirão e qual papel terá na proteção das células ou no desenvolvimento de inúmeras doenças, incluindo o câncer.

O presente trabalho avaliou o perfil de metilação de DNA no promotor de genes reconhecidamente relacionados ao processo da tumorigênese. A maioria dos estudos avaliam o efeito do tabagismo em células do sangue, sendo este o primeiro estudo que analisa o efeito do tabagismo nos promotores dos genes *MLH1*, *hTERT* e *TP53* nas primeiras células a sofrer exposição à fumaça de cigarro, ou seja, células epiteliais bucais.

MLH1

Os dinucleotídeos CpG selecionados para análise no promotor do gene *MLH1* estão localizados próximos à região compreendida entre os nucleotídeos - 670 e -81 (GenBank accession number U83845.1) (Fig.5A). Esses nucleotídeos estão localizados em duas ilhas CpG como verificado pelo Programa <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html> (Fig.5B). Essa região apresenta sítios de ligação para diversos fatores de transcrição tais como: AP-1, NF- κ B, OCT-1, OCT-2, Sp-1, p53, entre outros.⁹⁵

Ao todo foram estudados oito sítios CpG, sendo quatro reconhecidos pela enzima *HhaI* e quatro reconhecidos pela enzima *HpaII* (Fig 5) e observou-se que a frequência de DNA totalmente metilado é maior em indivíduos fumantes em ambos os sítios. Para o sítio *HpaII* a condição parcialmente metilado é mais frequente em indivíduos que nunca fumaram ou pararam de fumar, em contraste

com indivíduos fumantes onde a frequência de DNA parcialmente metilado foi menor e consequentemente a condição metilada foi maior. Isso sugere que o fumo induziu metilação no sítio ccgg no promotor do gene *MLH1* e que a cessação do hábito reverteu o processo.

Diferente desse estudo, outra pesquisa avaliando o perfil de metilação em dois *locus*, *F2RL3* (coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3/relacionado com ativação das plaquetas e coagulação) e *GPR15* (protein coupled receptor 15/co-receptor para o vírus da imunodeficiência humana) em células do sangue, observaram que o efeito do tabagismo pode persistir por longos períodos seguintes à cessação do hábito de fumar e pode envolver a reprogramação epigenética, concluindo que alterações na metilação do DNA associados ao tabagismo podem ajudar a identificar caminhos moleculares que contribuem para a latência entre a exposição e o aparecimento da doença.¹⁷ O conceito de respostas diferenciais para a recuperação e a exposição ao fumo do cigarro foi bem articulada no estudo de expressão de genes conduzida em células epiteliais brônquicas primárias, esta pesquisa observou que enquanto que a maior parte da expressão de genes reverte o perfil da metilação de forma rápida, um subconjunto de *locus* demonstrou mudanças lentas ou irreversíveis.¹³⁵

A metilação de DNA pode inibir por completo a expressão gênica, e no caso do *MLH1*, pode provocar um defeito no sistema de reparo MMR, o que predisporia à instabilidade genética resultando em mutações funcionalmente importantes.¹³⁶ De fato, estudos mostram associação entre hipermetilação no promotor do *MLH1* e repressão gênica, metilação no mesmo sítio ccgg estudado no presente trabalho já foi mostrada estar associada à diminuição na expressão de *MLH1* em câncer colorretal.^{95,137} Outros estudos mostraram metilação e inibição da expressão proteica em câncer gástrico^{9,138}, esofágico²¹, de mama⁹⁸, de ovário¹³⁹ e outros.

Recentemente, foi observado metilação do gene *MLH1* em câncer bucal (carcinoma de células escamosas/CCE), esse perfil foi mostrado em muitos casos em estágios iniciais do câncer e na metade dos casos em estágios mais tardios da doença, sugerindo que a metilação no promotor desse gene é um evento inicial e é mantido durante a progressão do tumor^{140,141} Em contraste, outros estudos encontraram baixa taxa de metilação do *MLH1* em carcinomas

orais.^{142,143} Foi observada porcentagem de metilação de 0% dentre 96 indivíduos avaliados, entre amostras de língua, assoalho e gengiva inferior, obtidas através de biópsia ou ressecção cirúrgica.¹⁴² Outro estudo encontrou uma porcentagem de 8% de metilação entre 99 amostras estudadas, utilizando amostras de CCE de diversos locais da cavidade oral, obtidos através de ressecção cirúrgica.¹⁴³ Os autores relataram que as diferenças entre resultados de variados estudos podem ser consequência dos diversos estágios de desenvolvimento e progressão em que se encontram os diferentes tumores estudados. Em geral, a frequência de metilação de *MLH1* no tecido de carcinomas orais é observada em até 76% dos casos analisados, indicando que pode servir como um biomarcador para a presença precoce de carcinoma de células escamosas oral.^{140,143}

Estudo avaliando o gene *MLH1* em carcinoma de células de laringe, mostrou alta taxa de metilação nesse gene, associado com o aumento da migração de células do câncer, invasão tumoral, e a um fenótipo mais agressivo.¹⁴⁴

Pesquisa avaliando o tecido tumoral de 40 carcinomas de células escamosas e 40 adenocarcinomas de pulmão em vários estágios, com finalidade de definir o perfil de metilação e possível silenciamento de genes de reparo de DNA - *MLH1* e *MSH2* detectou que a frequência de hipermetilação encontrada nesses genes foi elevada, com uma maior prevalência de metilação do gene *MLH1* em 72% de carcinoma de células escamosas de pulmão. Este autor relata que a metilação do DNA surgiu como um biomarcador potencial específico para câncer e que a hipermetilação de ilhas CpG localizadas nas regiões promotoras dos genes de reparo de DNA está agora firmemente estabelecida como um importante mecanismo para inativação do gene.¹⁴⁵

hTERT

Os dinucleotídeos CpG selecionados para análise no promotor do gene *hTERT* estão localizados próximos à região compreendida entre os nucleotídeos -697 e -337. Essa região apresenta sítios de ligação para os fatores de transcrição NF- κ B e Sp-1¹¹¹ (Fig.6A). Em adição, esse promotor apresenta típicas ilhas CpG próximas ao sítio de início de transcrição. Ao todo são três ilhas CpG localizadas

no promotor do *hTERT*, como verificado pelo programa <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html> (Fig.6B). Os dinucleotídeos estudados estão localizados na ilha CpG mais próxima ao sítio de início de transcrição.

Ao todo foram estudados seis sítios CpG, sendo cinco reconhecido pela enzima *HhaI* e um reconhecidos pela enzima *HpaII* (Fig 6) e observou-se que a frequência de DNA totalmente metilado é maior em indivíduos fumantes no sítio *HhaI* e DNA não metilado é mais frequente no sítio *HpaII* de fumantes. Isso sugere que o fumo pode induzir tanto a metilação quanto à desmetilação no DNA. De fato, estudos mostram que a influência do fumo no perfil de metilação do DNA é sítio-específica.¹⁷ Outro estudo correlacionou a especificidade da metilação com o tipo de tecido estudado, realizando o sequenciamento de DNA de cromossomos humanos em 12 diferentes tecidos, e estimou-se que apenas cerca de 5-15% de CpG são metilados de um modo tecido-específico.¹⁴⁶ Além disso, estes apresentam padrões de metilação mais diferenciais entre os tecidos de desenvolvimento distantes, tais como fígado (derivado do endoderma) e rim (derivado do mesoderma)¹⁴⁷, do que entre os tecidos com desenvolvimentos próximos, tais como vários tipos de linfócitos (todos derivados do mesoderma).¹⁴⁶

Estudo realizado com fumantes e não fumantes em células do epitélio bronquial humano não encontrou metilação em nenhuma cultura de células bronquiais no promotor do gene *hTERT*, embora os resultados indiquem uma associação entre a exposição ao agente cancerígeno do tabaco (número de cigarro/anos) e atividade da telomerase em epitélio brônquico normal.¹⁹ Sugerindo que um aumento na atividade da telomerase em epitélio brônquico normal pode prolongar a vida útil das células em risco de transformação maligna e, assim, contribuir para a carcinogênese de pulmão.¹⁹

Analisando o perfil de metilação em carcinomas de cólon foi observado um aumento significativo da metilação da *hTERT* e atividade da telomerase, enquanto que, na mucosa de transição e saudável, a atividade da telomerase foi significativamente mais baixa do que em tecidos tumorais, mesmo com níveis elevados de metilação do *hTERT*.¹⁴⁸ Estes dados indicam que a metilação do promotor *hTERT* é um evento necessário para a expressão do mesmo, como é a atividade da telomerase.¹⁴⁸ Outros autores concordam com esse fato relatando

que embora a metilação na região promotora de genes esteja associada com a repressão da expressão gênica, no caso do *hTERT* essa correlação é o oposto do modelo geral, pois como já relatado em diversos estudos, a maior parte do gene *hTERT* apresenta-se não metilado em células normais, no entanto encontram-se metilados em células tumorais, as quais exibem atividade telomerase detectável em diferentes níveis.^{113,117,149,150,151}

Estudos realizados com várias linhagens de células sugerem que o promotor do gene *hTERT* pode se tornar metilado durante o desenvolvimento de alguns, mas não todos os tumores.¹¹⁷ Em contraste com os genes supressores de tumor, a hipermetilação em região promotora do *hTERT* não correlaciona-se com a progressão das neoplasias, sugerindo que o controle da expressão desse gene é complexa e parece envolver mecanismos dependentes e independentes de metilação.¹¹⁷

O conjunto de CpG encontrados dentro do promotor *hTERT* levou muitos pesquisadores a acreditar que a metilação desempenha um papel chave na regulação de *hTERT*.¹⁵² No entanto, resultados contraditórios têm sido relatados, alguns grupos mostraram que a metilação do promotor *hTERT* resulta no silenciamento do gene^{153,154}, enquanto outros tem encontrado nenhuma correlação significativa entre a metilação do promotor de *hTERT* e posterior expressão do gene.^{117,155}

Em estudo realizado com células tumorais (mama, colo do útero, fígado, bexiga, cólon, rin, pele) a condição de hipermetilação foi mais frequente em células saudáveis do mesmo tecido.^{113,156,157,158,159}

Os resultados deste trabalho refletem bem a complexidade que envolve os mecanismos de metilação do gene *hTERT* já que foram encontrados resultados diferentes para os dois sítios estudados. Ao avaliar o sítio *HhaI* foi encontrado maior frequência de metilação em fumantes em relação aos não fumantes, em contraste ao sítio *HpaII*, onde a condição não metilada foi mais frequente em fumantes.

TP53

Os dinucleotídeos CpG selecionados para análise no promotor do gene *TP53* estão localizados próximos à região compreendida entre os nucleotídeos -277 e -91. Essa região apresenta sítios de ligação para os fatores de transcrição NF-κB e Sp-1¹¹¹ (Fig.7A). Alguns autores sugerem que o promotor do gene *TP53* apresenta forma não usual, ou seja, sua região promotora não apresenta as regiões consenso CAAT e TATA e, em adição, não apresenta também ilhas CpG mas sim CpG esparsos.^{160,161}

Ao todo foram estudados dois sítios CpG, sendo um reconhecido pela enzima *HhaI* e um reconhecido pela enzima *HpaII* (Fig 7) e observou-se que não houve diferença na frequência de metilação entre os grupos estudados.

Resultados semelhantes a este estudo foram observados ao analisar o efeito do fumo no gene *TP53* em células sanguíneas saudáveis de fumantes, as quais não mostraram diferenças entre os níveis de metilação do promotor *TP53*.¹⁶² Outro estudo com urina e saliva de fumantes também não detectou diferenças entre os níveis de metilação do promotor do gene *TP53*, não sendo observado metilação em nenhuma das amostras testadas¹⁶³ em contraste com o presente estudo que, embora, não tenha também encontrado diferenças na frequência de metilação entre os grupos estudados, observou a presença de metilação em todas as amostras avaliadas. Ainda, outro estudo demonstrou que a metilação para o gene *TP53* é um evento normal em células saudáveis da polpa dentária, observando maior nível de metilação nessas células em comparação com células de tumores odontogênicos.¹³¹

Nos últimos anos, a presença de múltiplos componentes genéticos e epigenéticos específicos têm sido documentadas em tecido tumoral de portadores de câncer de pulmão.¹⁶⁴ Estas anomalias também foram encontradas no epitélio respiratório de fumantes e ex-fumantes e parecem estar diretamente associadas com o cigarro.^{165,166} Em pesquisa realizada, foi observado que a hipermetilação de genes supressores tumorais pode ser detectada em fluidos biológicos vários anos antes de um diagnóstico clínico de câncer de pulmão, concluindo que as alterações genéticas e epigenéticas podem ser detectadas em indivíduos

fumantes livres do câncer, tendo, portanto, um importante valor no diagnóstico precoce.⁷⁵ Um estudo realizado em pacientes com câncer de pulmão foi observada hipometilação no gene *TP53* nas células sanguíneas desses pacientes, em particular no interior dos exóns 5-8.¹⁶⁷

Em adição à fumaça do cigarro, outros fatores ambientais já foram mostrados capazes de alterar o perfil de metilação de genes supressores tumorais. Foi observado hipermetilação na região promotora dos genes *TP53* e *TP16* no DNA extraído de leucócitos de sangue periférico de pessoas expostas a diferentes doses de arsênio, e em menor número, em pessoas altamente expostas foi observado hipometilação no gene *TP53*. Também foi observado nesse estudo hipermetilação do gene *TP53* em pessoas com câncer de pele induzido e não induzido pelo arsênio. Não houve diferença entre a metilação dos genes *TP53* e *TP16* quando correlacionou os indivíduos com o hábito de fumar, sexo ou idade.¹⁶⁸ Este autor explica que a principal via metabólica para desintoxicação do arsênio em humanos é a metilação do mesmo, catalisada por uma metiltransferase utilizando SAM (S-Adenosilmetionina) como o doador de metil, resultando na produção de ácido arsênico monometílico e ácido arsênico dimetílico, excretados através da urina. Exposição ao arsênio pode causar a indução da ação da metiltransferase sobre a citosina produzindo sua metilação e isto pode explicar a hipermetilação inicial.¹⁶⁹ Por outro lado, a exposição prolongada ao arsênio pode causar o esgotamento de doadores de metil (SAM), devido ao consumo excessivo dos mesmos, resultando em hipometilação.¹⁷⁰ Além disso, o conteúdo de metionina da dieta e polimorfismos de genes que participam na via de desintoxicação, também se espera que influencie o estado de metilação desse composto químico.¹⁶⁸

Além dos fatores ambientais, fatores intrínsecos como a idade e o sexo também estão associados ao perfil de metilação de DNA diferencial entre os indivíduos.¹⁷¹ Uma vez que os dados demográficos dessa pesquisa (Tabela 1) apontaram diferenças em relação à idade e gênero entre os grupos, foi realizada análise estatística comparando-se esses fatores com o perfil de metilação de DNA independente do hábito de fumar. Os dados desse trabalho revelaram que não há diferenças no perfil de metilação de DNA no promotor dos genes *MLH1* e *hTERT* entre homens e mulheres nem entre indivíduos entre 30 e 45 anos e mais de 45

anos, sugerindo que o hábito de fumar isoladamente pode promover alterações do perfil de metilação de DNA nas regiões promotoras dos genes estudados.

A metilação de DNA pode ser modificada por diversos fatores ambientais⁷⁰, dentre estes, agentes externos que atuam durante o início da embriogênese podem induzir a extensas modificações de metilação do DNA, enquanto fatores que agem em etapas mais tardias da vida são mais susceptíveis de induzir a alterações em menor extensão relacionadas a um tecido específico.¹⁷¹ O primeiro momento pode estar envolvido na programação fetal de distúrbios adultos¹⁷², enquanto que o último pode desempenhar um papel na carcinogênese do tecido específico.¹⁷³ A fumaça do cigarro pode estar presente em ambas as fases, e atua modulando a expressão e a atividade da DNMT1.¹⁷¹ Células que se dividem ativamente podem ser mais suscetíveis a defeitos na metilação do DNA mediada por exposição a fatores ambientais, o que pode, em parte, explicar a ligação entre tabagismo e câncer.¹⁷¹

Em estudos levando-se em consideração o hábito de fumar e tumores como: gástrico, pancreático, uterino, colorretal e de bexiga, a frequência de metilação de DNA nas amostras tumorais foi maior em fumantes.^{14,16,72,74,174,175} Esses estudos demonstram que, o cigarro pode alterar o epigenoma mesmo de órgãos não diretamente expostos, sugerindo que o cigarro tem um efeito generalizado, provavelmente alterando de alguma forma todo o sistema do indivíduo. Não menos interessantes são os estudos que relatam alterações epigenéticas em amostras saudáveis de fumantes. Assim como o presente trabalho, isso já foi mostrado em sangue e escarro, incluindo estudos com o *MLH1*.^{17,75,76,77,176} Esses dados são de extrema importância, pois como já foi sugerido, poderiam prever possíveis casos de câncer, isto é, a “*Field cancerization*”. Genes como *MGMT* e *MLH1* apresentaram-se metilados, mesmo em tecidos pré-cancerosos: *MGMT* no adenoma colorretal¹⁷⁷ e *MLH1* em hiperplasia endometrial¹⁷⁸ e colite ulcerosa.¹⁷⁹

Pesquisa avaliando o efeito do tabagismo em fumantes e ex-fumantes na metilação do DNA usando amostras de sangue coletados prospectivamente a partir de indivíduos saudáveis que posteriormente desenvolveram câncer de mama ou cólon em comparação com controles pareados, mostraram um aumento

na expressão do gene *AHRR* (aryl hydrocarbon receptor repressor) e diminuição da metilação intragênica devido ao tabagismo, sem evidência de uma associação com maior risco de câncer de cólon ou mama.¹⁸⁰ Outro estudo observou que, a metilação de alguns genes , incluindo *AHRR* , não retorna aos níveis anteriores em relação ao fumo , o que indica necessidade de um longo prazo para reversão do perfil da metilação.¹⁸¹ Tomados em conjunto, estes estudos relatam uma forte ligação entre o consumo de tabaco e um resultado biológico direto sobre o epigenoma, o qual pode ter impacto sobre o risco de câncer associado ao tabagismo.¹⁸⁰

Até o momento, além do presente trabalho, somente dois trabalhos investigaram o efeito do tabagismo em epitélio oral de indivíduos saudáveis, e esses mostraram hipometilação nas regiões *Alu* e *LINE*.^{182,183} Essas regiões são sequências de DNA que têm a capacidade de se integrar em novas localizações cromossômicas, alterando o mecanismo de determinados genes, e a metilação do DNA protege a integridade do genoma por suprimir o poder de mobilidade desses elementos transponíveis.¹⁸⁴ A perda de metilação do DNA permite a reativação e transposição dessas regiões.¹⁸⁵

Alguns estudos experimentais têm observado que, em particular a nicotina, pode induzir diretamente a metilação do DNA.¹⁸⁶ Entretanto, o mecanismo pelo qual o cigarro pode levar a mudanças no epigenoma é desconhecido. Contudo, tem sido sugerido que o estresse oxidativo pode levar a perda ou ganho de metilação.⁶² A fumaça do cigarro contém agentes oxidantes que podem causar danos as macromoléculas das células expostas. Em adição, a fumaça do cigarro pode induzir marcada ativação de leucócitos e plaquetas que também contribuem para o estresse oxidativo.¹⁸⁷ A produção de espécies reativas de oxigênio pode danificar proteínas, lipídeos e DNA. Neste último elas podem acontecer na forma de mutações, deleções, alterações no açúcar das bases, halogenação ou oxidação de citosinas.⁶² Citosinas 5-halogenadas podem causar inapropriada metilação *de novo* uma vez que a DNMT1 não é capaz de distinguir citosina metilada de citosina halogenada. Já a oxidação da citosina leva à desmetilação do DNA. A oxidação dos grupos metil muda a conformação da 5-metilcitosina para hidroximetilcitosina, tornando-a irreconhecível pela DNMT1, o que, após a mitose, leva à perda de metilação.⁶²

Outro mecanismo para o ganho de metilação pode ser devido à desregulação de DNA metiltransferases, que já foram mostradas estarem altamente expressas em células tumorais de pulmão e laringe, particularmente em fumantes.^{15,188,189} Além disso, o fumo pode estar associado com a redução de vitamina B12, a qual é necessária para a síntese normal de S-adenosilmetionina, uma importante proteína envolvida na via da metiltransferase.¹⁹⁰ Estudos demonstram que o fumo pode também alterar a expressão dos níveis de DNA metiltransferases; em amostras clínicas de fumantes foi observado que as DNMT1, DNMT3A, DNMT3B foram altamente expressa em tumores do pulmão¹⁵ e DNMT1 em carcinoma escamoso esofágico.¹⁸⁸ Em cultura de células epiteliais brônquicas humanas expostas ao extrato de fumo de cigarro a expressão de DNMT1 diminuiu, e aumentou a expressão da DNMT3B.¹³⁵ Outro estudo observou que diminuiu a expressão da DNMT1 em neurônios expostos à nicotina.¹⁹¹

Um estudo investigando o epitélio respiratório de fumantes e ex-fumantes mostrou a presença de alterações como hipermetilação do gene *p16* que parecem estar diretamente associadas com o cigarro.¹⁶⁶ Foi observado que 50% de todos os cânceres de pulmão diagnosticados ocorre em pessoas que pararam de fumar por pelo menos 5 anos, suportando que os danos ao epitélio respiratório é persistente ao longo do tempo.¹⁹²

Os dados encontrados nesse estudo não mostraram diferenças entre os níveis de metilação entre os não-fumantes e ex-fumantes, para o *MLH1* e *hTERT*, sugerindo que a cessação do tabagismo reverteu o processo. Estudos prévios já mostraram que parar de fumar pode reverter o perfil de metilação do DNA. De acordo com dados obtidos a partir de células do sangue, alguns autores demonstram que os genes podem ser diferencialmente expressos em fumantes e ex-fumantes.^{17,176,182} Em células sanguíneas de ex-fumantes foi mostrado que a reversão do perfil de metilação ocorre em alguns sítios (*MYLK*), mas não em outros (*GPR15* e *FASLG*).¹⁷ Outro grupo mostrou que, em células epiteliais bucais a hipometilação das regiões LINE não foi revertida em ex-fumantes que haviam parado de fumar por mais de 1 ano.¹⁸² Uma ampla análise da metilação do genoma mostrou que parar de fumar tabaco presumivelmente permite recuperar o estado de metilação do DNA, onde foi observado que vários sítios CpG de células

sanguíneas de ex-fumantes apresentaram perfil semelhante à indivíduos que nunca fumaram.¹⁷⁶

Identificar as vias moleculares que contribuem para o atraso entre a exposição e o surgimento da doença pode oferecer oportunidades para intervenções. Autores sugerem que o conhecimento do perfil de metilação de genes relacionados ao câncer em epitélio oral obtidos pela saliva ou bochecho tem um grande potencial para ser uma ferramenta barata e não invasiva para detecção de câncer bucal.^{193,194} Outros estudos sugerem ainda que isso poderia prever a situação dos pulmões, já que ambos, cavidade oral e pulmões sofrem com a exposição dos carcinógenos da fumaça do cigarro.⁷⁸ Uma vez que a metilação do DNA pode ser modulada por medicamentos, essa informação ainda poderia ser utilizada para uma terapia personalizada, preocupação cada vez mais crescente de estudos farmacogenéticos.¹⁹⁵

O tabagismo continua a ser um grave problema de saúde e a compreensão dos efeitos do mesmo sobre perfil de metilação do DNA é uma importante área de pesquisa e, em última instância está relacionado a fenótipos de doenças relevantes. Esse estudo confirma trabalhos anteriores nos quais a metilação do DNA pode surgir como consequência do hábito de fumar cigarros. Aqui nos concentramos em genes relacionados ao câncer em células epiteliais bucais, as primeiras a sofrer com a fumaça do cigarro, o qual é a principal causa de câncer oral. Baseados nos fatos expostos e em nos dados dessa pesquisa sugerimos que o perfil de metilação de DNA dos genes *MLH1* e *hTERT* são biomarcadores promissores para alterações bucais relacionadas ao tabagismo.

7. CONCLUSÃO

1- O fumo está associado a alterações no perfil de metilação de DNA em genes relacionados ao câncer em células epiteliais bucais de fumantes saudáveis e essa alteração parece ser sítio-específica:

- *MLH1*: frequência de metilação é maior em fumantes em comparação ao grupo não fumante e ex-fumante;
- *hTERT*: frequência de metilação é maior no sítio *HhaI* e menor no sítio *HpaII* de fumantes em comparação ao grupo não fumante e ex-fumante;
- *TP53*: frequência de metilação é semelhante em todos os grupos.

2- Não há diferenças entre os grupos não fumante e ex-fumante sugerindo que a cessação do hábito de fumar pode reverter o perfil de metilação do DNA nos sítios estudados.

REFERÊNCIAS*

1. Feinberg AP. Cancer epigenetics take center stage. *Pnas*. 2001; 98(2): 392–94.
2. D'Alessio AC, Szyf M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem Cell Biol*. 2006 Aug; 84(4): 463–76.
3. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: development, structure and function. St.Louis (MO): CV Mosby. 2007; 7 edição.
4. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*. 2006 Nov; 3(11): 442.
5. Vernooy JH, Kucukaycan M, Jacobs JA, Chavannes NH, Buurman WA, Dentener MA, Wouters EF. Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2002 Nov 1; 166(9): 1218–24.
6. Fowles J, Dybing E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tob Control*. 2003; 12(4): 424–30.
7. Keith RL. Chemoprevention of Lung Cancer. *Proc Am Thorac Soc*. 2009 Apr 15; 6(2): 187–93.
8. Woolgar JA, Hall GL. Determinants of outcome following surgery for oral squamous cell carcinoma. *Future Oncol*. 2009 Feb; 5(1): 51-61.
9. Braber S, Henricks PA, Nijkamp FP, Kraneveld AD, Folkerts G. Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation. *Respir Res*. 2010 Jul 22; 11: 99.
10. Taybos G. Oral changes associated with tobacco use. *Am J Med Sci*. 2003 Oct; 326(4): 179-82. Review.
11. Van Oijen MG, Gilsing MM, Rijkssen G, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Increased number of proliferating cells in oral epithelium from smokers and ex-smokers. *Oral Oncol*. 1998; 34(4): 297–303.
12. Abdelaziz MS, Osman TE. Detection of Cytomorphological Changes in Oral Mucosa among Alcoholics and Cigarette Smokers. *Oman Med J*. 2011 Sep; 26(5): 349–52.
13. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martínez ME, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. Evaluation of keratinization and AgNORs count

in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral*. 2004 May-Jul; 9(3): 197–203.

14. Lea JS, Coleman R, Kurien A, Schorge JO, Miller DS, Minna JD, et al. Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190(3): 674–9.

15. Lin RK, Hsu HS, Chang JW, Chen CY, Chen JT, Wang YC. Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer*. 2007 Feb; 55(2): 205–13.

16. Wolff EM, Liang G, Cortez CC, Tsai YC, Castelao JE, Cortessis VK, et al. RUNX3 methylation reveals that bladder tumors are older in patients with a history of smoking. *Cancer Res*. 2008 Aug 1; 68(15): 6208–14.

17. Wan ES, Qiu W, Baccarelli A, Carey VJ, Bacherman H, Rennard SI, Agusti A, Anderson W, Lomas DA, Demeo DL. Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome. *Hum Mol Genet*. 2012 Jul; 21(13): 3073–82.

18. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*. 2002; 59(2): 241–57.

19. Yin HW, Slebos RJ, Randell SH, Umbach DM, Parsons AM, Rivera MP, Detterbeck FC, Taylor JA. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett*. 2007 Feb 8; 246(1-2): 24–33.

20. Letai AG. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Rev Cancer*. 2008 Feb; 8(2): 121–32.

21. Ling ZQ, Li P, Ge MH, Hu FJ, Fang XH, Dong ZM, Mao WM. Aberrant methylation of different DNA repair genes demonstrates distinct prognostic value for esophageal cancer. *Dig Dis Sci*. 2011 Oct; 56(10): 2992–3004.

22. Michiels S, Laplanche A, Boulet T, Dessen P, Guillonnet B, Méjean A, Desgrandchamps F, Lathrop M, Sarasin A, Benhamou S. Genetic polymorphisms in 85 DNA repair genes and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009 May; 30(5): 763–8.

23. Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 2001; 269: 1–12.

24. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994 Dec; 266(5193): 2011–5.

25. Nagler RM. Molecular aspects of oral cancer. *Anticancer Res.* Athens. Sept. 2002; 22(5): 2977–80.
26. Mills KD. Tumor suppression: Putting p53 in context. *Cell Cycle.* 2013 Nov 15; 12(22): 3461–62.
27. Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol.* 2012 Feb; 41(1): 10–3.
28. Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature.* 1969 Aug 9; 223(5206): 580–2.
29. Szyf M. The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicol Sci* 2007 Nov; 100(1): 7–23.
30. Universidade Federal de Santa Catarina: ppgqa.ufsc.br Disponível em: <http://stke.sciencemag.org/>
31. Boccia S, Hung R, Ricciardi G, Gianfagna F, Ebert MP et al. Meta- and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and Gastric Cancer risk: a huge-GSEC review. *Am J Epidemiol.* 2008 Mar 1; 167(5): 505–16.
32. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med.* 2002 Mar 4; 4(4): 1–17. Review.
33. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000 Oct; 9(16): 2395–402. Review.
34. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug; 23(15): 5293–300.
35. Waterland RA. Assessing the effects of high methionine intake on DNA methylation. *J Nutr.* 2006 Jun; 136(6): 1706S–710S.
36. Zhu JK. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Ver Genet.* 2009; 43: 143–66.
37. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol* Aug 2003 ; 23(16): 5594–5605.
38. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4: 143–53.
39. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002 Nov; 18(11): 1427–31.

40. Han L, Su B, Li WH, Zhao Z. CpG island density and its correlations with genomic features in mammalian genomes. *Genome Biol.* 2008; 9(5): R79.
41. Wang, Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics.* 2004 May 1; 20(7): 1170–77.
42. Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Jan 31; 103(5): 1412–7.
43. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet.* 2008 Jun; 9(6): 465–76.
44. Geiman TM, Muegge K. DNA Methylation in early development. *Molecular Reproduction and Development.* Hoboken. 2010; 77: 105–113.
45. Hendrich B, Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol.* 1998 Nov; 18(11): 6538–47.
46. Dhasarathy A, Wade PA. The MBD protein family-Reading an epigenetic mark? *Mutat Res.* 2008 Dec; 647(1-2): 39–43.
47. Fukushige S, Kondo E, Horii A. Methyl CpG targeted recruitment of p300 reactivates tumor suppressor genes in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb; 379(4): 1021–6.
48. Kanai Y, Hirohashi S. Alterations of DNA methylation associated with abnormalities of DNA methyltransferases in human cancers during transition from a precancerous to a malignant state. *Carcinogenesis.* 2007 Dec; 28(12): 2434–42.
49. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in Cancer. *Carcin.* 2010 Sep 13; 31(1): 27–36.
50. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002 ; 59(2): 241–57.
51. Slaughter DP, Southwick HW, Smejka IW. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953 Sep; 6(5): 963–8.
52. Hong WK. Multiple primary squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol.* Apr 1987; 10(2): 182–183.
53. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Mizokame M, Ueda R, Hirohashi S. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis-A comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2000; 32(5): 970–9.

54. Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61: 3410–8.
55. Guo M, Akiyama Y, House MG, Hooker CM, Heath E, Gabrielson E, et al. Hypermethylation of the *GATA* genes in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(23): 7917–24.
56. Maekita T, Nakazawa K, Mihara M, Nakajima T, Yanaoka K, Iguchi M, et al. High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1; 12: 989–95.
57. Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, Liu JC, Shen RZ, Diaz NM, et al. Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res.* 2006 Nov 15; 12(22): 6626–36.
58. Torezan LAR, Festa-Neto C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An. Bras. Dermatol.* 2013 Sep; 88 (5): 775–86.
59. Roach HI, Yamada N, Cheung KS, Tilley S, Clarke NM, Oreffo RO, Kokubun S, Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* 2005 Oct; 52(10): 3110–24.
60. Oliveira NF, Damm GR, Andia DC, Salmon C, Nociti FH JR, Line SR, De Souza AP. DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in oral cells of smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2009 Sep; 36(9): 719–25.
61. Andia DC, De Oliveira NF, Casarin RC, Casati MZ, Line SR, De Souza AP. DNA methylation status of the *IL8* gene promoter in aggressive periodontitis. *J Periodontol.* 2010 Sep; 81(9): 1336–41.
62. Valinluck V, Sowers LC. Inflammation-Mediated Cytosine Damage: A Mechanistic Link between Inflammation and the Epigenetic Alterations in Human Cancers. *Cancer Res.* 2007 Jun 15; 67(12): 5583–86.
63. Blanco D, Vicent S, Fraga MF, Fernandez-Garcia I, Freire J, Lujambio A, et al. Molecular analysis of a multistep lung cancer model induced by chronic inflammation reveals epigenetic regulation of p16 and activation of the DNA damage response pathway. *Neoplasia.* 2007 Oct; 9(10): 840–52.
64. Ushijima T. Epigenetic Field for Cancerization. *J Biochem Mol Biol.* 2007 Mar; 40(2): 142–50.

65. Gasche JA, Hoffmann J, Boland CR, Goel A. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *Int J Cancer*. 2011;129(5): 1053–63.
66. Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000*. 1997 Jun; 14: 173–201.
67. Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling. *Curr Opin Hematol*. 2000; 7(3): 178–82.
68. Akgul C, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Nov; 60(11): 2402–8.
69. Ushijima T, Asada K. Aberrant DNA methylation in contrast with mutations. *Cancer Sci*. 2010; 101(2): 300–5.
70. Terry MB, Delgado-Cruzata L, Vin-Raviv N, Wu HC, Santella RM. DNA methylation in white blood cells: association with risk factors in epidemiologic studies. *Epigenetics*. 2011 Jul; 6(7): 828–37.
71. Demarini DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res*. 2004 Nov; 567(2-3): 447–74.
72. Gao J, Song J, Huang H, Li Z, Du Y, Cao J, et al. Methylation of the SPARC gene promoter and its clinical implication in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010; 29: 28–36.
73. Jin Y, Xu H, Zhang C, Kong Y, Hou Y, Xu Y, et al. Combined effects of cigarette smoking, gene polymorphisms and methylations of tumor suppressor genes on non-small cell lung cancer: a hospital-based case-control study in China. *BMC Cancer*. 2010; 12(10): 422–9.
74. Limsui D, Vierkant RA, Tillmans LS, Wang AH, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Cigarette smoking and colorectal cancer risk by molecularly defined subtypes. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Jul 21; 102(14): 1012–22.
75. Belinsky SA, Palmisano WA, Gilliland FD, Crooks LA, Divine KK, Winters SA, et al. Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Res*. 2002 Apr 15; 62(8): 2370–7.
76. Baryshnikova E, Destro A, Infante MV, Cavuto S, Cariboni U, Alloisio M, et al. Molecular alterations in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers: results from a large screening program. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 15; 14(6): 1913–9.
77. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Padbury JF, Bueno R, Sugarbaker DJ, Yeh RF, Wiencke JK, Kelsey KT. Aging and environmental exposures alter tissue-specific

DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* 2009 Aug; 5(8): e1000602.

78. Bhutani M, Pathak AK, Fan YH, Liu DD, Lee JJ, Tang H, Kurie, et al. Oral epithelium as a surrogate tissue for assessing smoking-induced molecular alterations in the lungs. *Cancer Prev Res.* 2008 Jun; 1(1): 39–44.

79. Philibert RA, Sears RA, Powers LS, Nash E, Bair T, Gerke AK, Hassan I, Thomas CP, Gross TJ, Monick MM. Coordinated DNA methylation and gene expression changes in smoker alveolar macrophages: specific effects on VEGF receptor 1 expression. *J Leukoc Biol.* 2012 Sep; 92(3): 621–31.

80. Buermeier AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet.* 1999; 33: 533–64.

81. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev.* 1999 Feb; 9(1): 89-96. Review.

82. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevarian AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet.* 2000 Jan; 24(1): 27-35.

83. Schofield MJ, Hsieh P. DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57: 579-608. Review.

84. Blasi MF, Ventura I, Aquilina G, Degan P, Bertario L, Bassi C, et al. A human cell-based assay to evaluate the effects of alterations in the MLH1 mismatch repair gene. *Cancer Res.* 2006 Sep 15; 66(18): 9036–44.

85. Lynch HT, De La Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 1999; 36: 801–18.

86. Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56: 213–25.

87. Peltomäki P. DNA mismatch repair and cancer. *Mutat. Res.* 2001 Mar; 488(1): 77–85.

88. Vasen HF, Stormorken A, Menko FH, et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *J Clin Oncol.* 2001 Oct 15; 19(20): 4074–80.

89. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Feb 18; 96(4): 261–8.

90. Macdonald DJ. Germline mutations in cancer susceptibility genes: an overview for nurses. *Semin Oncol Nurs*. 2011 Feb; 27(1): 21–33.
91. Liu Y, Bodner WF, Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Júnior SLA. Carcinogênese colorretal. In: *Câncer do Cólon Reto e Ânus*. Lemar-Tecmed. 2004: 43–54.
92. Sanchez De Abajo A, De La Hoya M, Van Puijenbrok M, Godin J, Díaz-Rubio E, Morreau H, et al. Dual role of LOH at MM loci in hereditary non-polyposis colorectal cancer? *Oncogene*. 2006 Mar 30; 25(14): 2124–30.
93. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res*. 1999; 59: 2029–33.
94. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in hMLH1 promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene*. 2001 Oct 25; 20(48): 7120–7.
95. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997 Mar 1; 57(5): 808–11.
96. Gatzidou E, Michailidi C, Tseleni-Balafouta S, Thocharis S. An epitome of DNA related genes and mechanisms in thyroid carcinoma. *Cancer Letters*. 2010 Apr 28; 290(2): 139–47.
97. Alves MK, Ferrasi AC, Lima VP, Ferreira MV, de Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH. Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotype. *Pathobiology*. 2011 Aug 17; 78(5): 266–76.
98. Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ. Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *J Pathol*. 2011 Oct; 225(2): 222–31.
99. Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev*. 1998 Apr 15; 12(8): 1073–85.
100. Olovnikov AM. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1971; 201(6): 1496–9.
101. Olovnikov AM. Theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol*. 1973 Sep; 41(1): 181–190.

102. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990; 345: 458–460.
103. Counter CM, Avilion AA, Lefevre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cell which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992 May; 11(5): 1921–29.
104. Greider CW. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1996; 65: 337–365.
105. Greider CW. Chromosome first aid. *Cell*. 1991; 67: 645–647.
106. Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol*. 1998 Feb 26; 8(5): 279–282.
107. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1997 Feb; 214(2): 99–106.
108. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 1998 Jan 16; 279(5349): 349–52.
109. Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, Harley CB. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 Apr; 91: 2900–04.
110. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*. 1997 Apr; 33(5): 787–91.
111. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum. Mol. Genet*. 1999; 8: 137–42.
112. Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, Inoue M. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*. 1999 Feb; 59(3): 551–7.
113. Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2004; 325: 1037–1043.
114. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, et al. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res*. 1997 Jun; 57(12): 2373–7.

115. Umbricht CB, Saji M, Westra WH, Udelsman R, Zeiger MA, Sukumar S. Telomerase activity: a marker to distinguish follicular thyroid adenoma from carcinoma. *Cancer Res.* 1997 Jun 1; 57(11): 2144-7.
116. Poremba C, Bocker W, Willenbrin H, Schafer KL, Otterbach F, Burger H, Diallo, R, Dockhorn-Doworniczak B. Telomerase activity in human proliferative breast lesions. *Int. J. Oncol.* 1998 Mar; 12(13): 641-8.
117. Devereux TR, Horikawa I, et al. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res.* 1999; 59(24): 6087-90.
118. Wang Y, Dong XX, Cao Y, Liang ZQ, Han R, Wu JC, Gu ZL, Qin ZH. p53 induction contributes to excitotoxic neuronal death in rat striatum through apoptotic and autophagic mechanisms. *Eur J Neurosci.* 2009 Dec; 30(12): 2258-70.
119. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* Basingstoke. Dec. 1999; 18(53): 7621-36.
120. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J. Oral Pathol. Med.* Copenhagen. Oct. 2000; 29(9): 413-25.
121. Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene.* 1999 Dec; Basingstoke, 18(53): 7637-43.
122. Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, Chou MY. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2000 May; 36(3): 272-76.
123. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979 Mar 15; 278(5701): 261-3.
124. Moll UM, Erster S, Zaika A. p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Dec 28; 1552(2): 47-59.
125. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct ; London, 1(1): 68-76.
126. Deshpande AM, Wong DT. Molecular mechanisms of head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008; 8: 799-809.
127. Van Oijen MG , Slootweg PJ. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* Baltimore. Mar 2000; 9(3): 249-56.

128. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*.1991; 351(6326): 453–6.
129. Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*. 2011 Sep; 20(3): 161–73.
130. Hsieh LL, Wang PF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Chen MC, Chang JT, Cheng AJ. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis*. 2001 Sep; 22(9): 1497-503.
131. Moreira PR, Cardoso FP, Brito JAR, Batista CP, Gomes CC, Gomez RS. Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. *Braz. Dent. J*. 2011; 22(5): 422–7.
132. Trevilatto PC, Line SR. Use of buccal epithelial cells for PCR amplification of large DNA fragments. *J Forensic Odontostomatol*. 2000 Jun; 18(1): 6-9.
133. Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007; 18(2): 148–52
134. Tuck SP, Crawford L. Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol*. 1989; 9(5): 2163–72.
135. Liu F, Killian JK, Yang M, Walker RL, Hong JA, Zhang M, Davis S, Zhang Y, Hussain M, Xi S, et al. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene*. 2010 Jun 24; 29(25): 3650-64.
136. Guan H, Ji M, Hou P, et al. Hypermethylation of the DNA mismatch repair gene hMLH1 and its association with lymph node metastasis and T1799A BRAF mutation in patients with papillary thyroid cancer. *Cancer*. 2008; 113: 247–55.
137. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, Liu Y, Wang D, Sun G, Zhao Y. MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features. *PLoS One*. 2013 Mar 29; 8(3): e59064.
138. Zhao C, Bu X. Promoter methylation of tumor-related genes in gastric carcinogenesis. *Histol Histopathol*. 2012 Oct; 27(10): 1271–82.
139. Murphy MA, Wentzensen N. Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review. This article is a US Government work and, as such, is in the public domain of the United States of America. *Int J Cancer*. 2011 Oct 15; 129(8): 1914–22.
140. Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2009 Apr; 15(3): 206–13.

141. González-ramírez I, Ramírez- amador V, Irigoyen-camacho ME, Sánchez-Pérez Y, Anaya-Saavedra G, Granados-García M, García-Vázquez F, García-Cuellar CM. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral Oncol.* 2011 Jan; 47(1): 22–6.
142. 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 Oct; 8(10): 3164–71.
143. Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2003 May 20; 105: 41–6.
144. Pierini S, Jordanov SH, Mitkova AV, Chalakov IJ, Melnicharov MB, Kunev KV, Mitev VI, Kaneva RP, Goranova TE. Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head Neck.* 2013 Jun 26; doi: 10.1002/hed. 23413.
145. Gomes A, Reis-Silva M, Alarcão A, Couceiro P, Sousa V, Carvalho L. Promoter hypermethylation of DNA repair genes MLH1 and MSH2 in adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the lung. *Rev Port Pneumol.* 2013 Dec 17; pii: S0873-2159(13): 00103–7.
146. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat. Genet.* 2006; 38, 1378–85.
147. Pai AA, Bell JT, Marioni JC, Pritchard JK, Gilad Y. A genome-wide study of DNA methylation patterns and gene expression levels in multiple human and chimpanzee tissues. *PLoS Genet.* 2011; 7: e1001316.
148. Valles-Bautista C, Bougel S, Piñol-Felis C, Viñas-Salas J, Benhattar J. hTERT methylation is necessary but not sufficient for telomerase activity in colorectal cells. *Oncol Lett.* 2011 Nov; 2(6): 1257–60.
149. Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Laird PW, Ehrlich M. DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res.* 2004 Jul 1; 64(13): 4472–80.
150. Renaud S, Loukinov D, et al. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(4): 1245–56.
151. Meeran SM, Katiyar S, et al. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008 May; 229(1): 33–43.

152. Kyo S, Takakura M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(3): 669–77.
153. Shin KH, Kang MK, et al. Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes. *Br J Cancer.* 2003 Oct 20; 89(8): 1473–8.
154. Liu L, Lai S, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene.* 2004 Sep 29; 340(1): 1–10.
155. Dessain SK, Yu H, et al. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 2000; 60(3): 537–41.
156. Zhang J, Lai M, Chen J. Methylation status of p16 gene in colorectal carcinoma and normal colonic mucosa. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2000 Apr; 29(2): 95–8.
157. Zhang YJ, Ahsan H, Chen Y, Lunn RM, Wang LY, Chen SY, Lee PH, Chen CJ, Santella RM. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A and p16 and its relationship to aflatoxin B1-DNA adduct levels in human hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog.* 2002 Oct; 35(2): 85–92.
158. Pirker C, Holzmann K, Spiegl-Kreinecker S, Elbling L, Thallinger C, Pehamberger H, Micksche M, Berger W. Chromosomal imbalances in primary and metastatic melanomas: over-representation of essential telomerase genes. *Melanoma Res.* 2003 Oct; 13(5): 483–92.
159. Takuma Y, Nouse K, Kobayashi Y, Nakamura S, Tanaka H, Matsumoto E, Fujikawa T, Suzuki M, Hanafusa T, Shiratori Y. Telomerase reverse transcriptase gene amplification in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2004 Nov; 19(11): 1300–4.
160. Bienz-Tadmor BR, Zakut-Houri S, Libresco D, Givol M, Oren . The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *Embo J.* 1985 Dec 1; 4: 3209–13.
161. Lamb P, Crawford L. Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol.* 1986 May; 6(5): 1379–85.
162. Peluso ME, Munnia A, Bollati V, Srivatanakul P, Jedpiyawongse A, Sangrajang S, Ceppi M, Giesi RW, Boffetta P, Baccarelli AA. Aberrant methylation of hypermethylated-in-cancer-1 and exocyclic DNA adducts in tobacco smokers. *Toxicol Sci.* 2013 Oct; 137(1): 47–54.

163. Simkin M, Abdalla M, El-Mogy M, Haj-Ahmad Y. Differences in the quantity of DNA found in the urine and saliva of smokers versus nonsmokers: implications for the timing of epigenetic events. *Epigenomics*. 2012 Jun; 4(3): 343–52.
164. Forgacs E, Zöchbauer-Müller S, Oláh E, Minna JD. Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. *Pathol Oncol Res*. 2001; 7(1): 6–13.
165. Muller A, Edmonston TB, Corao DA, et al. Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 1014–9.
166. Destro A, Bianchip, Alloisio M, et al. K-ras and p16(INK4A) alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer*. 2004; 44: 23–32.
167. Woodson K, Mason J, Choi SW, Hartman T, Tangrea J, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D. Hypomethylation of p53 in peripheral blood DNA is associated with the development of lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2001 Jan; 10(1): 69–74.
168. Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D, Gupta M, Chaudhuri U, Lahiri S, Das S, Ghosh N, Chatterjee D. DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci*. 2006 Feb; 89(2): 431–7.
169. Goering PL, Aposhian HV, Mass MJ, Cebrian M, Beck BD, Waalkes MP. The enigma of arsenic carcinogenesis: Role of metabolism. *Toxicol. Sci.* 1999 May; 49(1): 5–14.
170. Mass MJ, Wang L. Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene p53 in human lung cells: A model for a mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res*. 1997 Jun; 386(3): 263–77.
171. Lee KW, Pausova Z. Cigarette smoking and DNA methylation. *Front Genet*. 2013 Jul 17; 4: 132.
172. Suter MA, and Aagaard K. What changes in DNA methylation take place in individuals exposed to maternal smoking in utero? *Epigenomics*. 2012 Apr; 4(2): 115–8.
173. Ehrlich M, Lacey M. DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 75(4): 31–56.
174. Curtin K, Samowitz WS, Wolff RK, Herrick J, Caan BJ, Slattery ML. Somatic alterations, metabolizing genes and smoking in rectal cancer. *Int J Cancer*. 2009 Jul 1; 125(1): 158–64.

175. Wani M, Afroze D, Makhdoomi M, Hamid I, Wani B, Bhat G, Wani R, Wani K. Promoter methylation status of DNA repair gene (hMLH1) in gastric carcinoma patients of the Kashmir valley. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(8): 4177–81.
176. Zeilinger S, Kühnel B, Klopp N, Baurecht H, Kleinschmidt A, Gieger C, Weidinger S, Lattka E, Adamski J, Peters A, Strauch K, Waldenberger M, Illig T. Tobacco smoking leads to extensive genome-wide changes in DNA methylation. *PLoS One.* 2013 May 17; 8(5): e63812.
177. Esteller M, Sparks A, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Gonzalez S, Tarafa G, Sidransky D, Meltzer SJ, Baylin SB and Herman JG. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res.* 2000 **Aug 15**; 60(16): 4366–71.
178. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB and Herman JG. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol.* 1999 Nov ; 155(5): 1767–72.
179. Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, et al. Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res.* 2000 Sep 1; 60(17): 4864 – 68.
180. Shenker NS, Polidoro S, Van Veldhoven K, Sacerdote C, Ricceri F, Birrell MA, Belvisi MG, Brown R, Vineis P, Flanagan JM. Epigenome-wide association study in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Turin) identifies novel genetic loci associated with smoking. *Hum Mol Genet.* 2013 Mar 1; 22(5): 843–51.
181. Bossé Y, Postma DS, Sin DD, Lamontagne M, Couture C, Gaudreault N, Joubert P, Wong V, Elliott M, Van den Berge M, et al. Molecular signature of smoking in human lung tissues. *Cancer Res.* 2012 Aug 1; 72(15): 3753–63.
182. Wangsri S, Subbalekha K, Kitkumthorn N, Mutirangura A. Patterns and possible roles of LINE-1 methylation changes in smoke exposed epithelia. *PLoS One.* 2012; 7(9): e45292.
183. Puttipanyalears C, Subbalekha K, Mutirangura A, Kitkumthorn N. Alu hypomethylation in smoke exposed epithelia and oral squamous carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(9): 5495–501.
184. Levin HL, Moran JV. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat. Rev. Genet.* 2011 Aug 18; 12(9): 615–27.

185. Tsukahara S, Kobayashi A, Kawabe A, Mathieu O, Miura A, Kakutani T. Bursts of retro-transposition reproduced in Arabidopsis. *Nature*. 2009 Sep; 461(7262): 423–6.
186. Soma T, Kaganoi J, Kawabe A, Kondo K, Imamura M, Shimada Y. Nicotine induces the fragile histidine triad methylation in human esophageal squamous epithelial cells. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1; 119(5): 1023–7.
187. Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci*. 2009; 1(14): 3128-44.
188. Wang J, Xu Y, Li J, Sun X, Wang LP, Ji WY. The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation in laryngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Jun; 48(6): 541–6.
189. Nishihara R, Wu K, Lochhead P, Morikawa T, Liao X, Qian ZR, Inamura K, Kim SA, Kuchiba A, Yamauchi M, Imamura Y, Willett WC, Rosner BA, Fuchs CS, Giovannucci E, Ogino S, Chan AT. Long-term colorectal-cancer incidence and mortality after lower endoscopy. *N Engl J Med*. 2013 Sep 19; 369(12): 1095–105.
190. Gabriel HE, Crott JW, Ghandour H, et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutrition*. 2006; 83: 835–41.
191. Satta R, Maloku E, Zhubi A, Pibiri F, Hajos M, Costa E, Guidotti A. Nicotine decreases DNA methyltransferase 1 expression and glutamic acid decarboxylase 67 promoter methylation in GABAergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Oct 21; 105(42): 16356–61.
192. Wistuba I, Lam S, Behrens C, et al. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Sep 17; 89(18): 1366 –73.
193. Radhakrishnan R, Kabekkodu S, Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis. *J Oral Pathol Med*. 2011 Oct; 40(9): 665–76.
194. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol*. 2012 Nov; 8(11): 1407–25.
195. Heyn H, Méndez-González J, Esteller M. Epigenetic profiling joins personalized cancer medicine. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013 Jun; 13(5): 473–9.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 8ª Reunião realizada no dia 28/08/2012, o projeto de pesquisa intitulado: “IMPACTO DO FUMO NO PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA EM CÉLULAS BUCAIS” da Naila Francis Paulo de Oliveira. Prot. nº 0136/12. CAAE: 02886912.1.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Dr.ª Elizabeth M. de Almeida
Coordenadora CEP/CCS/UFPB
Mat. SIAPE: 0332618

ANEXO 02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre o efeito do cigarro na molécula de DNA e está sendo desenvolvida pela Profa Naila Francis Paulo de Oliveira, do Departamento de Biologia Molecular-Centro de Ciências Exatas e da Natureza- Universidade Federal da Paraíba e sua equipe de pesquisa (alunos vinculados ao programa PIBIC/PIVIC da UFPB e programa de Pós graduação em Odontologia).

O objetivo do estudo é identificar possíveis alterações no DNA (a molécula que guarda nossa informação genética) com o hábito de fumar. A finalidade deste trabalho é contribuir para o entendimento do efeito do cigarro, visando indiretamente contribuir para o entendimento do impacto do cigarro para a saúde humana.

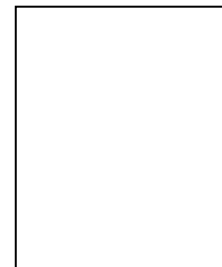
Solicitamos a sua colaboração para responder algumas perguntas sobre sua saúde e doação de células da boca. As células da boca serão coletadas a partir de um bochecho com solução esterilizada de açúcar. Solicitamos também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos previsíveis. Solicitamos também a sua permissão para uso do material coletado para pesquisas posteriores.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa ou Responsável Legal



Espaço para impressão datiloscópica

Assinatura da Testemunha

Contato com o Pesquisador (a) Responsável: Prof^a. Dr^a Naila Francis Paulo de Oliveira

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para a pesquisadora:

Naila Francis Paulo de Oliveira- Endereço (Setor de Trabalho): Centro de Ciências Exatas e da Natureza/ Departamento de Biologia Molecular- UFPB- Telefone: 3216-7643

Ou para o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS

Bloco Arnaldo Tavares – Sala 812 – 1º andar - Centro de Ciências da Saúde-Campus I - Cidade Universitária - Bairro Castelo Branco - Telefone: 3216 7791

Atenciosamente,

Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO 03



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

Nº amostra: _____

Nome: _____

Sexo: F M

Idade: _____

Cor: M P B

Endereço: _____

Cidade: _____

Tel: _____ CEL: _____

DADOS CLÍNICOS SOBRE SAÚDE GERAL

Doença crônica? S N (não aceitar diabetes/câncer bucal)

Qual? _____

Diabetes na família? S N

Câncer na família? S N Qual? _____

Uso de medicamentos? Qual? _____

Sangramento gengival? S N

Fumante? S N Quantos cigarros por dia? _____ Quantos anos? _____

Fumante passivo? S N

Ex-fumante? S N Quantos cigarros/dia? _____ Quantos anos? _____

Parou há quanto tempo? _____

Faz uso de enxaguatório bucal? S N Qual frequência? _____

Faz uso de bebida alcoólica? S N Qual frequência? _____