

Álvaro Luiz Socorro Borges Júnior

**Avaliação imuno-histoquímica das proteínas HDAC1 e HDAC2,
HAT1 e DNMT1 e DNMT3a em epitélio de revestimento não
neoplásico adjacente a carcinomas de células escamosas de lábio**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido ao Curso de Graduação em
Odontologia da Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel
Co-orientadora: Me. Emanuely da Silva

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Borges Júnior, Álvaro Luiz Socorro

Avaliação imuno-histoquímica das proteínas HDAC1 e HDAC2, HAT1 e DNMT1 e DNMT3a em epitélio de revestimento não neoplásico adjacente a carcinomas de células escamosas de lábio / Álvaro Luiz Socorro Borges Júnior; orientador, Filipe Ivan Daniel, co-orientadora, Emanuely da Silva, 2019.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Epigenética. 3. Acetilação e desacetilação de histonas. 4. Metilação do DNA. 5. Carcinoma de células escamosas do lábio. I. Daniel, Filipe Ivan. II. Silva, Emanuely da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

Álvaro Luiz Socorro Borges Júnior

**Avaliação imuno-histoquímica das proteínas HDAC1 e HDAC2,
HAT1 e DNMT1 e DNMT3a em epitélio de revestimento não
neoplásico adjacente a carcinomas de células escamosas de lábio**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Cirurgião-Dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 21 de maio de 2019.

Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr.^a Angélica Reinheimer
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho à ciência e aos meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Natureza, por me transmitir paz e me fazer reconhecer a beleza da vida em cada detalhe, mínimo que seja, desde a dança eterna dos átomos à interação galáctica dos planetas. Esta percepção, na maior parte, é devida ao incomensurável amor proveniente dos meus pais, Álvaro e Anália. Eles são os seres responsáveis pela minha contínua e infundável formação, porém, muito mais valiosos são o esforço e as oportunidades que ambos abriram mão para se dedicarem ao maior presente do mundo, a família.

Este trabalho não é a epítome da minha graduação, uma vez que perpasssei pelas mais diversas áreas da Odontologia e da Universidade Federal de Santa Catarina. Espero que ao menos a pesquisa aqui apresentada seja útil, porque para quem o sentido da vida ainda não é claro, somente o sentimento de prestatividade garante um alento repleto de satisfação, mesmo que temporário.

À Emanuely, por carregar dentro de si tamanha bondade e gentileza. A leveza da sua voz e do seu olhar são dádivas inigualáveis, que somente as pessoas mais raras contêm.

À Rosa, por acreditar no sonho, até quando tudo parecia não ter mais jeito. A sua companhia e apoio me fazem crer na existência de seres afins e perceber que a evolução é incessante.

As minhas irmãs, Mariana e Ana Carolina, por serem a recordação materializada das nossas infâncias bem vividas. Quero que creiam em mim como o amigo com quem sempre poderão contar.

A Blenda, Isadora, Madalena, Thaiana, Letícia, Dionei e Maria Eduarda, por demonstrarem a graça da vida em cada uma das etapas a serem enfrentadas. As lições que compartilhamos e as suas histórias são exemplos nos quais me inspiro. Obrigado por me aceitarem como eu verdadeiramente sou.

À Sara, por me fazer dobrar a língua com diversão e parceria nestes anos de atividades clínicas, aulas e seminários acadêmicos. É delicioso poder se descobrir com alguém que compartilha da inocência e da pureza de quem acredita sempre no melhor que está por vir.

A Cris, Iara, Nilcéia, Daiane, Rosângela, Luis, Batista, Cláudia, Tiago, Moacir, Jessica, Silvane, Francielle, Melissa, Jozi, Viviane e Kamila, responsáveis por fazer valer todos os momentos de espera, seja por meio de um abraço apertado, um sorriso singelo, uma ajuda “mão na roda”, uma conversa despreziosa, a preocupação com carinho, a gargalhada das tolices, o concordar das reclamações, enfim, toda a grandiosidade dos gestos mais simples e indispensáveis.

À música, por ser a melhor forma de expressão e compreensão da verdade que sinto em mim.

Ao orientador deste trabalho, Professor Dr. Filipe Ivan Daniel, que me permitiu ter o primeiro contato com a realização de uma pesquisa científica, por sua seriedade, disciplina e por ter prontamente aceitado esta proposta.

A Jesus, por ser o principal exemplo a ser seguido.

Qual é o seu ministério? Como você irá servir o mundo? O que as pessoas precisam que o seu talento pode prover? Isso é tudo o que você precisa saber. O efeito que você tem nos outros é a moeda mais valiosa que existe. Porque tudo o que você ganha na vida deteriora-se e desmorona-se. Mas tudo aquilo que está em seu coração permanece.
(Jim Carrey, 2014)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo estudar e comparar a expressão imuno-histoquímica das proteínas DNA metiltransferases (DNMT1 e DNMT3a), histona acetiltransferase (HAT1) e histona desacetilases (HDAC1 e HDAC2) em epitélio de revestimento não-neoplásico (ERNN) adjacente às áreas de carcinoma de células escamosas de lábio (CEL) de maneira a verificar a expressão dessas enzimas e a relação com o desenvolvimento do tumor maligno de lábio. Assim, 10 casos foram submetidos a reações de imuno-histoquímica pelo método da streptavidina-biotina-peroxidase, utilizando os anticorpos anti-DNMT1, anti-DNMT3a, anti-HDAC1, anti-HDAC2 e anti-HAT1 e posterior captura de seis campos consecutivos da região do ERNN, após determinação dos limites do CEL, sob aumento de 400x, em microscópio acoplado a um sistema de captura digital. A avaliação da expressão nuclear se deu pela contagem manual dos núcleos corados em marrom (positivos) e azul (negativos), por meio do software ImageJ, posterior estabelecimento da proporção das células positivas para cada amostra e comparação por meio dos testes de Comparação Múltipla Kruskal-Wallis e Coeficiente de Correlação de Spearman. Os resultados denotam existir diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de imunopositividade entre a expressão da enzima DNMT3a com as proteínas HAT1, HDAC1, HDAC2 e DNMT1. Também foi possível encontrar forte correlação entre HDAC2 e DNMT1 ($r = 0,72$; $P = 0,0369$). Não obstante a inviabilidade de obtenção de maior número amostral, sugere-se que o ERNN é um tecido que, apesar de não conter características morfológicas sugestivas de malignização, já expressa padrões de imunopositividade de proteínas envolvidas em mecanismos de alteração epigenética semelhantes ao de neoplasias de lábio, podendo assim estar condicionado ao processo de fotocarcinogênese.

Palavras-chave: DNA metiltransferases, Histonas desacetilases, Histonas acetiltransferases, Carcinoma de células escamosas de lábio, Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the proteins DNA methyltransferase (DNMT1 and DNMT3a), histone acetyltransferase (HAT1) and histone deacetylase (HDAC1 and HDAC2) immunohistochemical expression in non-neoplastic epithelium (NNE) adjacent to areas of lip squamous cell carcinoma in order to evaluate the expression of those enzymes and relate the results with carcinogenesis. Ten (10) cases of NNE were selected for immunohistochemical investigation. The enzymes were detected through the streptavidin-biotin-peroxidase, and incubated with anti-DNMT1 antibody, anti-DNMT3a, anti-HDAC1, anti-HDAC2 and anti-HAT1. For each sample, a minimum of 400 cells were manually counted with the software *ImageJ* in six consecutive fields, at a magnification of 400x, captured with a light microscope bound to a digital image system, obtaining the positive (brown) and negative (blue) proportion of the enzymes nuclear expression. Statistical comparisons were analyzed by Kruskal-Wallis test and Spearman's correlation test. The differences between the immunopositivity found of enzyme DNMT3 with HAT1, HDAC1, HDAC2 and DNMT1 were statistically significant ($p < 0,05$). Also, the strong correlation observed among HDAC2 and DNMT1 ($r = 0,72$; $P = 0,0369$) was statistically significant. Despite the limited sample collected, it is suggested that the NNE represents a tissue that already expresses immunopositivity patterns of proteins related to processes of epigenetic alterations similar to the ones found in lip neoplasia.

Keywords: DNA methyltransferase, Histone deacetylase, Histone acetyltransferase, Lip squamous cell carcinoma, Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Corte histológico observado a olho nu, representando a marcação dos espécimes para captura das fotomicrografias.....33
- Figura 2** - Captura de tela com fotomicrografia observada em aumento de 400x, representando a contagem da marcação nuclear das células de ERNN pelo anticorpo anti-HDAC1.
.....34
- Figura 3** - Gráfico da incidência de imunomarcaçãon nuclear positiva para as enzimas HDAC1, HDAC2, HAT1, DNMT1 e DNMT3a em ERNN(* = $p < 0,05$)......40.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Incidência de imunomarcção nuclear para HDAC1, HDAC2, HAT1, DNMT1 e DNMT3a em ERNN (média em %, \pm desvio padrão).	37
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da amostra (n=10).....	37
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucleico
HAT – Histona Acetiltransferase
HDAC – Histona Desacetilase
DNMT – DNA Metiltransferase
ERNN – Epitélio de Revestimento Não-Neoplásico
HDACi – Inibidor de HDAC
DNMTi – Inibidor de DNMT
CEL – Carcinoma de Células Escamosas de Lábio
UV – Radiação Ultravioleta
INCA – Instituto Nacional do Câncer
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
LPB – Laboratório de Patologia Bucal
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
HE – Hematoxilina e Eosina
PBS – Tampão Fosfato
CCI – Coeficiente de Correlação Intraclasses
MeCP2 – Proteína metil-CpG-*binding domain*

LISTA DE SÍMBOLOS

% – Por cento

μm – Micrometro

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

M – Molar

pH – Potencial hidrogeniônico

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

® – Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	OBJETIVOS.....	30
1.1.1	Objetivo geral	30
1.1.2	Objetivos específicos	30
2	METODOLOGIA	31
2.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	31
2.2	ASPECTOS LEGAIS E ÉTICOS	31
2.3	LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	31
2.4	AMOSTRA	31
2.5	PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	31
2.6	ANÁLISE DOS DADOS.....	33
2.7	CALIBRAÇÃO.....	34
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3	RESULTADOS	37
4	DISCUSSÃO	41
5	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO A – Ata de Apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso	51
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	52
	ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	54
	ANEXO D – Parecer Consubstanciado de Aprovação de Pesquisa em Comitê de Ética	56
	ANEXO E – Parecer Consubstanciado de Aprovação do CEP	57

1 INTRODUÇÃO

A epigenética é um campo da ciência que vem sendo desenvolvido com afinco e por considerável número de pesquisadores, visto a promissoridade de novos tratamentos, curativos ou preventivos, baseados na premissa desta área: o estudo da regulação da expressão gênica a partir de alterações no DNA não relacionadas a mudanças na sequência de nucleotídeos, portanto reversíveis e herdáveis durante a divisão celular (Portela e Esteller, 2010; Weichert, 2009; Feinberg e Tycko, 2004; Yoo e Jones, 2006; Kanwal; Gupta, 2011).

O código genético humano é compilado no núcleo de células eucariontes na forma de cromatina, cuja unidade básica é o nucleossomo. Este, por sua vez, é formado por dupla cadeia de DNA enroladas por quatro pares de proteínas, as histonas (Luger *et al.*, 1997). Proteínas com ação enzimática associadas às histonas, como as histona acetiltransferases (HATs) e as histona desacetilases (HDAC), podem influenciar a transcrição do DNA, uma vez que o equilíbrio entre a acetilação e desacetilação das mesmas também está relacionado com a transcrição gênica e repressão deste processo, respectivamente (Yoo e Jones, 2006; Marmorstein e Trievel, 2009), assim como as proteínas DNA metiltransferases (DNMTs) que promovem a metilação gênica, sem envolver a alteração da sequência primária das bases de nucleotídeos do DNA (Baylin, 2002; Jones e Baylin, 2002).

Enquanto as HATs promovem a acetilação das proteínas histonas catalisando a transferência de um grupamento acetil para os resíduos de lisina das histonas, o que neutraliza as suas cargas e diminui sua atração com o DNA permitindo dessa forma o processo de transcrição, as HDACs removem o grupamento acetil dos resíduos de lisina agindo de forma contrária, portanto colaborando para o silenciamento do gene (Ropero e Esteller, 2007; Min *et al.*, 2012). Esta função está associada a diferentes processos que incluem a progressão do ciclo celular, as conformações cromossômicas, a recombinação e reparo do DNA e a apoptose (Chrun; Modolo; Daniel, 2017).

Por sua vez, a metilação resultante da ação das DNMTs consiste na adição reversível de um grupamento metil (CH_3) no carbono 5 de um anel citosina nas ilhas CpG do DNA, gerando uma interferência na conformação da cromatina e, assim, a repressão transcricional de certos genes, como os responsáveis pela regulação da expressão gênica, controle de desenvolvimento e diferenciação celular, modificação da cromatina, preservação da integridade do cromossomo, controle de imprinting

genômico, silenciamento de retrovírus endógenos e inativação do cromossomo X (Egger *et al.*, 2004; Hermann; Gowher; Jeltsch, 2004).

Há hipótese na literatura sobre um complexo correpressor existente entre HDACs e frações de DNA metilado que reforça a participação dessa enzima na repressão transcricional (Ruijter *et al.*, 2003; Daniel *et al.*, 2010). É provável que o complexo Sin3/HDAC seja recrutado para realizar o silenciamento do gene, uma vez que essa associação de proteínas interage com MeCP2 ligado a sítios CpG metilados. Assim, reitera-se a relevância da influência das HDACs nos processos que regulam a diferenciação e proliferação celular (Grigat *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm sido realizados quanto à expressão dessas proteínas (HAT, HDAC e DNMTs) em diferentes neoplasias malignas em humanos, visando principalmente a elucidação das vias de atuação e dos produtos resultantes de tais alterações na expressão dos genes com foco no papel das mesmas no processo de malignização de lesões potencialmente cancerizáveis (Robertson *et al.*, 1999; Krusche *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2009; Hayashi *et al.*, 2010; Gruhn *et al.*, 2013; Giaginis *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015).

Simultaneamente, ensaios clínicos com variados inibidores de HDAC (HDACi) para investigar o uso como drogas antitumorais estão em andamento (Marks e Xu, 2009). Há evidências de que a inibição combinada de HDAC1 e HDAC2 em diferentes tipos celulares levou à diminuição na proliferação e aumento da apoptose de células neoplásicas, fato este que reforça a relevância do estudo da aplicação dos inibidores destas proteínas como possíveis alternativas para o tratamento antitumoral (Jurkin *et al.*, 2011). A combinação da terapia com inibidores de DNMT (DNMTi) é apresentada como uma estratégia promissora, uma vez que mediante uma desmetilação decorrente do uso de baixas doses de DNMTi, o uso de HDACi atua sinergicamente na re-expressão do gene silenciado (Cameron *et al.*, 1999).

O Brasil apresenta uma das mais expressivas taxas de incidência de carcinoma epidermoide bucal do mundo, sendo este correspondente a 90 a 95% dos casos de neoplasias malignas da boca (Dedivitis *et al.*, 2004; Daher, Pereira e Oliveira, 2008). O carcinoma de células escamosas de lábio (CEL) corresponde a 30% dos tumores malignos de boca em regiões tropicais (Kornevs *et al.*, 2005).

Sabe-se que as consequências epiteliais da exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), alterações fenotípicas e genotípicas, algumas potencialmente malignas (como a displasia epitelial), estão associadas a um aumento do risco para desenvolvimento do CEL, representando um

relevante fator de risco para o câncer, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) para os anos 2018/2019 (Dos Santos *et al.*, 2003; BRASIL, 2018). Dado preocupante à população brasileira que se encontra em região tropical com elevada incidência de radiação UV, especialmente a parcela cuja ocupação profissional, seja no meio rural ou urbano, envolva exposição solar constante (Sena *et al.*, 2010; Prado e Passarelli, 2009).

Esse tipo de radiação possui propriedades capazes de interferir no bom funcionamento dos processos biológicos e tem sido comprovado que pode levar também a modificações epigenéticas que corroboram com a iniciação e/ou progressão da fotocarcinogênese (Gronniger *et al.*, 2010).

Apesar de o controle transcricional, resultado de modificações bioquímicas que não alteram a sequência primária de nucleotídeos do DNA, já estar presente nas células e ser um processo essencial para o correto desenvolvimento tecidual (Daniel *et al.*, 2010), pouco relato é encontrado na literatura sobre a expressão dessas proteínas relacionadas a alterações epigenéticas em epitélio de revestimento não-neoplásico (ERNN) adjacente a regiões neoplásicas (Chrun *et al.*, 2017). Este tecido desperta curiosidade quanto a sua natureza uma vez que pode apresentar alterações displásicas consideradas pré-neoplásicas e, possivelmente, modificações epigenéticas anormais encontradas em tecidos neoplásicos (Kanwal; Gupta, 2011).

Desta forma, este estudo objetivou investigar a expressão das DNMT1, DNMT3a, HDAC1, HDAC2 e HAT1 em epitélio de revestimento não-neoplásico (ERNN) adjacente às áreas de invasão tumoral de CEL, de maneira a compreender se essas alterações podem estar relacionadas com o processo de fotocarcinogênese.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar e comparar a expressão imuno-histoquímica das proteínas DNA metiltransferases (DNMT1 e DNMT3a), histona acetiltransferase (HAT1) e histona desacetilases (HDAC1 e HDAC2) em epitélio de revestimento não-neoplásico adjacente às áreas de carcinoma de células escamosas de lábio.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão nuclear das enzimas DNA metiltransferases (DNMT1 e DNMT3a) em ERNN adjacente às áreas de CEL;
- Avaliar a expressão nuclear das enzimas histona acetiltransferase (HAT1) e histona desacetilases (HDAC1 e HDAC2) em ERNN adjacente às áreas de CEL;
- Comparar e correlacionar a expressão nuclear das enzimas DNA metiltransferases (DNMT1 e DNMT3a), histona acetiltransferase (HAT1) e histona desacetilases (HDAC1 e HDAC2) em ERNN adjacente às áreas de CEL.

2 METODOLOGIA

2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente estudo é de caráter transversal, descritivo e exploratório.

2.2 ASPECTOS LEGAIS E ÉTICOS

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (pareceres números 1.020.518 e 2.274).

2.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

As instalações do Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC serviram para a realização dos procedimentos histológicos, da técnica imuno-histoquímica e de análise das amostras.

2.4 AMOSTRA

A amostra foi composta por 10 casos que apresentavam epitélio de revestimento adjacente às áreas de carcinoma de células escamosas de lábio (CEL) selecionados, por conveniência, do Arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) e utilizadas com o consentimento do paciente ou responsável mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXOS A e B), não havendo sido selecionadas mais de uma amostra do mesmo paciente e nenhum deles havia recebido tratamento quimioterápico ou radioterápico até a coleta do material.

2.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Os cortes histológicos obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados simultaneamente por dois examinadores previamente calibrados que determinaram e confirmaram o diagnóstico de CEL e a presença de epitélio de revestimento não-neoplásico adjacente (Pindborg *et al.*, 1997; Barnes *et al.*, 2005). Os casos em que houve discordância quanto ao diagnóstico e inviabilidade da execução de reação

imuno-histoquímica, pela necessidade de preservação do material em arquivo, foram excluídos da amostra.

Os procedimentos da técnica imuno-histoquímica foram realizados pelo método streptavidina-biotina-peroxidase para a detecção das proteínas. Os espécimes, previamente fixados em formol a 10% à temperatura ambiente e emblocados em parafina foram seccionados em micrótomo a 3µm de espessura, para cada antígeno, e estendidos, em lâminas silanizadas, levadas a estufa por 12 horas à 60°C.

Para a desparafinização dos cortes, as lâminas foram mantidas em estufa por 90 minutos, a 75°C, seguido de 30 minutos em xilol a 60°C e 20 minutos em xilol a temperatura ambiente. Na sequência, foi realizada a reidratação em uma sequência decrescente de etanol de cinco passagens por cinco minutos cada, começando por 3 banhos em etanol absoluto, seguida pelo etanol a 95% e etanol a 85%. Logo após foram realizados dois banhos de 5 minutos em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi obtido por dois banhos de 20 minutos em H₂O₂ a 6% em metanol na proporção de 1:3, seguido de um banho de 5 minutos em Tampão Fosfato (PBS) e uma lavagem de 5 minutos em água destilada.

Para a recuperação antigênica utilizou-se tampão citrato 0,01M, pH 6,0, pré-aquecido em banho-maria, por 40 minutos em temperatura constante de 96°C. Aguardou-se esfriar por 30 minutos e procederam-se dois banhos de 5 minutos em PBS.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado em solução de leite desnatado a 5% em PBS durante 60 minutos, à temperatura ambiente, seguidos por mais dois banhos de 5 minutos em PBS.

Cada espécime foi delimitado com caneta hidrofóbica (Z-path, Bancoque, Tailândia) e, então, incubado com os anticorpos anti-DNMT1 (IMG261A, diluição 1:1500, Imgenex®, San Diego, EUA), anti-DNMT3a (IMG-268A, diluição 1:700, Imgenex®, San Diego, EUA), anti-HDAC1 (SC7872, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:200), anti-HDAC2 (SC7899, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:200) e anti-HAT1 (SC8752, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA, diluição 1:500) a 4°C *overnight*.

Após dois banhos de 5 min em PBS, procedeu-se a utilização do Kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com anticorpo secundário biotilado e complexo estreptavidina-biotina-peroxidase, seguindo novamente de 2 banhos de 5 minutos em PBS.

Para revelação da reação foi aplicada a solução cromógena Diaminobenzidina 3,3' (DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), em cada corte por exatos dois minutos, seguido de banho em água

destilada. Todos os espécimes receberam contra coloração com Hematoxilina de Harris.

Foi realizada a remoção de pigmento formólico através da rápida imersão das lâminas em solução aquosa de hidróxido de amônia a 1% e lavagem durante dois minutos em água corrente. Procedeu-se então a desidratação em grade crescente de etanol, 85%, 95% e etanol absoluto, diafanização com xilol por 40 minutos e montagem das lamínulas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

2.6 ANÁLISE DOS DADOS

Foi avaliada a imunorreatividade nuclear para HDAC1, HDAC2, HAT1, DNMT1 e DNMT3a, nas células epiteliais dos ERNNs adjacentes às áreas tumorais dos CEL. Levando em consideração a dificuldade de obtenção de uma área extensa de ERNN, seis campos consecutivos para o ERNN (Figura 1) selecionados após a determinação da área de CEL foram capturados de cada um dos 10 casos, em aumento de 400X, por meio de microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a um sistema de obtenção de imagens digitais.

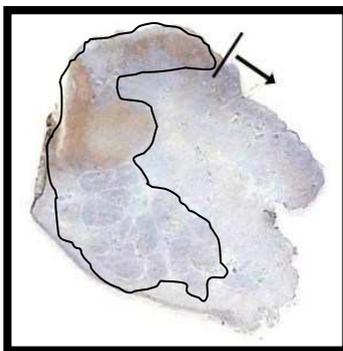


Figura 1. Corte histológico observado a olho nu, representando a marcação dos espécimes para captura das fotomicrografias. Delimitação da área de carcinoma de células escamosas de lábio e de epitélio de revestimento não-neoplásico adjacente (indicado a partir do final da área de invasão na direção da seta).

Para cada caso, no mínimo 400 células foram contadas, sendo a imunopositividade expressa em porcentagem de núcleos positivos em relação ao número total de células contadas.

2.7 CALIBRAÇÃO

Um examinador realizou a contagem de núcleos positivos e negativos em 15 casos, em 2 momentos, com intervalo de 1 semana, obtendo-se o Coeficiente de Correlação Intraclases (CCI) de 0,86.

Assim, realizou-se a contagem, em cada amostra de ERNN, dos núcleos positivos e negativos para os anticorpos anti-DNMT1, anti-DNMT3a, anti-HAT1, anti-HDAC1 e anti-HDAC2, utilizando o *Software ImageJ* versão 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, EUA).



Figura 2. Captura de tela com fotomicrografia observada em aumento de 400x, representando a contagem da marcação nuclear das células de ERNN pelo anticorpo anti-HDAC1 utilizando o *Software ImageJ* para obtenção da porcentagem de imunopositividade (pontos verdes nos núcleos corados em marrom e azuis nos de coloração negativa).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação da expressão nuclear deu-se pela média obtida após a contagem manual dos núcleos corados em marrom (positivos) e azul (negativos), utilizando o software *ImageJ* e posterior estabelecimento da proporção das células positivas para cada amostra, em porcentagem.

A comparação da expressão nuclear das proteínas foi realizada através de testes não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis e Coeficiente de Correlação de Spearman), cujos dados foram processados por meio da utilização do software 2.6 Action (Estatcamp, São Carlos, São Paulo, Brasil). Para todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

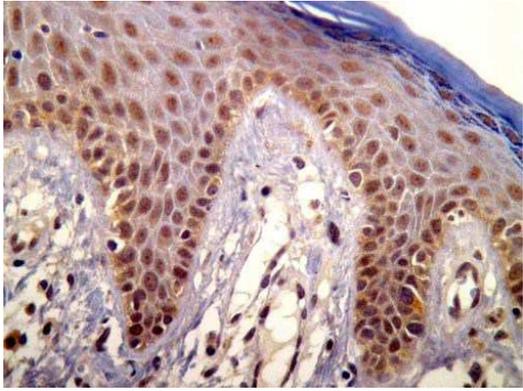
Realizou-se a análise de dez casos, cujas características epidemiológicas estão distribuídas na Tabela 1, pertencendo a maior parte (80,0%) da amostra ao sexo masculino, com uma média de idade de 53,4 anos completos (Intervalo de Confiança=95,0%).

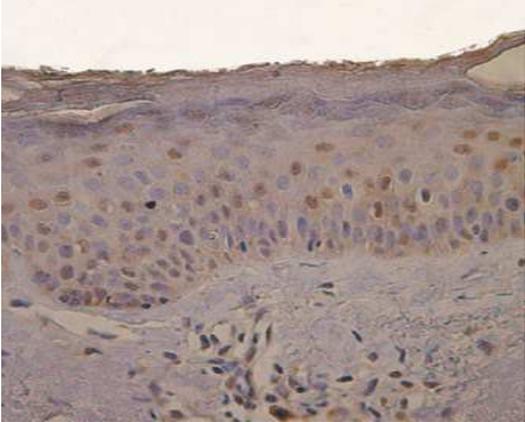
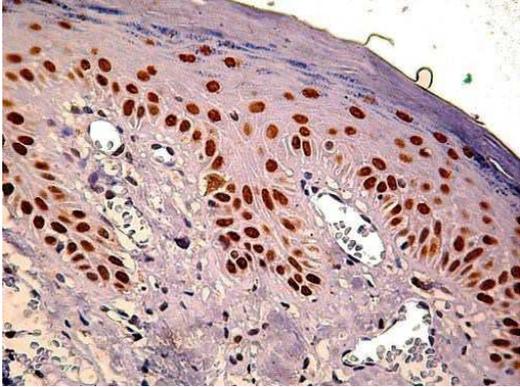
Tabela 1. Caracterização da amostra (n=10)

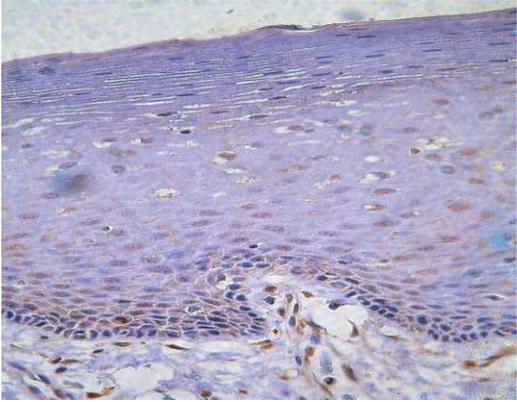
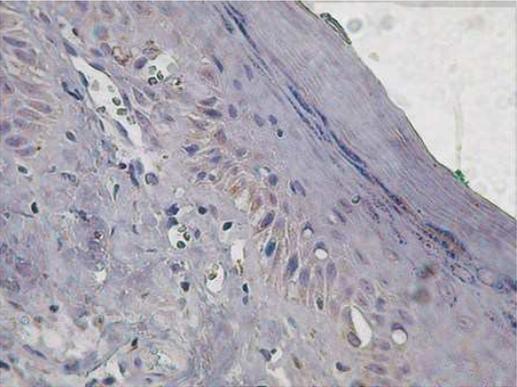
Característica		Grupo amostral
Sexo	Masculino	80,0%
	Feminino	20,0%
Idade	Média (\pm desvio padrão)	53,4 (\pm 13,7)
	Amplitude	33-69

Os padrões de imunopositividade obtidos variaram entre os grupos de enzimas, podendo ser observados nas ilustrações do Quadro 1. A proteína HDAC2 apresentou a maior amplitude de expressão nuclear positiva no ERNN (0,00-98,99), seguida pelas HDAC1 (4,85-99,29), DNMT1 (8,54-99,58), HAT1 (51,98-100,00) e DNMT3a (0,00-12,56). O maior índice de expressão nuclear positiva encontrado foi o da HAT1 (89,40).

Quadro 1 - Imunomarcação nuclear para HDAC1, HDAC2, HAT1, DNMT1 e DNMT3a em ERNN.

Enzima	Ilustração
HDAC1	

<p>HDAC2</p>	 A histological micrograph showing tissue stained for HDAC2. The tissue exhibits a dense population of cells with brown cytoplasmic and nuclear staining, indicating HDAC2 expression. The staining is most prominent in the upper layers of the tissue, with some brown-stained cells scattered throughout the lower layers. The overall appearance is that of a stratified epithelial layer with underlying connective tissue.
<p>HAT1</p>	 A histological micrograph showing tissue stained for HAT1. The tissue displays a high density of brown-stained cells, particularly in the upper layers, suggesting strong HAT1 expression. The staining is more intense and widespread compared to the HDAC2 image. There are also several white, irregular spaces or artifacts visible within the tissue, possibly representing glandular structures or processing artifacts. The overall structure is similar to the HDAC2 image, showing a stratified epithelial layer.

DNMT1	
DNMT3a	

ERNN: Epitélio de Revestimento Não-Neoplásico; HDAC: Histona Desacetilase; HAT: Histona Acetiltransferase; DNMT: DNA Metiltransferase; Aumento de 400x.

Identificou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a expressão da enzima DNMT3a com todas as demais, HAT1, HDAC1, HDAC2, DNMT1, por meio da comparação múltipla de grupos, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, como observado na Figura 3.

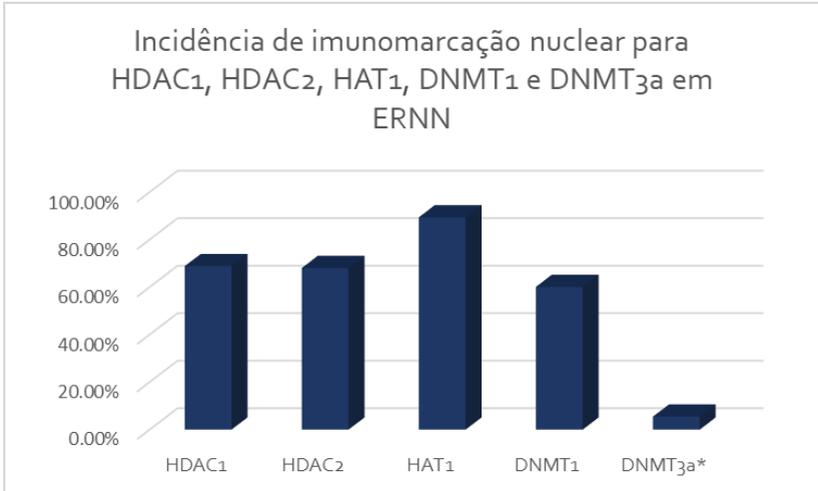


Figura 3. Gráfico contendo a incidência de imunomarcção nuclear positiva para as enzimas HDAC₁, HDAC₂, HAT₁, DNMT₁ e DNMT_{3a} em ERNN(* = $p < 0,05$).

Ao se testar a correlação entre as expressões enzimáticas no ERNN adjacente ao CEL, por meio do Coeficiente de Correlação de Spearman, foi possível encontrar forte correlação (Barbetta, 2012) entre HDAC₂ e DNMT₁ ($r=0,72$; $P=0,0369$).

4 DISCUSSÃO

O processo de carcinogênese é resultado de alterações por mecanismos genéticos e epigenéticos, estes últimos incluindo modificações no DNA (metilação de sítios CpG) e nas histonas. Sabe-se que a exposição crônica à radiação UV aumenta as chances de ocorrerem alterações celulares controladas por proteínas que não alteram a sequência primária de nucleotídeos do DNA (Kyrgidis; Tzellos; Triaridis, 2010).

As funções celulares das enzimas acetiladoras e desacetiladoras de histonas e das metiladoras do DNA nos diferentes tecidos em que são encontradas, assim como o padrão de expressão das mesmas, ainda permeiam diversas incógnitas no meio científico. Até então, os papéis que a elas têm sido atribuídos convergem na influência a diversos processos biológicos como a reparação e recombinação do DNA, a progressão do ciclo celular, a apoptose, a dinâmica dos cromossomos e principalmente no controle da expressão gênica (Marmostein e Trievel, 2009; Roth, Denu e Allis, 2001).

Pesquisadores vêm buscando identificar os mecanismos de ação destas enzimas, em especial das HDAC1, HDAC2, HAT1, DNMT1 e DNMT3a, nos processos de tumorigênese e clonogenicidade neoplásica (Huang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2006; Hrzenjak *et al.*, 2006; Tafrova e Tafrov, 2014). Entretanto, publicações que evidenciam a expressão das proteínas em questão nos sítios de ERNN para que se possa compreender o comportamento desse tecido adjacente a áreas malignas são poucas, o que motivou a confecção do presente estudo (Robertson *et al.*, 1999; Chrun *et al.*, 2017; Kanwal e Gupta, 2011).

Observou-se diferença estatisticamente significativa de expressão nuclear entre DNMT3a e as enzimas HAT1, HDAC1, HDAC2 e DNMT1 no ERNN. Revela-se na literatura que a baixa expressão de DNMT3a também foi encontrada quando investigada em casos de mucocela e carcinoma epidermoide, contrastando com os resultados das amostras de quelite actínica, esta última representando uma lesão pré-cancerizável com um pico de imunopositividade de DNMT3a. O padrão de expressão das demais enzimas (HAT1, HDAC1, HDAC2 e DNMT1) apresentou-se elevado nesta pesquisa, semelhante ao que foi relatado para os tecidos normais, de quelite actínica e CEL (Chrun *et al.*, 2017). Estas informações podem indicar a importância da participação da DNMT3a nas etapas iniciais da carcinogênese, ao atribuir a função de silenciamento de genes supressores tumorais mediante hipermetilação do respectivo sítio, além de reforçar a hipótese de que o ERNN pode não se portar como um tecido

em processo de malignização, uma vez que foi atestada a baixa expressão nesse epitélio, segundo os resultados do presente estudo.

A correlação forte, estatisticamente significativa, entre DNMT1 e HDAC2 avaliada no ERNN instiga a hipótese do complexo correpessor de silenciamento de genes. Há relatos de o processo de metilação das ilhas CpG do DNA ter o efeito de repressão da transcrição reforçado pela proteína correpessora Sin3 associada a uma HDAC, cujo complexo enzimático interage com a proteína metil-CpG-*binding domain* (MeCP2) (Bird; Wolffe, 1999). A proteína MeCP2 reconhece fitas de DNA metilado, estando associada à repressão transcricional, e tem afinidade por enzimas modificadoras de histonas, que causam condensação da cromatina e silenciamento de gene. Além disso, contém um sítio de repressão de transcrição, que pode ser acoplado a proteína Sin3A. Esta interage com as histonas desacetilases, membros de outro sistema de repressão transcricional, reforçando, assim, a repressão gênica final a partir de um sinergismo de interação entre essas proteínas (Klose; Bird, 2006).

Todavia, o número amostral baixo (n=10), justificado pela maioria dos casos disponíveis no LPB-UFSC serem provenientes de biópsias incisionais, o que restringe e dificulta a obtenção de ERNN adjacente à área do tumor, pode ter influenciado os resultados obtidos e comprometido a análise estatística. Esta representa uma limitação deste estudo que deve ser levada em conta na extrapolação das informações encontradas.

Reforça-se a necessidade da realização de mais estudos concernentes ao tema, de maneira que se possa compreender o papel destas enzimas a partir de pesquisas oncológicas, podendo as mesmas servirem como alvos terapêuticos e até marcadores patológicos para prevenção, diagnóstico e prognóstico do câncer.

5 CONCLUSÃO

O epitélio de revestimento não-neoplásico adjacente ao carcinoma de células escamosas do lábio apresentou variações de expressão nuclear das enzimas relacionadas a alterações epigenéticas, havendo diferença estatisticamente significativa entre DNMT3a e as seguintes enzimas: HDAC1, HDAC2, HAT1 e DNMT1, além de forte correlação entre a expressão de HDAC2 e DNMT1.

Os resultados indicam que o ERNN é um tecido que contém características morfológicas sugestivas de malignização e já expressa padrões de imunopositividade de proteínas envolvidas em mecanismos de alteração epigenética semelhantes ao de neoplasias malignas de lábio, podendo assim estar condicionado ao processo de fotocarcinogênese.

REFERÊNCIAS

BARBETTA, P. A. **Estatística aplicada às ciências sociais**. 9 ed, 2012; 315p.

BARNES, L. et al. **Pathology & Genetics: Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press; 2005.

BAYLIN, S. B. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. **Seminars In Cancer Biology**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.331-337, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1044-579x\(02\)00053-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1044-579x(02)00053-6).

BIRD, Adrian P; WOLFFE, Alan P. Methylation-Induced Repression—Belts, Braces, and Chromatin. **Cell**, [s.l.], v. 99, n. 5, p.451-454, nov. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81532-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81532-9).

BRASIL, M. D. S. Estimativa: Incidência de Câncer no Brasil 2018/2019. **INCA, Ministério da Saúde**, 2018. Disponível em <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>. Acesso em: 01/03/2019.

CAMERON, Elizabeth E. et al. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.103-107, jan. 1999. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/5047>.

CHANG, H. H. et al. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. **Oral Oncol**, 2009.

CHRUN, E. S.; MODOLO, F.; DANIEL, F. I. **Expressão Imuno-Histoquímica das Proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em Queilites Actínicas e Carcinomas Epidermóides de Lábio**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

CHRUN, E. S. et al. Immunoexpression of HDAC1, HDAC2, and HAT1 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.505-510, 9 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12641>.

CHRUN, E. S.; MODOLO, F.; DANIEL, F. I. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. **Pathology - Research And Practice**, [s.l.], v. 213, n. 11, p.1329-1339, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prp.2017.06.013>.

DAHER, G. C. D. A.; PEREIRA, G. A.; OLIVEIRA, A. C. D. Características epidemiológicas de casos de câncer de boca registrados em hospital de Uberaba no período 1999-2003: um alerta para a necessidade de diagnóstico precoce. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 4, p. 584-596, 2008.

DANIEL, Filipe Ivan et al. The role of epigenetic transcription repression and DNA methyltransferases in cancer. **Cancer**, [s.l.], v. 117, n. 4, p.677-687, 13 out. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.25482>.

DEDIVITIS, R. A. et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 35-40, 2004.

DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 30, n. 4, p. 237-241, 2003.

EGGER, Gerda et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, [s.l.], v. 429, n. 6990, p.457-463, maio 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02625>.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:143-153.

GIAGINIS, C. et al. Clinical significance of histone deacetylase (HDAC)-1, HDAC-2, HDAC-4, and HDAC-6 expression in human malignant and benign thyroid lesions. **Tumour Biol**, v. 35, n. 1, p. 61-71, jan. 2014.

GRIGAT, M. et al. Multiple histone deacetylases are recruited by corepressor Sin3 and contribute to gene repression mediated by Opi1 regulator of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces*

cerevisiae. **Molecular Genetics And Genomics**, [s.l.], v. 287, n. 6, p.461-472, 28 abr. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-012-0692-x>.

GRONNIGER, E. et al. Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. **PLoS Genet**, v. 6, n. 5, p. e1000971, mai. 2010.

GRUHN, B. et al. The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**, v. 37, n. 10, p. 1200-7, out. 2013.

HAYASHI, A. et al. Type-specific roles of histone deacetylase (HDAC) overexpression in ovarian carcinoma: HDAC1 enhances cell proliferation and HDAC3 stimulates cell migration with downregulation of E-cadherin. **Int J Cancer**, v. 127, n. 6, p. 1332-46, set. 2010.

HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A.. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 61, n. 19-20, p.2571-2587, out. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-004-4201-1>.

HRZENJAK, A.; MOINFAR, F.; KREMSER, M. L. et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. **Mol Cancer Ther**, p. 2203-2210, 2006.

HUANG, B. H. ; LABAN, M.; LEUNG, C. H. et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21cip1/waf1 expression, independent of histone deacetylase 1. **Cell Death Differ**, p. 395-404, 2005.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature Reviews Genetics**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.415-428, jun. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg816>.

JURKIN, J. et al. Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis. **Cell Cycle**, v. 10, n. 3, p. 406-12, fev. 2011.

KANWAL, R; GUPTA, S. Epigenetic modifications in cancer. **Clinical Genetics**, [s.l.], v. 81, n. 4, p.303-311, 8 dez. 2011. Wiley.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01809.x>.

KLOSE, Robert J.; BIRD, Adrian P.. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.89-97, fev. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2005.12.008>.

KORNEVS, E. et al. 5 year experience with lower lip cancer. **Stomatologija**, v.7, n.3, p. 95-8, 2005.

KRUSCHE, C. A. et al. Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 90, n. 1, p. 15-23, mar. 2005.

KYRGIDIS, A.; TZELLOS, T.; TRIARIDIS, S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. **Journal Of Carcinogenesis**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.3-10, 2010. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1477-3163.62141>.

LEE, S. H. et al. Expression of Histone Deacetylases in Diffuse Large B-cell Lymphoma and Its Clinical Significance. **Int J Med Sci**, v. 11, n. 10, p. 994-1000, 2014.

LIN, Y. C.; LIN, J. H.; CHOU, C. W.; CHANG, Y. F.; YEH, S. H.; CHEN, C. C. Statins increase p21 through inhibition of histone deacetylase activity and release of promoter-associated HDAC1/2. **Cancer Res**, p. 2375-2383, 2008.

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-60, set. 1997.

MARKS, P. A.; XU, W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 600-8, jul. 2009.

MARMORSTEIN, R.; TRIEVEL, R. C. Histone modifying enzymes: structures, mechanisms, and specificities. **Biochim Biophys Acta**, v. 1789, n. 1, p. 58-68, jan. 2009.

MIN, S. K. et al. Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas. **Korean J Pathol**, v. 46, n. 2, p. 142-50, abr. 2012.

NAKAGAWA, M. et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. **Oncol Rep**, v. 18, n. 4, p. 769-74, out. 2007.

PINDBORG, J. et al. **Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa**. Springer, 1997.

PORTELA, A. & ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. (2010). **Nat Biotechnol** 28, 1057-1068.

PRADO, B. N.; PASSARELLI, D. H. C. Uma nova visão sobre prevenção do câncer bucal no consultório odontológico. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 79-85, 2009.

ROBERTSON, K. D. et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. **Nucleic Acids Res**, v. 27, n. 11, p. 2291-8, jun. 1999.

ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Mol Oncol**, v. 1, n. 1, p. 19-25, jun, 2007.

ROTH, S. Y.; DENU, J. M.; ALLIS, C. D. Histone acetyltransferases. **Annu Rev Biochem**, p. 81-120, 2001.

RUIJTER, Annemieke J.m. de et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 370, n. 3, p.737-749, 15 mar. 2003. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20021321>.

SENA, M. F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 56, n. 1, p. 93-102, 2010.

TAFROVA, J. I.; TAFROV, S. T. Human histone acetyltransferase 1 (hat1) acetylates lysine 5 of histone h2a in vivo. **Mol Cell Biochem**, p. 259-72, 2014.

WEICHERT, W. et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. **Br J Cancer**, v. 98, n. 3, p. 604-10, fev. 2008.

YANG, H. et al. Analysis of class I and II histone deacetylase gene expression in human leukemia. **Leuk Lymphoma**, p. 1-8, mai. 2015.

YOO, C. B.; JONES, P. A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 1, p. 37-50, jan. 2006.

ZHAO, Y.; LU, S.; WU, L. et al. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(waf1/cip1). **Mol Cell Biol** p. 2782-2790, 2006.

ANEXO A – Ata de Apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 21 dias do mês de maio de 2019, às 9 horas, em sessão pública no (a) auditório do Bloco H do CCS, nesta Universidade, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Filipe Ivan Daniel e pelos examinadores:

1- Angélica Reinheimer

2- Rogério de Oliveira Gondak

o aluno Alvaro Luiz Socorro Borges Junior apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: "**Avaliação imuno-histoquímica das proteínas HDAC1, HDAC2, HAT1, DNMT1 e DNMT3a em epitélio de revestimento não neoplásico adjacente a carcinomas de células escamosas de lábio**" como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.

Presidente da Banca Examinadora

Examinador 1

Examinador 2

Aluno

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Senhor (a) está sendo convidado a participar da pesquisa **“Expressão imunoistoquímica das enzimas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas labiais”**, a ser desenvolvida pela cirurgiã-dentista **Emanuelly da Silva Chrun**, aluna do Curso de Mestrado em Odontologia/UFSC, sob orientação do **Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel**. O (a) Sr. (a) apresentou, no passado, uma lesão no lábio, que recebeu diagnóstico e/ou tratamento na UFSC. Para que isso acontecesse, foi colhido um material durante uma cirurgia para retirar essa lesão, esse material foi utilizado para determinar o diagnóstico e ele ficou guardado na UFSC. Para participar desse trabalho, será necessário que o (a) senhor (a) autorize a utilização de uma pequena parte desse material já arquivado.

Objetivo: Este trabalho pretende pesquisar a presença de certas substâncias (enzimas chamadas HDAC1, HDAC2 e HAT1), por meio de uma técnica chamada imunoistoquímica.

Metodologia: Assinando esse termo o (a) Sr. (a) concorda em participar desse trabalho permitindo o acesso ao material pertencente ao senhor, que está armazenado na UFSC, e também às informações que estão nas fichas de biópsia, sobre o seu caso. Não haverá a necessidade de uma nova cirurgia para a coleta do material.

Benefícios: Os benefícios esperados envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos, e possivelmente tentar ajudar os próximos pacientes que tenham a mesma doença no futuro, facilitando o seu diagnóstico.

Desconfortos/Riscos: Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante da biópsia da lesão, previamente realizada, e armazenado nos arquivos do LPB (Laboratório de Patologia Bucal), sem causar os desconfortos daquela cirurgia que já foi realizada. Como haverá acesso aos seus dados, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

Outras informações: O (A) Sr. (a) tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos

relacionados à pesquisa, por meio do contato com os pesquisadores, que assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo. O (A) Sr. (a) não terá nenhuma despesa decorrente desta pesquisa e tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, sem qualquer represália/prejuízo ao seu atendimento, através dos telefones (48) **37219473/91909480** (pesquisadores) ou e-mail emanuely.silva@gmail.com. Os pesquisadores declaram que cumprirão as exigências contidas na Resolução CNS 466/2012 (especialmente nos itens IV.3 e IV.4), que o sigilo/privacidade dos participantes será garantido durante todas as etapas da pesquisa, inclusive na divulgação dos resultados, que os participantes terão direito ao ressarcimento de eventuais despesas e indenização diante de eventuais danos produzidos pela pesquisa. O telefone de contato do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC é **37219206**, caso seja necessário contato.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu,

_____, portador (a) do
 RG/CPF _____ concordo em participar desta pesquisa, bem como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos. A minha participação é voluntária podendo ser suspensa a qualquer momento. Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido (a) sobre a pesquisa a ser realizada, de forma detalhada, livre de qualquer constrangimento e obrigação, e que recebi uma cópia deste termo, assinada pelos pesquisadores.

Florianópolis, ___ de _____ de 2015.

 Assinatura do participante

Emanuely da Silva Chrun
 Pesquisadora Participante
 (48)9190-9480
 emanuely.silva@gmail.com

Filipe Ivan Daniel
 Pesquisador Principal
 (48)3721-9473
 filipe.daniel@ufsc.br

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

Campus Universitário – Trindade – Fpolis/SC – CEP 88040-370
Fone: (48) 37219473 – Fax: (48)37219542 – email:
deptoptl@ccs.ufsc.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado participante,

Todas as informações contidas neste termo foram fornecidas pelos **Profs. Filipe Modolo Siqueira e Filipe Ivan Daniel** do Departamento de Patologia do CCS/UFSC.

O objetivo deste documento é informar sobre o trabalho a ser realizado pelos 2 professores acima, para obter uma autorização por escrito para a sua participação espontânea na pesquisa.

O título do trabalho é “**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS DNMT1, DNMT3a E DNMT3b EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS LABIAIS**”.

O(a) Sr(a) apresentou, no passado, uma doença no lábio e recebeu o diagnóstico e/ou tratamento na UFSC. Para que isso acontecesse, foi preenchido um prontuário com todos os dados da sua doença e da sua consulta, colhido um material durante uma pequena cirurgia no seu lábio e esse material foi utilizado para determinar o diagnóstico.

Este trabalho pretende observar novamente esse material para investigar as alterações que existem nele. Além disso, pretendemos observar o seu prontuário e a ficha que foi preenchida após a cirurgia para coletar as seguintes informações: sexo (gênero), idade, raça (etnia), profissão, tempo estimado de exposição ao sol, tempo de duração da doença, características clínicas da lesão e local da lesão. Essa observação nos ajudará a entender e conhecer melhor essas doenças e, quem sabe, tentar ajudar os próximos pacientes que tenham as mesmas doenças no futuro.

Assinando este termo o(a) Sr(a) concorda em participar do trabalho permitindo o acesso ao material pertencente ao senhor que encontra-se na UFSC.

Em nenhum momento o nome do Sr(a) será vinculado a qualquer parte do trabalho. Todos seus dados pesquisados serão confidenciais e a sua privacidade será sempre respeitada.

Este procedimento não lhe causará qualquer prejuízo e após a coleta dos dados sua participação não será mais necessária. Contudo o Sr(a) tem a garantia que receberá respostas ou esclarecimentos a todas as suas perguntas sobre os assuntos relacionados ao trabalho, por meio do contato com os pesquisadores, segunda à sextas-feiras, na sala dos professores do Departamento de Patologia (sala nº 13) do CCS/UFSC, nos telefones (48) 3721 5068, (48) 99880747 ou (48) 99571448 (telefone celular) ou pelo e-mail: modolo@ccs.ufsc.br, filipedaniel06@gmail.com. Os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informações atualizadas obtidas durante o estudo.

O Sr(a) tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer represália ou prejuízo, através do contato com os professores pelos telefones (48) 37215068, (48) 99880747 ou (48) 99571448 (telefone celular) ou e-mails modolo@ccs.ufsc.br ou filipedaniel06@gmail.com.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu,.....
, portador do RG:..... e
 CPF:..... concordo em participar do
 trabalho: "**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS
 DNMT1, DNMT3a E DNMT3b EM QUEILITES ACTÍNICAS E
 CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS LABIAIS**", bem
 como com a utilização dos dados coletados, desde que seja mantido o
 sigilo de minha identificação, conforme normas do Comitê de Ética em
 Pesquisa com Seres Humanos desta Universidade. A minha participação
 é voluntária podendo ser sustada a qualquer momento.

Florianópolis, de de 20.....

Assinatura do participante

Elaborado com base na Resolução 01/88 do CNS, publicado no Diário Oficial, 14/06/1988, Brasília, p. 10713-8.

ANEXO D – Parecer Consubstanciado de Aprovação de Pesquisa em Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2274

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pro-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584/GR.99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2274 **FR:** 465903

TÍTULO: EXPRESSÃO INÚNO-HISTOQUÍMICA DAS ENZIMAS DNMT1, DNMT3A E DNMT3B EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE

AUTOR: Filipe Modolo Siqueira, Filipe Ivan Daniel

FLORIANÓPOLIS, 31 de Outubro de 2011.

Coordenador do CEPSH UFSC

ANEXO E – Parecer Consubstanciado de Aprovação do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DAS ENZIMAS HDAC1, HDAC2 E HAT1 EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS LABIAIS POR IMUNOISTOQUÍMICA **Pesquisador:** FILIPE IVAN DANIEL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42882915.2.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.020.518

Data da Relatoria: 30/03/2015

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo descritivo, observacional do tipo caso-controle, em que será realizada reação imunoistoquímica para os anticorpos HDAC1, HDAC2 e HAT1, em 30 espécimes de tecido não-neoplásico de lábio, 30 espécimes de lesão potencialmente cancerizável do tipo queilite actínica e 30 de carcinoma de células escamosas labial, para cada anticorpo. Esse material encontra-se armazenado no arquivo de diagnósticos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC e participará da pesquisa frente à concordância dos pacientes através do termo de consentimento livre e esclarecido, anexo no formulário.

Hipótese:

Os tecidos pre-neoplásicos e neoplásicos apresentam progressivamente maior expressão das HDAC e menor de HAT, quando comparado com o tecido não-neoplásico. Avaliar essa expressão poderá ser útil para facilitar o diagnóstico de tais lesões, especialmente nos casos de difícil definição diagnóstica, possivelmente também como marcador de prognóstico e serviria como alvo de medicamentos antineoplásicos, que já foram desenvolvidos e estão sendo utilizados para tratamento de outros tumores malignos.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste trabalho é investigar a expressão de HDAC1, HDAC2 e HAT1 em tecido não-neoplásico, lesões pre-cancerosas tipo queilite actínica (QA) e carcinoma espinocelular (CEC) de lábio.

Objetivo Secundário:

• Determinar a expressão das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 em tecido não-neoplásico, QA e CEC de lábio, através de imunoistoquímica; • Determinar a localização intracelular das proteínas HDAC1, HDAC2 e HAT1 nos tecidos em estudo, por meio de imunoistoquímica; • Comparar a expressão das proteínas entre os grupos estudados; • Comparar a expressão de HDAC1, HDAC2 e da HAT1 com a diferenciação celular nos CECs de lábio e com o grau de displasia epitelial nas QAs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante da biópsia da lesão, previamente realizada, e armazenado nos arquivos do LPB (Laboratório de Patologia Bucal). Assim, não haverá nova intervenção cirúrgica no paciente e o mesmo não será submetido a desconfortos locais ou riscos cirúrgicos. Porém, como haverá acesso aos dados do paciente, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa em tela é relevante e deve ser efetuada porque se volta para pesquisar o câncer bucal. Logo descobrir seus comportamentos é de grande importância porque envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos, e possivelmente tentar ajudar pacientes que tenham a mesma doença no futuro, facilitando o seu diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de apresentação obrigatória está bem elaborado. Aborda o método e toma todos os cuidados para esclarecer as pessoas envolvidas na pesquisa. É documento claro, objetivo e esclarecedor.

Recomendações:

Não encontramos motivos para apontar recomendações, uma vez que julgamos tratar-se de um projeto muito bem elaborado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto está muito bem elaborado. Cita ainda que as despesas decorrem do uso de reagentes e que os mesmos já constam no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC.

Por o projeto atender as normas em vigor e por estar de acordo com o se exige para seu trâmite, onde constam todos os anexos somos de parecer favorável a sua aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANÓPOLIS, 13 de Abril de 2015

Assinado por:
Washington Pereira de Souza
(Coordenador)