

Alterações no Epigenoma e o Hábito de Fumar

Epigenome Changes and the Smoking Habit

NAILA FRANCIS PAULO DE OLIVEIRA¹

RESUMO

Introdução: Fatores ambientais, tais como os agentes do cigarro apresentam capacidade de alterar o genoma das células e levar ao desenvolvimento tumoral. Recentemente, a capacidade do cigarro em alterar o epigenoma também tem sido investigada. Epigenoma se refere a informações do genoma que não estão relacionadas com a sequência de bases do DNA. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sobre o hábito de fumar e sua associação com o padrão alterado de metilação de DNA em amostras tumorais. **Método:** Foi realizada revisão integrativa da literatura através de busca eletrônica na base de dados PubMed. O período temporal considerado no estudo foi de 2000 a 2010. Os artigos foram selecionados considerando-se a acessibilidade e excluindo-se revisões e pesquisas com linhagens celulares e animais. **Resultados:** Os artigos revelaram que o cigarro pode alterar o epigenoma mesmo de órgãos não diretamente expostos como a boca e os pulmões, sugerindo que o cigarro tem um efeito generalizado, provavelmente alterando de alguma forma todo o sistema do indivíduo. Ainda, outros artigos relataram alterações no padrão de metilação do DNA em tecidos saudáveis de fumantes. **Conclusão:** O câncer associado ao hábito de fumar pode ter um mecanismo epigenético envolvido inclusive em órgãos não diretamente expostos. A presença de alterações epigenéticas em tecidos saudáveis pode servir de alerta para o clínico responsável pelo paciente, uma vez que já foi sugerido que alterações epigenéticas podem atuar como marcadores para diversos tipos de câncer, sendo assim uma ferramenta para diagnóstico e direcionamento do tratamento.

DESCRIPTORIOS

Neoplasias Cigarro. DNA. Genes. Genética. Fumo. Metilação.

SUMMARY

Introduction: Environmental factors such as cigarette agents are capable of altering the genome of the cells and lead to tumor development. Recently, the ability of the cigarette to cause alterations in the epigenome has also been investigated. Epigenome refers to information of the genome that is not related to the sequence of DNA bases. **Objective:** The aim of this study was to conduct a literature review about smoking and its association with the altered pattern of DNA methylation in tumor samples. **Method:** The research considered articles published from 2000 to 2010 in Pubmed database. Articles were selected by accessibility, excluding reviews and research on cell lines and animals. **Results:** The selected articles revealed that smoking can alter the epigenome even in organs not directly exposed as the mouth and lung, suggesting that cigarette smoking has a widespread effect, probably changing in some way the whole system of the individual. Some articles have reported changes in the pattern of DNA methylation in healthy tissues of smokers. **Conclusion:** Smoking-associated cancers may have an epigenetic mechanism involved even in organs not directly exposed. The presence of epigenetic changes in healthy tissue can serve as a warning to the clinician responsible for the patient, since it has been suggested to be as strong biomarker for many types of cancers and then it is a tool for diagnosis and treatment course.

DESCRIPTORS

Neoplasm. Cigarette. DNA. Genes. Genetic. Smoking. Methylation.

1 Professora Doutora do Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba- UFPB, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Já está bem estabelecido que fatores ambientais podem induzir mutações gênicas, as quais podem levar ao desenvolvimento tumoral. Dentre os fatores ambientais, podemos citar: radiação solar, medicamentos, agrotóxicos, álcool e a fumaça do cigarro. O hábito de fumar está associado ao desenvolvimento de diversos tumores, pela sua capacidade de alterar o genoma e causar silenciamento ou ativação de determinados genes. Recentemente, a capacidade do cigarro de alterar o epigenoma também tem sido investigada. Para definir, epigenoma se refere a informações do genoma que não estão relacionadas com a sequência de bases do DNA. Essas informações são alguns radicais químicos, tais como: metil, acetil e o fosfato. A modificação química frequentemente observada no DNA é a metilação. Essa, é uma modificação covalente que ocorre em dinucleotídeos CpG, os quais são frequentemente observados nas regiões promotoras dos genes. O radical metil é obtido pela dieta, particularmente pela metionina, seguido do folato, colina e vitamina B12, e é transferido ao dinucleotídeo CpG através de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMT). A presença do radical metil pode alterar a expressão gênica, causando silenciamento do gene, por inibir a ligação de fatores de transcrição a estas regiões. A não ligação de fatores de transcrição aos seus sítios específicos resulta na ausência de transcrição gênica. Ao contrário, a ausência de metilação leva ao aumento da transcrição gênica. Epigenoma deriva do termo epigenética, o qual surgiu na metade do século 20 após estudos correlacionando bases genéticas e embriológicas. O prefixo *epi*, do grego por cima, apresenta uma forma de herança que se sobrepõe à herança genética com base no DNA. Epigenética é definida como o estudo das modificações do DNA e das histonas que são herdáveis e não alteram a sequência de bases do DNA.

A prevalência e especificidade das metilações aberrantes trazem importantes respostas em relação à contribuição dos mecanismos epigenéticos no desenvolvimento de tumores (COSTELLO, PLASS, 2001). De fato, padrões alterados de metilação têm sido identificados em diversos tipos de câncer.

Em 1953 foi proposto o conceito de “*field cancerization*” ou o “*cancer field effect*” quando SLAUGHTER, SOUTHWICK, SMEJKA, (1953) descreveram aspectos histológicos de câncer em células escamosas do epitélio oral antes do desenvolvimento de carcinomas bucais. Recentemente, alguns autores demonstraram um envolvimento de alterações epigenéticas na “*field cancerization*”. Já foi mostrado “*field cancerization*” no estômago (MAEKITA *et al.*,

2006), fígado (KONDO *et al.*, 2000), esôfago (EADS *et al.*, 2001), pulmão (GUO *et al.*, 2004), mama (YAN *et al.*, 2006) entre outros.

O fumo do tabaco é um agente etiológico para alguns tipos de câncer (JEMAL *et al.*, 2010). Alguns estudos experimentais têm demonstrado que o fumo do tabaco, em particular a nicotina, pode induzir diretamente a metilação do DNA (SOMA *et al.*, 2006). Um estudo recente mostrou que as alterações epigenéticas podem ser detectadas em fumantes massivos livres de câncer (BARYSHNIKOVA *et al.*, 2008).

O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão sobre o hábito de fumar e sua associação com o padrão alterado de metilação de DNA em amostras tumorais, com o intuito de conhecer a capacidade do cigarro em alterar o epigenoma nos diferentes órgãos.

MÉTODO

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura. Para tanto, foi realizada busca eletrônica na base de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>), utilizando combinações das seguintes palavras-chave: *methylation, cancer, smoking*. Foram encontrados 165 artigos na língua inglesa, dentre artigos originais e revisões, dos quais foram selecionados 30 artigos publicados entre o período de 2000 a 2010, considerando-se a acessibilidade e excluindo-se revisões e pesquisas com linhagens celulares e animais. A seleção dos artigos que compõem os principais resultados foi baseada na relevância estatística, além da preocupação em apresentar dados recentes e/ou o maior número de genes estudados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais resultados foram elaborados de forma descritiva e expostos em tabela. Durante a busca foi encontrado também artigos que relatavam a presença de alterações no padrão de metilação em amostras de indivíduos fumantes livres de câncer. Assim, a presente tabela é dividida em duas categorias sendo que a primeira exhibe associação entre câncer, hábito de fumar e alterações no padrão de metilação. A segunda categoria mostra associação entre tecidos saudáveis, hábito de fumar e alterações no padrão de metilação. Dessa forma, a tabela 1 mostra detalhes de estudos epigenéticos envolvendo cânceres, tais como: pulmonar, cabeça e pescoço, pâncreas, bexiga, útero e intestino, bem como

amostras saudáveis de pulmão, sangue e escarro. Os artigos descritos revelam alterações epigenéticas em genes supressores tumorais, tais como *p16*, genes relacionados ao ciclo celular, como: *DAPK* e *TERT*, genes envolvidos com a apoptose, como o *Bcl2* e ainda outros genes, envolvidos com as mais diversas vias do metabolismo celular: *RAR α* - 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. Muitos deles já foram associados ao câncer, contudo, esses estudos focaram a mutação gênica. Ultimamente, esses mesmos genes têm sido estudados com enfoque em suas modificações químicas, isto é, com enfoque epigenético, incluindo estudos sobre câncer, doenças inflamatórias e até envelhecimento.

Com base na tabela podemos observar que o cigarro pode alterar o epigenoma mesmo de órgãos não diretamente expostos, 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. Não menos interessantes são os artigos que relatam alterações epigenéticas em tecidos saudáveis de fumantes. Esses dados são de extrema importância, pois como já foi sugerido, poderiam prever possíveis casos de câncer, isto é, a “*field cancerization*”. Uma vez detectadas alterações no padrão de metilação tanto em tumores quanto em tecidos saudáveis, é possível direcionar um tratamento individualizado para o paciente, com base nas informações de seu epigenoma, uma vez que esse pode ser alterado por diversos fatores, inclusive medicação. Já foi sugerido também que o padrão de metilação do epitélio oral poderia ser um importante marcador para prever a situação dos pulmões, já que ambos sofrem ação de substâncias carcinogênicas do cigarro (BHUTANI *et al.*, 2008). Os genes *p16* e *MGMT*, envolvidos no ciclo celular e no reparo do DNA contra agentes carcinogênicos respectivamente, já foram sugeridos como fortes candidatos a marcadores para detecção precoce do câncer de pulmão (BELINSKY *et al.*, 2002).

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 (FOWLES, DYBING, 2003). O mecanismo pelo qual o cigarro pode levar a mudanças no epigenoma é desconhecido. Entretanto, tem sido sugerido que o estresse oxidativo pode levar a perda ou ganho de metilação (VALINLUCK,

SOWERS, 2007) A fumaça do cigarro contém agentes oxidantes que podem causar danos às 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 (CSISZAR *et al.*, 2009). 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. Citosinas 5-halogenadas podem causar inapropriada metilação *de novo* uma vez que a DNMT1 não é capaz de distinguir citosina metilada de citosina halogenada (VALINLUCK, SOWERS, 2007). 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 (VALINLUCK, SOWERS, 2007).

Além disso, um estudo recente (Quadro 1) mostrou que as proteínas DNAs metiltransferases 1, 3a e 3b estavam altamente expressas em células tumorais de pulmão, particularmente em fumantes. Esse mesmo estudo mostrou ainda que alguns genes supressores tumorais apresentaram-se hipermetilados nestas amostras (LIN *et al.*, 2007). Hipermetilação na região promotora de um gene é conhecida por causar silenciamento gênico e tem um importante papel no desenvolvimento normal e de doenças (COSTELLO, PLASS, 2001). A repressão transcricional causada pela metilação de DNA parece ser mediada pela família das proteínas ligantes de radical metil (*methyl binding protein -MBP*) tais como MeCP1 e MeCP2 (WADE, 2001). Enquanto MeCP1 requer múltiplos sítios CpG para se ligar ao DNA e promover condensação cromatínica, a proteína MeCP2 tem habilidade para se ligar a um único sítio CpG. Já se sabe que a interação entre um sítio CpG e os elementos “*enhancers*” são suficientes para modificar a transcrição gênica (WADE, 2001). Como sabemos, o silenciamento de genes supressores tumorais podem promover o desenvolvimento do câncer (Quadro 1).

A epigenética é uma ciência relativamente nova e muito há para se conhecer ainda. O estudo epigenético com foco no envelhecimento bem como o estudo de agentes ambientais e sua capacidade de alterar o epigenoma pode revelar informações importantes sobre o desenvolvimento de diversos tumores, uma vez que já foi mostrado que os fatores ambientais são os principais causadores de tumores como mostrado em estudos com gêmeos dizigóticos e monozigóticos (LICHTENSTEIN *et al.*, 2000).

Quadro 1. Síntese dos artigos revisados sobre câncer X metilação aberrante de DNA X hábito de fumar e síntese dos artigos revisados sobre tecidos saudáveis X metilação de DNA X hábito de fumar.

AMOSTRAS DE CÂNCER					
Autores	Número de Indivíduos	Tipo de Estudo	Amostra	Genes estudados	Genes alterados-metilação aberrante (valor de p)
JIN <i>et al.</i> , 2010	300	Caso-controle	pulmão	<i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>RARβ</i>	hipermetilação (< 0,01)
LIN <i>et al.</i> , 2007	100	Coorte retrospectiva	pulmão	<i>FHIT</i> , <i>p16^{INK4a}</i> , <i>RARβ</i>	hipermetilação (< 0,05)
SHARMA, PANDA, KHULLAR, 2010	73	Caso-controle	Cabeça e pescoço (cavidade oral, faringe e laringe)	<i>CYP1A1</i> , <i>CYP2A13</i> , <i>GSTM1</i>	hipermetilação <i>CYP1A1</i> (= 0,029) <i>CYP2A13</i> (= 0,034)
GAO <i>et al.</i> , 2010	40	Coorte prospectiva	pâncreas	<i>SPARC</i>	hipermetilação (= 0,017)
WOLFF <i>et al.</i> , 2009	342	Coorte retrospectiva	bexiga	<i>BCL2</i> , <i>PTGS2</i> , <i>DAPK</i> , <i>CDH1</i> (<i>ECAD</i>), <i>EDNRB</i> , <i>RASSF1A</i> , <i>RUNX3</i> , <i>TERT</i> , <i>TIMP3</i>	hipermetilação <i>RUNX3</i> (= 0,015)
LEA <i>et al.</i> , 2004	60	Caso-controle	útero	<i>p16</i>	hipermetilação (< 0,001)
LIMSUI <i>et al.</i> , 2010	555	Coorte prospectiva	intestino	<i>CACNA1G</i> , <i>IGF2</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>RUNX3</i> , <i>SOCS1</i>	hipermetilação (< 0,05)
AMOSTRAS LIVRES DE CÂNCER					
CHRISTENSEN <i>et al.</i> , 2009	53/ 112	Coorte prospectiva	Pulmão/sangue	<i>MLH1</i> , <i>RPK3</i>	hipermetilação (< 0,001/)
BARYSHNIKOVA <i>et al.</i> , 2008	820	Coorte prospectiva	escarro	<i>RASSF1A</i> , <i>NORE1A</i>	hipermetilação (< 0,05)
BELINSKY <i>et al.</i> , 2002	32	Caso-controle	Pulmão/escarro	<i>P16</i> , <i>DAP Kinase</i>	hipermetilação <i>p16</i> (< 0,05)

CONCLUSÃO

Como observado, o câncer associado ao hábito de fumar pode ter um mecanismo epigenético envolvido inclusive em órgãos não diretamente expostos. Ainda, a presença de alterações epigenéticas em tecidos saudáveis pode servir de alerta para o clínico responsável pelo paciente, uma vez que já foi sugerido que alterações epigenéticas podem atuar como marcadores para diversos tipos de câncer. Assim, o conhecimento de alterações epigenéticas em amostras de pacientes é uma

importante ferramenta para diagnóstico e direcionamento do tratamento. Um próximo passo será estudos avaliando padrões de metilação em ex-fumantes, com o objetivo de conhecer o impacto no epigenoma uma vez encerrado o hábito de fumar. Ainda, estudos epigenéticos envolvendo fumantes passivos poderiam também revelar dados importantes sobre a capacidade do cigarro em alterar o epigenoma.

REFERÊNCIAS

- 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*, 14(6):1913-1919, 2008.
- 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*, 62(8):2370-2377, 2002.
- 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*, 1(1):39-44, 2008.
- COSTELLO JF, PLASS C. Methylation matters. *J Med Genet*, 38(5):285-303, 2001.
- CHRISTENSEN BC, HOUSEMAN EA, MARSIT CJ, ZHENG S, WRENSCH MR, WIEMELS JL, *et al.* Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet*, 5(8):e1000602, 2009.
- CSISZAR A, PODLUTSKY A, WOLIN MS, LOSONCZY G, PACHER P, UNGVARI Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci*, 14(1):3128-3144, 2009.
- EADS CA, LORD RV, WICKRAMASINGHE K, LONG TI, KURUMBOOR SK, BERNSTEIN L, *et al.* Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 61(8):3410-3418, 2001.
- FOWLES J, DYBING E. Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of cigarette smoke. *Tob Control*, 12(4):424-430, 2003.
- 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*, 29(1):28-36, 2010
- 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*, 10(23):7917-24, 2004.
- JEMALA, CENTER MM, DESANTIS C, WARD EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(8):1893-1907, 2010.
- 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*, 12(10):422-429, 2010.
- KONDO Y, KANAI Y, SAKAMOTO M, MIZOKAMI 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*, 32(5):970-979, 2000.

14. LEAJS, COLEMAN R, KURIENA, 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*, 190(3):674-679, 2004.
15. LICHTENSTEIN P, HOLM NV, VERKASALO PK, ILIADOU A, KAPRIO J, KOSKENVUO M, *et al.* Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*, 343(2):78-85, 2000.
16. 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*, 102(14):1012-22, 2010.
17. 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*, 55(2):205-213, 2007.
18. 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*, 12(3): 989-995, 2006.
19. 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*, 119(5):1023–1027, 2006.
20. SHARMA R, PANDA NK, KHULLAR M. Hypermethylation of carcinogen metabolism genes, *CYP1A1*, *CYP2A13* and *GSTM1* genes in head and neck cancer. *Oral Diseases*, 16(7):668-673, 2010.
21. SLAUGHTER DP, SOUTHWICK HW, SMEJKA LW. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6(5): 963–8, 1953
22. VALINLUCK V, SOWERS LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*, 67(3): 946-950, 2007.
23. WADE AP. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays*, 23(12): 1131-1137, 2001.
24. 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*, 68(15):6208-6214, 2008.
25. YAN PS, VENKATARAMU C, IBRAHIMMA, LIU JC, SHEN RZ, DIAZ NM, *et al.* Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res*, 12(22):6626-6636., 2006.

Correspondência

Naila Francis Paulo de Oliveira
 Departamento de Biologia Molecular
 Centro de Ciências Exatas e da Natureza
 Universidade Federal da Paraíba
 Campus I- Cidade Universitária
 58059-900 João Pessoa - Paraíba - Brasil

E-mail

naila_francis@yahoo.com.br