



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA-DIAGNÓSTICO BUCAL

Emanuely da Silva

**Avaliação da expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em
leucoplasia bucal e carcinoma epidermoide de boca**

Florianópolis
2020

Emanuely da Silva

Avaliação da expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em leucoplasia bucal e carcinoma epidermoide de boca

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Coorientador: Prof. Dr. Filipe Ivan Daniel

Florianópolis
2020

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

Silva, Emanuely
Avaliação da expressão imuno-histoquímica de HDAC1,
HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em leucoplasia bucal e carcinoma
epidermoide de boca / Emanuely Silva ; orientador, Filipe
Modolo Siqueira, coorientador, Filipe Ivan Daniel, 2021.
66 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Epigenética. 3. Código das histonas.
4. Câncer de boca. 5. Leucoplasia oral. I. Siqueira, Filipe
Modolo . II. Daniel, Filipe Ivan. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

Emanuely da Silva

Avaliação da expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em leucoplasia bucal e carcinoma epidermoide de boca

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Doutora em Odontologia e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 16 de dezembro de 2020.

Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof.(a) Dr.(a) Luisa Machado Barin
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Dr.(a) Angélica Reinheimer
Avaliadora
Sociedade Educacional de Santa Catarina - UniSociesc

Dedico esse trabalho...
Aos meus pais, Edamara e Emilson,
e à minha irmã, Eduarda, que são meu alicerce e porto seguro.
Ao meu namorado e parceiro de todos os momentos, Marcos.
Ao meu avô Vitalino Luis Schmidt (in memorian), saudades eternas.

AGRADECIMENTOS

À Deus por cada dia, por cada oportunidade e cada uma das pessoas que coloca em minha vida. Aos meus pais... Minha mãe, Edamara, minha preciosidade, está ao meu lado incondicionalmente, torna os meus dias mais fáceis independente da distância, me ensina a todo momento como é importante buscarmos sempre sermos melhores para nós mesmas e para os que amamos. Meu pai, Emilson, não mede esforços para mostrar que está e estará sempre comigo, meu exemplo de persistência e força. Amo vocês!

À minha maninha, Eduarda, por seu amor e cuidado, companheira de toda a minha vida! Amo você!

Ao meu namorado, Marcos, meu presentinho de Deus, por seus cuidados, paciência, dedicação, carinho e companhia. E também por todo o apoio emocional, técnico e intelectual especialmente com esse trabalho! Obrigada por estar ao meu lado a cada dia! Te amo!

Aos meus tios, Élcio e Luciane, meus segundos pais, que me adotaram desde a graduação e me deram todo o apoio, emocional e prático, até a conclusão do doutorado. Gratidão por dividirem comigo sua família e sua casa sempre!

Aos meus primos Ricardo, Mariana, Leonardo e Glendha pelo carinho de irmãos!

À minha avó, Maria, por seu carinho. Ao meu avô, Vitalino (*in memoriam*), por seu legado de paciência e amor.

Aos amigos Laís e Neimar, pelo apoio profissional e emocional, a todo e qualquer momento.

Às queridas amigas, Patrícia e Mirian, por estarem sempre torcendo por mim e minha felicidade, sendo o apoio sempre que preciso.

Às minhas amigas: Ju, Carol, Aninha, Ge, Angel, Ru e Fer (*As Pato Girls*), que me levantaram nos momentos difíceis e comemoraram comigo cada pequena vitória, certamente a pós-graduação foi especial por causa de vocês! Da UFSC para a vida!!

Aos mestres...

Ao Prof. Filipe Modolo, por sua paciência e empatia em todos os momentos, por todo o aprendizado com leveza e simplicidade, por confiar em mim e no meu trabalho mesmo quando eu mesma não confiava. Pela sua preocupação comigo sempre e caminhos que abriu para mim, obrigada por tudo!

Ao Prof. Filipe Daniel, meu coorientador/orientador que pacientemente me ensinou a dar os primeiros passos na pós-graduação e me acompanha até aqui. És, para mim, exemplo de seriedade e dedicação, profissional e com sua família.

À Maninha, Prof. Maria Inês Meurer, a quem tenho a honra de hoje chamar de amiga, por estar sempre de braços e coração abertos para me acolher. Tenho grande admiração pela pessoa cheia de luz e pela professora dedicada e incrível que és! Meu exemplo!

À querida Professora Sônia, a quem devo a primeira porta aberta na Patologia, que me recebeu desde o início da graduação em seus projetos e me deu a oportunidade de seguir como sua monitora até o final da graduação, o que me fez crescer pessoal e profissionalmente aos seus cuidados carinhosos. Tens toda a minha admiração!

À Liliane, "espetáculo" de mestre, que se dedica ao atendimento dos pacientes e ao serviço de Estomatologia do HU sem medir esforços, obrigada por todas as oportunidades que me destes, de crescimento na área acadêmica e clínica. Admiro muito toda a sua energia que é contagiante sempre!

À Professora Elena, por sua dedicação e empenho, dentro da nossa área de concentração e também na coordenação do PPGO. Admiro sua seriedade e simplicidade!

Ao Professor Rogério, por ser sempre paciente e solícito com as dúvidas durante o aprendizado e na parceria nos trabalhos. Admiro sua dedicação e paciência!

Ao Professor Rodrigo (*in memoriam*), por sua simpatia e gentileza, por dividir com alegria os seus conhecimentos, deixou várias boas lembranças em nossas memórias.

À Gilmara, técnica do laboratório de Patologia Bucal e amiga, por mostrar-se sempre disposta a ajudar, com um sorriso no rosto e boas energias, que tornam os dias de trabalho mais simples e prazerosos.

Aos os colegas da área de concentração em diagnóstico: Diogo, Guilherme, Mariah, Bianca, Giba, Fer Weber, Elis, Andressa, Natália, Carol Flausino, Sarah, Joyce, Carol Meurer, Fabi, Mirian, André, Bubacar, Juliana, Letícia e Morgane, pela troca de conhecimentos.

Aos Professores que compõem minha banca de defesa: Prof. Rogério, Prof.^a Luisa, Prof.^a Angélica, Prof.^a Ariadne, Prof.^a Jussara e Prof.^a Grasieli, por aceitarem participar, dedicando seu tempo para contribuir com o meu trabalho.

Aos pacientes, que de forma solícita concederam partilhar uma parte de suas vidas para que esse trabalho fosse possível.

Aos técnicos do HU-UFSC que sempre me receberam de forma gentil colaborando com o meu trabalho.

Ao CNPq que financiou meus estudos no curso de doutorado.

*"Concedei-me Senhor, serenidade para aceitar o que não posso mudar, coragem para mudar
aquelas que posso e sabedoria para discernir entre as duas."*

(Reinhold Niebuhr)

RESUMO

As células malignas exibem redes epigenéticas defeituosas, que surgem em diferentes partes dos tecidos, sustentam o comportamento autônomo das células e podem levar ao desenvolvimento tumoral. Este trabalho objetivou avaliar a imunexpressão das proteínas modificadoras de histonas: HDAC1, HDAC2 e HAT1, bem como o marcador do produto da acetilação da lisina 5 da histona H4: H4K5Ac, em carcinoma epidermoide de boca (CEB), leucoplasia bucal (LB) e epitélio não neoplásico (ENN). Para tanto, a expressão imunohistoquímica desses marcadores foi avaliada em 41 casos de CEB, 49 casos de LB, além de 32 casos de epitélio não neoplásico (ENN), como controle. Houve diferença estatisticamente significativa entre a imunopositividade de HDAC2 entre os grupos de LB (72,69 - 37,91) e ENN (50,67 - 37,37) (mediana - amplitude interquartil, Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,04$) e para H4K5Ac entre LB (81,92-25,09) e ENN (70,65-25,83) e entre CEB (85,69-20,29) e ENN (70,65 -25,83) (Teste de Kruskal-Wallis, $p=0,005$). A correlação apresentou-se positiva e forte/moderada entre os quatro marcadores tanto para o grupo de CEB quanto para LB e ENN. Estes resultados sugerem a participação de HDAC2 e H4K5Ac nas fases iniciais da carcinogênese bucal, e a imunexpressão correlata das enzimas dentro de cada grupo confirma a desregulação entre a acetilação e desacetilação de histonas durante a carcinogênese. Assim, este trabalho colaborou com o processo de desvendamento do código das histonas, e assim ajudou a melhorar o entendimento do papel da epigenética na carcinogênese bucal.

Palavras-chave: Epigenética. Acetilação. Código das histonas. Câncer de boca. Leucoplasia Oral. Histona desacetilases. Histona acetiltransferases.

ABSTRACT

Malignant cells exhibit defective epigenetic networks, which appear in different parts of the tissues, support the autonomous behavior of the cells and can lead to tumor development. This work aimed to evaluate the immunoexpression of histone modifying proteins: HDAC1, HDAC2 and HAT1, as well as the product marker of lysine 5 acetylation of histone H4: H4K5Ac, in oral squamous cell carcinoma (OSCC), oral leukoplakia (OL) and non-neoplastic epithelium (NNE). Immunohistochemical expression of these markers was evaluated in 41 cases of OSCC, 49 cases of OL, and 32 cases of NNE, as control. There was a statistically significant difference between the immunopositivity of HDAC2 between the groups of OL (72,69 - 37,91) and NNE (50,67 - 37,37) (median- interquartile range, Kruskal-Wallis Test, $p=0.04$), for H4K5Ac between OL (81,92 - 25,09) and NNE (70,65 - 25,83), and between OSCC (85,69 - 20,29) and NNE (70,65 - 25,83) (Kruskal-Wallis Test, $p=0.005$). The correlation was positive and strong/moderate between the four markers for both NNE, OL, and OSCC. These results suggest the participation of HDAC2 and H4K5Ac in the early phases of oral carcinogenesis and the correlated immunoexpression of enzymes within each group confirms the deregulation between acetylation and deacetylation of histones during carcinogenesis. Thus, this work corroborates with the process of uncovering the histone code, improving the understanding of oral carcinogenesis.

Keywords: Epigenetic. Acetylation. Histone code. Oral cancer. Oral leukoplakia. Histone deacetylases. Histone acetyltransferases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação gráfica de parte do "código das histonas"	20
Figura 2	Atuação das proteínas modificadoras de histonas na remodelação da cromatina.....	21
Figura 3	Cortes histológicos observados a olho nu	37
Figura 4	Expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac.....	40
Figura 5	Gráfico boxplot representando a expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo.....	40
Figura 6	Imunoexpressão dos marcadores entre os subgrupos dos graus de displasia nas LB conforme o sistema clássico da OMS.....	42
Figura 7	Imunoexpressão dos marcadores entre os subgrupos conforme a classificação binária nas LB.....	43
Figura 8	Imunoexpressão dos marcadores entre os subgrupos conforme a gradação histopatológica dos CEB.....	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios arquiteturais e citológicos para classificação de DE	27
Quadro 2 - Classificação TNM- Tumor primário	28
Quadro 3 - Classificação TNM- Linfonodos metastáticos regionais	29
Quadro 4 - Classificação TNM- Metástases à distância	29
Quadro 5 - Estadiamento Clínico	30
Quadro 6 - Descrição dos anticorpos utilizados	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas e demográficas dos pacientes.....	38
Tabela 2	Expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo.....	40
Tabela 3	Imunorreatividade dos marcadores no grupo LB, conforme a classificação clássica da OMS (mediana (AI))	41
Tabela 4	Imunorreatividade dos marcadores no grupo LB, conforme a classificação binária (mediana (AI)).....	42
Tabela 5	Imunorreatividade dos marcadores no grupo CEB, conforme a gradação histopatológica (mediana (AI))	43
Tabela 6	Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores no ENN.....	45
Tabela 7	Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores na LB.....	45
Tabela 8	Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores no CEB.....	45
Tabela 9	Imunorreatividade dos marcadores no grupo CEB, conforme o prognóstico (mediana (AI)).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP – Difosfato de adenosina
- AI – Amplitude interquartis
- CEB – Carcinoma epidermoide de boca
- CONEP – Comissão nacional de ética em pesquisa
- DBPM – Distúrbios bucais potencialmente malignos
- DE – Displasia epitelial
- DEL – Displasia epitelial leve
- DEM – Displasia epitelial moderada
- DEI – Displasia epitelial intensa
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ENN – Epitélio não neoplásico
- ES – Emanuely da Silva
- FM – Filipe Modolo
- HAT – Histona Acetiltransferase
- HDAC – Histona Desacetilase
- HPV – Papilomavírus humano
- HRP – *Horseradish* peroxidase
- HU/UFSC/EBSERH – Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago
- H4K5Ac – Lisina 5 da histona H4 acetilada
- H4K12ac – Lisina 12 da histona H4 acetilada
- H3K9ac – Lisina 9 da histona H3 acetilada
- H3K36me3 – Lisina 36 da histona H3 trimetilada
- H3S10ph – Serina 10 da histona H3 fosforilada
- INCA – Instituto nacional do câncer
- LB – Leucoplasia bucal
- LPB/UFSC – Laboratório de Patologia Bucal – UFSC
- miRNA – Micro-RNA

NNE – *Non-neoplastic epithelium*

OL – *Oral leukoplakia*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OSCC – *Oral squamous cell carcinoma*

PBS – Tampão fosfato salino

RNA – Ácido ribonucleico

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

TMA – *Tissue microarray*

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
>	maior que
<	menor que
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual
μm	micrômetros
°C	graus Celsius
M	molar
pH	potencial hidrogeniônico
®	marca registrada
±	mais ou menos
r _s	coeficiente de correlação de Spearman
p	probabilidade de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS	18
2.1.1	Modificações de histonas.....	19
2.2	ACETILAÇÃO/DESACETILAÇÃO DE HISTONAS E O CÂNCER.....	22
2.2.1	Produtos das modificações de histonas	24
2.3	LEUCOPLASIA BUCAL (LB).....	25
2.4	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA (CEB).....	27
3	JUSTIFICATIVA	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	ASPECTOS ÉTICOS	32
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
4.3	AMOSTRA.....	32
4.3.1	Critérios de Inclusão.....	32
4.3.2	Critérios de Exclusão.....	33
4.3.3	Obtenção dos TCLEs.....	33
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA	33
4.5	REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
4.6	AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE	35
4.7	CALIBRAÇÃO DO EXAMINADOR	36
4.8	COLETA E ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS.....	36
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS	38
5.1	ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS	38
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	39
5.3	IMUNOEXPRESSÃO E EVOLUÇÃO CLÍNICA	46
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	61
	ANEXO A – TCLE do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC	63

1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese oral é altamente influenciada por modificações nos mecanismos epigenéticos (CHRUN; MODOLO; VIEIRA; BORGES-JUNIOR *et al.*, 2017; DANIEL; ALVES; VIEIRA; BIZ *et al.*, 2016; DANIEL; RIVERO; MODOLO; LOPES *et al.*, 2010; DE FREITAS FILHO; SERVATO; DE SA; SIQUEIRA *et al.*, 2018; THEOCHARIS; KLIJANIENKO; GIAGINIS; RODRIGUEZ *et al.*, 2011). Esses mecanismos se referem à regulação na expressão do gene sem alterações na sequência de nucleotídeos do DNA, sendo herdáveis e reversíveis (FEINBERG; TYCKO, 2004). Um dos principais fenômenos epigenéticos é a modificação de histonas, principais proteínas do nucleossomo que funcionam como uma matriz onde fica enrolado o DNA. As histonas podem sofrer acetilação e metilação de lisinas e argininas, fosforilação de serinas e treoninas, ubiquitilação, ribosilação e sumoilação de lisinas (PETERSON; LANIEL, 2004). Essas modificações interferem na dinâmica de regulação da expressão e silenciamento de genes, por meio da remodelação da cromatina (CRESS; SETO, 2000).

O equilíbrio entre a acetilação e a desacetilação das histonas, mediado pelas histonas acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDAC), pode influenciar na transcrição do DNA (YOO; JONES, 2006). As HATs promovem a acetilação das proteínas histonas, em ação coadjuvante a complexos promotores e ativam o processo de transcrição. Já as HDACs removem o grupamento acetil dos resíduos de lisina, agem de forma contrária e colaboram com o silenciamento gênico (MAHLKNECHT; HOELZER, 2000; MIN; KOH; PARK; KIM *et al.*, 2012).

A produção desregulada, sobre-expressão e recrutamento impróprio de HATs e HDACs têm sido relacionados com a iniciação e progressão de tumores (CHRUN; MODOLO; VIEIRA; BORGES-JUNIOR *et al.*, 2017; GLOZAK; SETO, 2007). A expressão dessas proteínas foi avaliada em diferentes neoplasias malignas humanas como câncer de mama (VERVERIS; KARAGIANNIS, 2012), câncer de próstata (WEICHERT; ROSKE; GEKELER; BECKERS *et al.*, 2008), leucemias (MORENO; SCRIDELI; CORTEZ; DE PAULA QUEIROZ *et al.*, 2010; YANG; MADDIPOTI; QUESADA; BOHANNAN *et al.*, 2015), entre outros, e essas enzimas têm se constituído como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento do câncer (WEICHERT, 2009). Ensaios clínicos para utilização de alguns inibidores de HDAC como drogas antitumorais estão em curso (O'CONNOR; FALCHI; LUE; MARCHI *et al.*, 2019; TAKEUCHI; HASE; SHIMIZU; ANDO *et al.*, 2020).

Além disso, as proteínas modificadoras de histonas e seus produtos (lisinas e serinas de histonas acetiladas, metiladas, fosforiladas ou ubiquitinadas) vêm sendo estudados como potenciais marcadores de prognóstico para os pacientes com câncer (WEICHERT, 2009), inclusive com carcinoma epidermoide de boca (CEB) (CAMPOS-FERNANDEZ; MATSUO; ANDRADE; SERVATO *et al.*, 2019; CHANG; CHIANG; HUNG; LIN *et al.*, 2009; WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017). A hiperacetilação da lisina 5 da histona H4 foi previamente observada na carcinogênese de pulmão (VAN DEN BROECK; BRAMBILLA; MORO-SIBILOT; LANTUEJOUL *et al.*, 2008; ZHANG; LIU; LIU; ZHANG *et al.*, 2019) e na progressão e invasão no câncer gástrico (JIE; WU; GAO; LI *et al.*, 2020), até onde se sabe, não há estudos em câncer de boca.

O CEB representa 90% dos casos de câncer da cavidade oral (TANDON; DADHICH; SALUJA; BAWANE *et al.*, 2017). Apesar dos fatores de risco genéticos e/ou ambientais associados ao desenvolvimento do CEB já terem sido elucidados, o conhecimento da base genética da carcinogênese oral (e também das suas precursoras, as lesões potencialmente cancerizáveis) ainda é uma tarefa desafiadora (HEMA; SMITHA; SHEETHAL; MIRNALINI, 2017). As alterações epigenéticas que ocorrem durante a tumorigênese e, às vezes até em lesões precursoras, podem fornecer biomarcadores valiosos e podem atuar como uma impressão digital molecular de malignidades (LINGEN; PINTO; MENDES; FRANCHINI *et al.*, 2011). Assim, este estudo visa investigar a expressão imuno-histoquímica de HAT1, HDAC1, HDAC2 e H4K5ac em epitélio não neoplásico (ENN), leucoplasia bucal (LB) - lesão potencialmente cancerizável mais comum - e CEB, e correlacionar com a evolução clínica dos pacientes atendidos no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH) e diagnosticados pelo Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar a expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em leucoplasia bucal (LB) e carcinoma epidermoide de boca (CEB) em comparação com epitélio não neoplásico (ENN).

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a expressão de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em ENN, LB e CEB, por meio de reações de imuno-histoquímica;
- Comparar a expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac entre os grupos estudados - ENN, LB e CEB;
- Avaliar a existência de correlação entre as expressões imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac nos grupos estudados - ENN, LB e CEB;
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac com o grau de displasia epitelial (DE) nas LB e com a diferenciação histológica nos CEB;
- Correlacionar a imunoexpressão de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac com a evolução clínica das LB e dos CEB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

A epigenética se refere às alterações na atividade dos genes sem alterações na sequência do DNA que são herdadas pelas células filhas. Os processos epigenéticos são essenciais para definir a identidade celular e para o funcionamento natural e normal das células, e a desregulação nesses processos pode resultar em diferentes doenças (WEINHOLD, 2006). Grande progresso tem sido feito na descrição das modificações epigenéticas em tecidos normais e doentes (PORTELA; ESTELLER, 2010). As pesquisas em epigenética têm fornecido novas compreensões sobre alguns tipos de doenças, principalmente desordens neurológicas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington, esclerose múltipla e epilepsia) (URDINGUIO; SANCHEZ-MUT; ESTELLER, 2009) e doenças autoimunes como artrite reumatoide (KAROOUZAKIS; GAY; GAY; NEIDHART, 2009), diabetes tipo 1 (MIAO; SMITH; ZHANG; MIN *et al.*, 2008) e lúpus eritematoso (JAVIERRE; FERNANDEZ; RICHTER; AL-SHAHROUR *et al.*, 2010). No entanto, um foco evidente das pesquisas desse campo são as alterações epigenéticas presentes nos vários tipos de cânceres (MIN; KOH; PARK; KIM *et al.*, 2012; PORTELA; ESTELLER, 2010).

Os processos epigenéticos podem levar à alteração da função dos genes e transformação maligna. Modificações epigenéticas aberrantes provavelmente ocorrem em um estágio muito inicial do desenvolvimento neoplásico, sendo amplamente descritas como agentes essenciais na progressão do câncer (KANWAL; GUPTA, 2012). Os principais tipos de mecanismos epigenéticos são: metilação do DNA, microRNAs (KUO; HSIEH; LEE; CHANG *et al.*, 2014) e modificação de histonas, este último por ser o foco desta pesquisa, será profundamente explorada no próximo subitem deste texto.

A metilação tem importante papel na manutenção da integridade do genoma, *imprinting* genômico (fenômeno em que determinados genes são expressos apenas por um alelo, enquanto o outro é inativado) e regulação transcricional (WU; ZHANG, 2010). Na metilação do DNA ocorre a adição de um grupamento metil ao carbono da posição 5 da citosina, predominantemente nas ilhas CpG (CHENG; BLUMENTHAL, 2008). Muitas evidências acumuladas ao longo dos anos sugerem que a metilação do DNA seja incompatível com a atividade transcricional do gene envolvido. A hipometilação global ou a metilação aberrante de ilhas CpG de genes supressores de tumor são frequentemente encontradas em cânceres humanos (RHEE; JAIR; YEN; LENGAUER *et al.*, 2000), inclusive no CEB (DANIEL; RIVERO; MODOLO; LOPES *et al.*, 2010; SUN; JUAN; SU; ZHANG *et al.*, 2020).

Os MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes que regulam processos celulares e de desenvolvimento fundamentais para os processos da transcrição e tradução (GOTTE, 2010). MicroRNAs são uma classe endógena de RNAs, de aproximadamente 21 nucleotídeos, que têm sido implicados na regulação de vários processos biológicos (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). Aparentemente, os padrões de expressão de miRNAs são fortemente regulados e desempenham um papel crucial na proliferação celular, apoptose e diferenciação celular (MEISTER; TUSCHL, 2004). De fato, as ligações entre os fatores de silenciamento de RNA e desordens genéticas hereditárias ou adquiridas vem sendo progressivamente identificadas (MEISTER; TUSCHL, 2004). No genoma humano 695 miRNAs maduros foram identificados e a desregulação dos perfis de expressão de miRNAs tem sido relacionada à patogênese de muitos cânceres humanos (KHOSHNAW; GREEN; POWE; ELLIS, 2009). Em distúrbios bucais potencialmente malignos (DBPM) o MiR-21, um tipo de miRNA, mostrou-se como um potencial biomarcador de diagnóstico (UMA MAHESWARI; NIVEDHITHA; RAMANI, 2020) e em células de CEB, o MiR-214 parece promover a proliferação celular e inibir a apoptose, favorecendo a oncogênese (ZHANG ; SUN; WANG; YU *et al.*, 2020).

2.1.1 Modificações de histonas

Os nucleossomos, unidades básicas da estrutura da cromatina, são formados por dupla cadeia de DNA enrolada em torno de um octâmero composto por quatro pares de proteínas chamadas histonas (H2A, H2B, H3 e H4)(PETERSON; LANIEL, 2004). Essas proteínas são relativamente pequenas com uma alta proporção de aminoácidos positivamente carregados, o que auxilia as histonas a ligarem-se firmemente ao esqueleto de fosfato e açúcares, negativamente carregados, do DNA(KIM, 2014). Os cromossomos possuem diversos níveis de compactação do DNA, denominada heterocromatina quando se encontra altamente condensada, promovendo silenciamento transcricional ou eucromatina, quando encontrada em forma de relaxamento na qual ocorre a expressão gênica. Cada proteína histona no nucleossomo tem uma cauda, rica em lisinas, que se estende para fora do mesmo (JENUWEIN; ALLIS, 2001; PETERSON; LANIEL, 2004).

A acessibilidade ao DNA dentro do nucleossomo é, em parte, controlada por modificações na cauda da histona. As histonas estão sujeitas a modificações pós-traducionais incluindo acetilação, metilação, fosforilação, citrulinação, ubiquitinação, sumoilação, ribosilação de ADP e biotilação de lisinas, serinas, treoninas e argininas (PETERSON;

LANIEL, 2004; SKENE; HENIKOFF, 2013; TURNER, 2005). As diferentes modificações na cauda N-terminal das histonas podem levar a efeitos sinérgicos ou antagônicos das proteínas relacionadas à cromatina, que conduzem a dinâmica das transições entre o estado de ativação ou silenciamento transcricional. Essas diferentes modificações geram um "código", que pode ser lido por diferentes mecanismos celulares estabelecendo assim diferentes resultados celulares como a ativação ou repressão da transcrição, replicação e reparo do DNA (Figura 1) (JENUWEIN; ALLIS, 2001; KIM, 2014). Propriedades distintas dessas variantes permitem uma diversificação ainda maior de estados da cromatina, o que é vital para a regulação da identidade celular durante o desenvolvimento animal (SKENE; HENIKOFF, 2013).

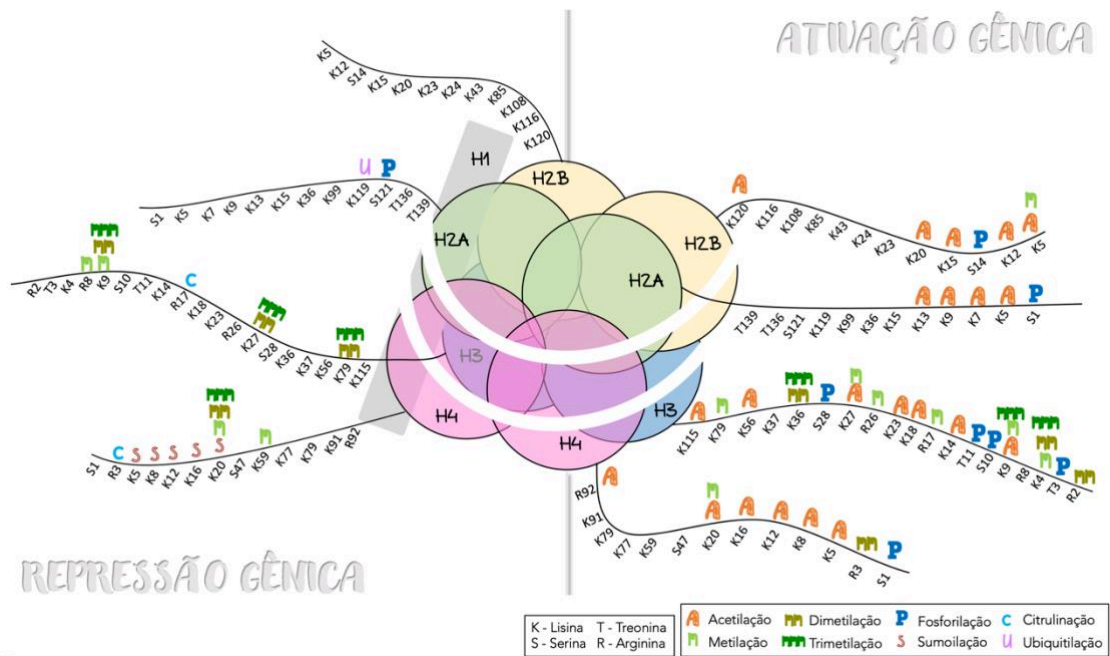


Figura 1. Representação gráfica de parte do "código das histonas" de acordo com os marcadores de ativação e repressão gênica. O DNA está envolvido em um octâmero de quatro pares de histonas (H2A, H2B, H3 e H4). A histona H1 é a proteína de ligação do DNA entre os nucleossomos, tendo função de suporte. Diferentes aminoácidos constituem as caudas N-terminais das histonas e estão suscetíveis a modificações específicas em cada resíduo. Modificações que levam a ativação gênica estão representadas do lado direito da figura enquanto as modificações que levam ao silenciamento gênico estão à esquerda.

Fonte: Imagem adaptada de Kim (2014) (KIM, 2014).

A acetilação das histonas, foco específico deste trabalho, é controlada por duas famílias de enzimas: histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC). HATs promovem a acetilação, catalisando a transferência do grupo acetil da acetil-CoA para os resíduos de lisina de histonas. Esse evento faz com que as lisinas (carregadas positivamente) sejam neutralizadas, diminuindo sua atração aos grupamentos fosfato do DNA (negativamente carregados), afastando as moléculas e resultando assim em maior acesso de fatores de transcrição e de RNA-polimerase. As HDACs, por outro lado, removem os grupos acetil,

devolvendo a carga positiva à lisina que será novamente atraída pela negatividade do DNA resultando em diminuição do acesso ao DNA (PETERSON; LANIEL, 2004) (Figura 2).

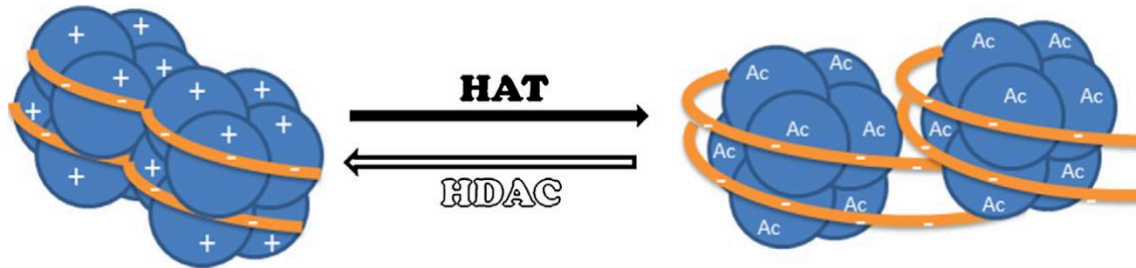


Figura 2. Atuação das proteínas modificadoras de histonas na remodelação da cromatina.
Fonte: Chrun, Modolo e Daniel, 2017 (CHRUN; MODOLO; DANIEL, 2017).

Foram identificadas 18 HDACs humanas que são agrupadas em quatro classes (GIAGINIS; ALEXANDROU; DELLADETSIMA; GIANNOPOULOU *et al.*, 2014; LANE; CHABNER, 2009; SCHEIPL; LOHBERGER; RINNER; FROEHLICH *et al.*, 2013). A classe I é composta pelas HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8, localizando-se exclusivamente no núcleo celular (GREGORETTI; LEE; GOODSON, 2004; LANE; CHABNER, 2009). As HDACs de classe II localizam-se tanto no núcleo quanto no citoplasma (HDAC4, 5, 7 e 9) ou somente no citoplasma (HDAC6 e 10). A classe IV é composta pela HDAC11, que se apresenta tanto no núcleo quanto no citoplasma. As Sirtuínas são as histona desacetilases que compõem a classe III e são independentes de zinco, ao contrário das demais (LANE; CHABNER, 2009).

HDAC1 e HDAC2 são inativas quando produzidas em técnicas recombinantes, pois cofatores são necessários para que a sua atividade ocorra. Tais enzimas somente funcionam com um complexo de proteínas, necessárias para a modulação de sua atividade de desacetilação e para a ligação com o DNA, junto com proteínas que mediam o recrutamento dos genes promotores de HDACs. Vários complexos de proteínas têm sido correlacionados tanto com HDAC1 quanto HDAC2, sendo alguns deles: Sin3, NuRD (*nucleosome remodelling and deacetylating*), Co-REST (DE RUIJTER; VAN GENNIP; CARON; KEMP *et al.*, 2003) e Mad-Max (HASSIG; FLEISCHER; BILLIN; SCHREIBER *et al.*, 1997).

Tanto as HATs como as HDACs têm sido consideradas reguladoras cruciais da proliferação, diferenciação e apoptose celular em variadas malignidades hematológicas e sólidas (GLOZAK; SETO, 2007). A alteração de expressão e mutações nos genes que as codificam (são transcritos e traduzidos em HDACs) têm sido associadas ao desenvolvimento de tumores, pois a produção desregulada das HDACs induz à transcrição aberrante de genes-chave que regulam essas importantes funções celulares. Além de histonas, HDACs ligam-se e

desacetilam uma variedade de outros alvos proteicos, incluindo fatores de transcrição e outras proteínas celulares abundantes que agem no controle do crescimento, diferenciação celular e apoptose (LAKSHMAIAH; JACOB; APARNA; LOKANATHA *et al.*, 2014).

No ciclo celular, HDAC1 e HDAC2 participam na regulação negativa de p21 (ZUPKOVITZ; GRAUSENBURGER; BRUNMEIR; SENESE *et al.*, 2010). No processo de apoptose, podem interferir na atividade de p53, Bax e BCL2 (JUNG; NOH; KIM; EUN *et al.*, 2012). As HDACs modulam também diferentes fatores pró e antiangiogênicos, como: HIF1 α (GENG; HARVEY; PITTSSENBARGER; LIU *et al.*, 2011) e VEGF (RAY; ALALEM; RAY, 2013). Assim, as HDACs estão entre os alvos terapêuticos promissores para o tratamento do câncer, inspirando pesquisadores a estudar e desenvolver inibidores destas enzimas (LI; SETO, 2016; ROPERO; ESTELLER, 2007). As pesquisas nessa área ganharam ainda mais ímpeto quando os primeiros resultados de inibidores de HDACs funcionando como promissores agentes anticâncer foram disponibilizados (WEICHERT, 2009).

2.2 ACETILAÇÃO/DESACETILAÇÃO DE HISTONAS E O CÂNCER

Em tumores humanos, a desacetilação aberrante das histonas pela atividade das HDACs tem sido demonstrada como uma das responsáveis por mudanças conformacionais dentro do nucleossomo, resultando na repressão da transcrição de genes envolvidos na diferenciação e regulação negativa da proliferação, migração celular e metástase (p21, APC, p53 e E-caderina) (CHRUN; MODOLO; DANIEL, 2017).

Em 2005, Krusche *et al.* estudou a expressão de HDAC1 e 3 através de imunohistoquímica em TMA (*tissue microarray*) de 600 amostras de tumores de mama para estabelecer seu significado como potencial terapêutico e prognóstico. Imunorreatividade nuclear moderada ou forte para HDAC1 foi observada em 39,8% dos casos e para HDAC3, em 43,9% dos casos de carcinomas da mama. A expressão de HDAC1 foi correlacionada significativamente com a maior sobrevida livre de doença, em particular, nos pacientes com tumores pequenos, independentemente do grau de diferenciação. O resultado sugere que a análise da expressão da HDAC1 permitiria uma avaliação mais precisa do prognóstico de pacientes com câncer de mama e possa ser clinicamente útil para estabelecer uma terapia adjuvante sistêmica individualizada direcionada ao risco para este tipo de malignidade (KRUSCHE; WULFING; KERSTING; VLOET *et al.*, 2005).

Weichert (2009) realizou uma revisão da literatura analisando a expressão das HDACs em tecidos normais e afirmou que as HDAC1, 2 e 3 têm expressão quase exclusivamente

nuclear e constante em fibroblastos, miofibroblastos, células musculares lisas, paredes de vasos e células endoteliais e apenas ocasional em células inflamatórias como macrófagos e linfócitos. Observou ainda que a sobre-expressão de HDACs de classe I está relacionada com estágios tardios e altos graus em tumores malignos com forte atividade proliferativa, além de impactar negativamente no prognóstico de vários tumores. Em contrapartida a expressão elevada de HDACs de classe II foi relacionada com melhora no prognóstico sendo que os tumores malignos, em geral, apresentam baixa expressão das mesmas (WEICHERT, 2009).

Chang *et al.* (2009) analisaram a expressão de HDAC2 em 20 casos de displasia epitelial (DE) e 93 casos de CEB buscando relação com características clínicas e progressão tumoral, e observaram positividade nuclear para HDAC2 em 86,02% casos de CEB e 55% casos de DE. Os casos de CEB em estágio avançado apresentaram maior nível de expressão de HDAC2 e pior prognóstico. Os resultados deste estudo sugerem que há influência da sobre-expressão de HDAC2 na iniciação do CEB e que essa enzima pode ser usada como um fator de prognóstico para a doença (CHANG; CHIANG; HUNG; LIN *et al.*, 2009).

Para identificar novos marcadores prognósticos para o câncer gástrico, Sudo *et al.* (2011) avaliaram amostras de tecidos normais e tumorais de estômago, identificando, por qRT-PCR, sobre-expressão do gene HDAC1 em 77% dos tecidos tumorais e por imuno-histoquímica forte expressão nuclear de HDAC1 nas células cancerosas. A invasão perivascular, acometimento metastático de linfonodos e estágio avançado da doença foram relacionados à sobre-expressão de HDAC1. Além disso, essa sobre-expressão foi associada ao comportamento agressivo do câncer gástrico primário, podendo ser indicativa de pior prognóstico em pacientes portadores da doença (SUDO; MIMORI; NISHIDA; KOGO *et al.*, 2011).

Theocaris *et al.* (2011), ao investigar 49 amostras de CEB de língua, observaram que a sobre-expressão de HDAC1 pode ser significativamente associada a pacientes jovens, do sexo masculino, portadores de lesões pouco diferenciadas e com a presença de metástases linfonodais, além de menor sobrevida livre da doença. Já a sobre-expressão da HDAC2 não mostrou correlações estatisticamente significativas com quaisquer parâmetros clínico-patológicos, apenas a intensidade da imunomarcção foi relacionada à profundidade de invasão (THEOCHARIS; KLIJANIENKO; GIAGINIS; RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

Pacheco e Nielsen (2012) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de HDAC1 e 2 em uma série de 1.332 casos de 44 tipos de tumores mesenquimais malignos e a sobre-expressão de HDAC2 foi mais observada em sarcomas associados à translocação (sarcoma sinovial, sarcoma de células claras, lipossarcoma mixoide e tumor desmoplásico de células pequenas

azuis e redondas) em comparação com outros tumores mesenquimais ou tecidos normais. Dessa forma concluíram que a HDAC2 é a isoforma que mais provavelmente contribui para a patogênese de muitos destes sarcomas (PACHECO; NIELSEN, 2012).

O papel crítico de HDAC1, HDAC2 e HAT1 no desenvolvimento de linfomas (linfoma de grandes células B difuso, linfoma de células T periférico, linfoma de células NK/T extranodal) foi descrito por Min et al. (2012), que também encontrou maior expressão de HAT1 nos tumores malignos linfoides do que na hiperplasia linfoide reativa e sugeriu que HAT1 e HDAC1 podem representar indicadores de mau prognóstico nos casos de linfomas de grandes células B difuso (MIN; KOH; PARK; KIM *et al.*, 2012).

Além disso, Chrun et al. (2017), encontraram diferença significativa na expressão de HDAC2 em casos de queilite actínica comparada ao epitélio não-neoplásico, sugerindo que a sobre-expressão de HDAC2 exerça influência na fotocarcinogênese de lábio (CHRUN; MODOLO; VIEIRA; BORGES-JUNIOR *et al.*, 2017).

2.2.1 Produtos das modificações de histonas

Como já foi dito, a ativação ou repressão da transcrição, replicação e reparo do DNA depende das modificações específicas que podem ocorrer em um determinado resíduo de aminoácido nas caudas N-terminais das histonas, o código das histonas.

As proteínas modificadoras de histonas e seus produtos, lisinas e serinas de histonas acetiladas (H4K12ac, H3K9ac), metiladas (H3K36me3), fosforiladas (H3S10ph) ou ubiquitiladas, vem sendo estudadas como potenciais marcadores de prognóstico para os pacientes com câncer (WEICHERT, 2009), inclusive CEB (CAMPOS-FERNANDEZ; MATSUO; ANDRADE; SERVATO *et al.*, 2019; CHANG; CHIANG; HUNG; LIN *et al.*, 2009; WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017).

A acetilação da lisina 5 da histona H4 (H4K5) - acetilada pela HAT1 e desacetilada pela HDAC1 (KIM, 2014; ZHOU; ZHOU; LENZMEIER; ZHOU, 2009) - aparece como importante fenômeno relacionado com o aumento da expressão de genes envolvidos em processos fisiológicos e patológicos, como: regulação de processos cognitivos (genes diretamente envolvidos na memória do medo) (PARK; REHRAUER; MANSUY, 2013), reparo tecidual de feridas em pele (NASCIMENTO-FILHO; SILVEIRA; GOLONI-BERTOLLO; DE SOUZA *et al.*, 2020), lúpus eritematoso sistêmico (LEUNG; SHI; MAURER; SONG *et al.*, 2015), nos efeitos colaterais do uso de metanfetamina (CADET; JAYANTHI; MCCOY; LADENHEIM *et al.*, 2013), carcinogênese de pulmão (VAN DEN BROECK; BRAMBILLA; MORO-SIBILOT;

LANTUEJOUL *et al.*, 2008; ZHANG; LIU; LIU; ZHANG *et al.*, 2019), progressão e invasão no câncer gástrico (JIE; WU; GAO; LI *et al.*, 2020). Nesse trabalho foi avaliada, pela primeira vez, a expressão de H4K5 acetilada (H4K5Ac) em ENN, LB e CEB.

2.3 LEUCOPLASIA BUCAL (LB)

A leucoplasia bucal (LB), eritroplasia, eritroleucoplasia, fibrose submucosa oral, lesões palatais em fumantes reversos, líquen plano oral, reações liquenoides orais, doença do enxerto contra o hospedeiro, lúpus eritematoso oral e algumas condições hereditárias como disceratose congênita e epidermólise bolhosa são consideradas DBPMs (TAKATA; SLOOTWEG, 2017; WARNAKULASURIYA, 2018), sendo a leucoplasia a lesão mais comum (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018).

Leucoplasia bucal é um termo exclusivamente clínico que define uma condição caracterizada por presença de placa branca de risco de malignização questionável, excluídas outras DBPM e outras condições, como as hiperkeratoses friccionais (TAKATA; SLOOTWEG, 2017; WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). A LB pode ocorrer em qualquer local da cavidade bucal, geralmente é assintomática e raramente ocorre nas duas primeiras décadas de vida. Seu diagnóstico clínico é baseado principalmente na inspeção visual e palpação. Quanto à sua apresentação clínica, pode ser considerada homogênea quando se observa placa de coloração branca de superfície lisa ou levemente rugosa e não-homogênea quando apresenta áreas vermelhas em meio à placa branca e superfície irregular ou rugosa. Os achados histopatológicos variam desde a presença de hiperkeratose e acantose epitelial sem displasia, diferentes graus de displasia epitelial, até alterações características de carcinoma epidermoide (CARRARD; VAN DER WAAL, 2018).

A OMS (2017) estima a prevalência global de LB entre 3-4% da população (TAKATA; SLOOTWEG, 2017), dado que foi confirmado na metanálise realizada por Mello *et al.* (2018), que mostrou estimativa de prevalência de leucoplasias de 4,11%, sendo maior entre os homens (MELLO; MIGUEL; DUTRA; PORPORATTI *et al.*, 2018). Em geral, os fatores de risco relacionados com o desenvolvimento das LB são similares aos reportados para o carcinoma epidermoide de boca (CEB), incluindo o tabagismo, etilismo, infecção pelo HPV, imunossupressão prolongada, histórico pessoal ou familiar de câncer (JAYAPRAKASH; REID; HATTON; MERZIANU *et al.*, 2011; VILLA; WOO, 2017).

Quando se trata da taxa de transformação maligna, uma revisão sistemática de estudos observacionais encontrou uma variação entre 0,13 e 34% com média de 3,5%, e mostrou que

os fatores que parecem contribuir significativamente com esse fenômeno incluem pacientes do sexo feminino, com a idade avançada (acima de 60 anos), leucoplasias não-homogêneas, tamanho da lesão excedendo 200 mm² e maior severidade da displasia epitelial (DE) (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Em 2020, uma metanálise mostrou uma média geral de taxa de transformação maligna de LB em CEB estimada em 9,7%, com razão de chance de ocorrência maior em homens. Neste último estudo, a avaliação do risco relacionado com a classificação histológica de displasias epiteliais (DE) não foi considerado, devido à heterogeneidade dos dados relatados (PINTO; CARAMES; FRANCISCO; CHEN *et al.*, 2020). A maioria dos autores concorda que a LB é uma condição crônica e persistente e que a evolução para a malignidade, quando presente, acontece entre 11 e 132 meses após o diagnóstico e a maioria dos artigos cita a língua como local mais comum para transformação maligna (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018).

O sistema clássico de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicado em 2005 (BARNES; EVESON; REICHART; SIDRANSKY, 2005), dividiu as DE em displasia leve (lesão na qual as alterações arquitetônicas e citológicas são limitadas ao terço inferior do epitélio), displasia moderada (alterações que envolvem até dois terços da espessura total do epitélio) e displasia severa (exibe alterações mais acentuadas, que podem se estender além dos dois terços inferiores do epitélio). Em 2017, a OMS equiparou o carcinoma *in situ* à displasia epitelial severa. Nesse mesmo momento a OMS apresentou novidades, passando a apoiar também o sistema binário de classificação (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). Esse sistema divide as lesões em “alto risco” e “baixo risco” com base no número de características identificadas no exame histológico. As lesões de alto risco mostram pelo menos quatro características arquitetônicas e cinco características citológicas, enquanto as lesões de baixo risco mostram menos alterações (Quadro 1). Kujan e colaboradores (KUJAN; KHATTAB; OLIVER; ROBERTS *et al.*, 2007; KUJAN; OLIVER; KHATTAB; ROBERTS *et al.*, 2006) demonstraram que o sistema binário mostrou confiabilidade superior e maior concordância intra e interobservadores em comparação com o sistema de classificação clássico da OMS.

Quadro 1. Critérios arquiteturais e citológicos para classificação de DE.

<i>Critérios arquiteturais</i>	<i>Critérios citológicos</i>
<i>1. Estratificação epitelial irregular</i>	<i>1. Variação anormal no tamanho dos núcleos</i>
<i>2. Perda da polaridade das células basais</i>	<i>2. Variação anormal no formato dos núcleos</i>
<i>3. Projeções epiteliais em forma de gota</i>	<i>3. Variação anormal no tamanho das células</i>
<i>4. Aumento do número de figuras de mitose</i>	<i>4. Variação anormal no formato das células</i>
<i>5. Mitoses superficiais anormais</i>	<i>5. Aumento da razão núcleo-citoplasma</i>
<i>6. Disceratose</i>	<i>6. Figuras de mitose atípicas</i>
<i>7. Pérolas de ceratina</i>	<i>7. Aumento do número e tamanho dos nucléolos</i>
<i>8. Perda de coesão entre as células epiteliais</i>	<i>8. Hiperchromatismo</i>

Fonte: OMS, 2017 (TAKATA; SLOOTWEG, 2017).

Nota-se que a presença de DE está relacionada com a progressão para o câncer e a severidade da displasia está diretamente relacionada à probabilidade da progressão maligna, porém leucoplasias sem displasia epitelial também podem sofrer essa transformação (DOST; LE CAO; FORD; ADES *et al.*, 2014; WARNAKULASURIYA; REIBEL; BOUQUOT; DABELSTEEN, 2008).

Um dos grandes desafios da prática clínica é o manejo das leucoplasias apresentando diferentes intensidades de displasia epitelial (MEHANNA; RATTAY; SMITH; MCCONKEY, 2009). Alguns potenciais marcadores para a avaliação da progressão maligna tem sido estudados, como MMP9 (JORDAN; MACABEO-ONG; SHIBOSKI; DEKKER *et al.*, 2004), Survivin (LO MUZIO; PANNONE; LEONARDI; STAIBANO *et al.*, 2003), aumento do teor de DNA e perda da heterozigose (SMITH; RATTAY; MCCONKEY; HELLIWELL *et al.*, 2009), porém são necessários mais estudos confirmatórios e enquanto isso a gradação histológica é o padrão ouro no manejo dessas lesões (WARNAKULASURIYA; REIBEL; BOUQUOT; DABELSTEEN, 2008).

2.4 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA (CEB)

O CEB é o tumor maligno mais comum em cabeça e pescoço, representando 90% dos casos de câncer da cavidade bucal (TANDON; DADHICH; SALUJA; BAWANE *et al.*, 2017). A OMS prevê a ocorrência de 657.000 novos casos de câncer da cavidade bucal e orofaringe (com mais de 330.000 mortes) a cada ano, e uma incidência global de 4 casos a cada 100.000 pessoas, para o câncer de lábio e cavidade bucal (WHO, 2020). Para o Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 15.190 novos casos para 2020, sendo 11.180 em homens e 4.010 em mulheres (INCA, 2020). O CEB apresenta alta mortalidade e baixa taxa de cura, com

grande impacto individual e socioeconômico, tornando-o um problema de saúde pública (HEMA; SMITHA; SHEETHAL; MIRNALINI, 2017).

O tabagismo continua sendo considerado o maior fator de risco para o CEB, sendo dose-dependente, seguido do etilismo crônico e da associação de ambos os fatores. Além disso, a dieta deficiente, condição imune precária, infecção por HPV, condições hereditárias e exposição ocupacional também se apresentam como fatores que influenciam na iniciação e progressão da carcinogênese (CHI; DAY; NEVILLE, 2015).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do CEB e câncer de orofaringe, a taxa de sobrevida global média gira em torno de 54%, mostrando variações conforme a localização do tumor, sendo menor que 50% para tumores em base de língua e orofaringe. A sobrevida também está relacionada com a classificação TNM do tumor, tipo de tratamento realizado e é especialmente reduzida em tumores avançados, salientando a importância do diagnóstico precoce (JEHN; DITTMANN; ZIMMERER; STIER *et al.*, 2019).

Para que seja estabelecida a conduta frente ao CEB, juntamente com as características histológicas/biológicas do tumor, sua localização, idade do paciente e sua condição sistêmica, é necessário determinar a classificação TNM (UICC, 2019), que leva em conta o tamanho do tumor primário – T(Quadro 2), envolvimento regional de linfonodos – N (Quadro 3) e a presença ou não de metástases à distância (Quadro 4).

Quadro 2. Classificação TNM- Tumor primário

<i>T – TUMOR PRIMÁRIO</i>	
<i>Tx</i>	<i>Tumor primário não pode ser avaliado</i>
<i>T0</i>	<i>Não há evidência de tumor primário</i>
<i>Tis</i>	<i>Carcinoma in situ</i>
<i>T1</i>	<i>Tumor ≤ 2 cm e PI ≤ 5 mm</i>
<i>T2</i>	<i>Tumor ≤ 2 cm e PI ≥ 5 mm ou 4 cm ≤ Tumor ≤ 2 cm e PI ≤ 10 mm</i>
<i>T3</i>	<i>4 cm ≤ Tumor ≤ 2 cm e PI ≥ 10 mm ou Tumor ≥ 4 cm e PI ≤ 10 mm</i>
<i>T4a</i>	<i>Tumor ≥ 4 cm e PI ≥ 10 mm ou tumor invade cortical óssea da mandíbula ou maxila ou tumor envolve seio maxilar ou tumor invade pele da face</i>
<i>T4b</i>	<i>Tumor invade espaço mastigatório, lâminas pterigoides ou base de crânio ou envolve artéria carótida interna</i>

PI: Profundidade de invasão

*Erosão superficial apenas do osso/alvéolo dental não é suficiente para classificar um tumor como T4a

Fonte: Tradução de Brierley et al. (2017) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017)

Esta classificação sofreu modificações em 2016, adicionando ao critério T a profundidade de invasão (PI), e ao critério N a extensão extranodal e foi agrupada em estágios que refletem

a extensão da doença e a propagação metastática (Quadro 5) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017).

Quadro 3. Classificação TNM- Linfonodos metastáticos regionais

<i>N – LINFONODOS REGIONAIS</i>	
<i>NX</i>	<i>Linfonodos regionais não podem ser avaliados</i>
<i>N0</i>	<i>Não há evidência de linfonodos regionais metastáticos</i>
<i>N1</i>	<i>Metástase em um único linfonodo ipsilateral ≤ 3 cm, sem extensão extranodal</i>
<i>N2</i>	<i>Metástase descrita como:</i>
<i>N2a</i>	<i>Em um único linfonodo ipsilateral ≥ 3 cm e ≤ 6 cm sem extensão extranodal</i>
<i>N2b</i>	<i>Em múltiplos linfonodos ipsilaterais ≤ 6 cm sem extensão extranodal</i>
<i>N2c</i>	<i>Em linfonodos bilaterais ou contralateral ≤ 6 cm sem extensão extranodal</i>
<i>N3a</i>	<i>Metástase em linfonodo ≥ 6 cm sem extensão</i>
<i>N3b</i>	<i>Metástase em um único ou múltiplos linfonodos com extensão extranodal clínica</i>

*A presença de envolvimento de pele ou invasão de tecido mole com fixação/adesão profunda ao músculo ou estruturas adjacentes ou sinais clínicos de envolvimento de nervos é classificado como extensão extranodal clínica

*Linfonodos mediais são considerados ipsilaterais

Fonte: Tradução de Brierley et al. (2017) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017)

Quadro 4. Classificação TNM- Metástases à distância

<i>M – METÁSTASES DISTANTES</i>	
<i>M0</i>	<i>Não há metástase distantes</i>
<i>M1</i>	<i>Presença de metástase distante</i>

Fonte: Tradução de Brierley et al. (2017) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017).

A OMS (2017) descreve que, de acordo com a sua histopatologia, o CEB pode ser classificado como bem diferenciado quando apresenta ninhos ilhas e cordões de volumosas células com citoplasma róseo, pontes intercelulares proeminentes, núcleos arredondados que podem ou não apresentar hipercromatismo, presença marcante de disceratose e pérolas de ceratina. A observação de pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear e figuras de mitose, inclusive atípicas, são mais frequentes em casos menos diferenciados (moderadamente e pouco diferenciados), bem como o fronte de invasão tende a mostrar-se em pequenas ilhas, finos cordões e até células individuais. Em CEBs pouco diferenciados a perda do fenótipo epitelial das células neoplásicas pode ser tão importante a ponto de exigir o uso de marcadores epiteliais proteicos para confirmação do diagnóstico (TAKATA; SLOOTWEG, 2017).

Quadro 5. Estadiamento Clínico

ESTÁGIOS			
<i>Estágio 0</i>	<i>Tis</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Estágio I</i>	<i>T1</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Estágio II</i>	<i>T2</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Estágio III</i>	<i>T3</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
	<i>T1, T2, T3</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>
<i>Estágio IVA</i>	<i>T4a</i>	<i>N0, N1</i>	<i>M0</i>
	<i>T1, T2, T3, T4a</i>	<i>N2</i>	<i>M0</i>
<i>Estágio IVB</i>	<i>Qualquer T</i>	<i>N3</i>	<i>M0</i>
	<i>T4b</i>	<i>Qualquer N</i>	<i>M0</i>
<i>Estágio IVC</i>	<i>Qualquer T</i>	<i>Qualquer N</i>	<i>M1</i>

Fonte: Tradução de Brierley et al. (2017) (BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017).

A gradação histopatológica, isoladamente, não pode ser correlacionada com o prognóstico, sendo necessário avaliar outras características importantes como a presença de dissociação celular (perda de coesão) e também o crescimento invasivo ativo do CEB (NEVILLE; DAY, 2002). Os biomarcadores podem representar maior especificidade no diagnóstico e prognóstico, orientando um tratamento personalizado e consequentemente, maior taxa de sucesso no tratamento da doença. Revisões sistemáticas mostraram diversas pesquisas com potenciais biomarcadores de relevância para o prognóstico do CEB (p53, Ki67, p16, VEGF, HIF1A, entre outros), porém ainda não foram alcançadas as validações necessárias para serem considerados efetivamente como biomarcador prognóstico (ALMANGUSH; HEIKKINEN; MÄKITIE; COLETTA *et al.*, 2017; RIVERA; OLIVEIRA; COSTA; DE ROSSI *et al.*, 2017). Modificações epigenéticas, que estão sendo investigadas em diversos tipos de câncer, inclusive no CEB (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017), parecem fornecer biomarcadores valiosos e podem atuar como uma impressão digital molecular de malignidades (LINGEN; PINTO; MENDES; FRANCHINI *et al.*, 2011).

Observando a importância de aprofundar os conhecimentos sobre a relação das modificações de histonas com a carcinogênese bucal e a possibilidade de investigar biomarcadores epigenéticos de prognóstico do CEB, este trabalho avaliou a imunexpressão das enzimas HDAC1, HDAC2, HAT1 e também a imunexpressão do H4K5ac (marcador da acetilação da lisina 5, histona H4, acetilada pela HAT1 e desacetilada pela HDAC1) (KIM, 2014; ZHOU; ZHOU; LENZMEIER; ZHOU, 2009) em amostras de carcinoma epidermoide de boca (CEB), leucoplasias bucais (LB) e epitélio não-neoplásico (ENN).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos esforços contínuos para identificar marcadores moleculares para detecção precoce do CEB e também para desenvolver tratamentos mais eficientes, a sobrevida e o prognóstico geral dos pacientes com câncer de boca permanecem insatisfatórios. As células malignas exibem redes genéticas e epigenéticas defeituosas formadas por complexos alterados, que surgem em diferentes partes dos tecidos tumorais e sustentam o comportamento autônomo das células, que acabam por levar ao desenvolvimento do tumor. Evidências científicas acumuladas sugerem que alterações epigenéticas, incluindo as modificações de histonas, estão frequentemente envolvidas na carcinogênese oral, principalmente na progressão do tumor e resistência à terapia. O comprometimento da atividade de HATs ou a expressão gênica aberrante de HDACs estão comprovadamente associados ao processo de carcinogênese e progressão de tumores.

Assim, o conhecimento do padrão de expressão das enzimas relacionadas às modificações epigenéticas tem se tornado cada vez mais importante. Mais especificamente, a investigação da expressão de histonas desacetilases 1 e 2, histona acetiltransferase 1 e do produto da acetilação da lisina 5 da histona H4 na LB e no CEB visa a aquisição de maior conhecimento sobre os processos de iniciação e progressão do CEB, bem como seu prognóstico. Os resultados obtidos a partir desta pesquisa levarão a um maior entendimento da epigenética na carcinogênese bucal e este pode ser o primeiro passo para a realização de estudos mais avançados.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o número de registro CAAE: 16098619.5.0000.0121 e número do parecer: 3.496.064, em agosto de 2019.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo realizado foi de natureza básica, observacional, analítico e transversal. Os resultados foram avaliados de forma quantitativa.

4.3 AMOSTRA

As amostras de tecidos foram selecionadas, por conveniência, do arquivo de casos do LPB-UFSC, a partir de pacientes que foram atendidos no HU/UFSC/EBSERH no período de 2007 a 2019. A amostra foi composta por um total de 122 pacientes, sendo 41 casos de carcinoma epidermoide de boca (CEB), todos provenientes de biópsias incisionais, 49 casos de leucoplasia bucal (LB) e 32 casos de epitélio não neoplásico (ENN), em que foram utilizadas amostras de mucosa bucal com epitélio íntegro provenientes de hiperplasia fibrosa e com pouco ou nenhum infiltrado inflamatório.

Os casos de CEB foram subdivididos em 3 subgrupos conforme a gradação histopatológica e o LB em 3 subgrupos conforme o grau de displasia (sistema clássico) e em 2 subgrupos conforme o risco de transformação maligna (classificação binária), ambos de acordo com a OMS, 2017.

4.3.1 Critérios de Inclusão

- Casos diagnosticados clinicamente como LB e com diagnóstico histopatológico de displasia epitelial leve, moderada ou severa;
- Casos com diagnóstico histopatológico de CEB com localização intrabucal (excluindo CEB de lábio);
- Pacientes maiores de 18 anos de idade e que aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

4.3.2 Critérios de Exclusão

- Casos em que houve discordância entre os examinadores quanto ao diagnóstico histopatológico, mesmo após revisão;
- Espécimes em que não foi possível a execução de todas as etapas referente à preparação histológica e à técnica de imuno-histoquímica;
- Pacientes que optaram por não assinar o TCLE;
- Pacientes menores de 18 anos de idade.

4.3.3Obtenção dos TCLEs

Os pacientes com diagnóstico de LB e CEB foram convidados a participar da pesquisa. Nos casos de pacientes em que não foi possível o contato presencial, procedeu-se ao contato telefônico. Aqueles que aceitaram participar receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A) pessoalmente ou por e-mail, para que sinalizassem concordância.

Para os casos de Hiperplasia Fibrosa, nos quais foram avaliados os ENN, utilizou-se amostras já arquivadas no Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (registro no CONEP B-051). O TCLE do referido Biobanco encontra-se no Anexo A. Foram utilizadas por conveniência, somente amostras de pacientes que optaram por não serem contatados a cada nova pesquisa, conforme opção disponível no TCLE (“novas pesquisas realizadas com o material biológico cedido poderão ser realizadas SEM a necessidade de minha aprovação para uso em cada uma delas”).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina foram analisadas simultaneamente por dois examinadores (ES e FM) utilizando microscópio multiobservador. Os casos de LB foram classificados de acordo com a classificação clássica da OMS (displasia epitelial leve, moderada ou intensa) e de acordo com a classificação binária adotada pela OMS em 2017 (baixo risco e alto risco), pelos dois examinadores, em consenso, bem como foi determinado o grau de diferenciação histopatológica dos CEB (bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado), também seguindo os critérios estabelecidos pela OMS (2017) (TAKATA; SLOOTWEG, 2017).

4.5 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os procedimentos para a realização da técnica de imuno-histoquímica foram realizados no Laboratório de Pesquisas do Programa de Pós-graduação em Odontologia - UFSC. Foi empregada a reação de imuno-histoquímica pelo método do polímero conjugado HRP, para avaliação quantitativa dos antígenos HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac.

Para cada antígeno foi obtido um corte tecidual de 3 µm de espessura dos blocos de parafina. Tais secções foram distendidas em lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona, e levadas à estufa a 60°C por 12 horas (*overnight*). Em seguida os cortes sofreram desparafinização em xilol e reidratação em uma sequência decrescente de etanol constituída por cinco passagens de cinco minutos cada, começando pelo etanol absoluto (I, II e III), seguida pelo etanol 95% e etanol 85%. As lâminas foram posteriormente submetidas a 2 banhos de 5 minutos em água destilada.

A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 6% em metanol na proporção de 1:3, em 2 banhos de 20 minutos, em câmara escura. Seguiu-se com um banho em tampão de PBS (*Phosphate-buffered saline*) por 5 minutos e lavagem de 5 minutos em água destilada. Para a recuperação dos sítios antigênicos realizou-se o tratamento dos cortes teciduais com tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em banho-maria por 40 minutos à 96°C. Aguardou-se o resfriamento por aproximadamente 30 minutos (ou até atingir a temperatura ambiente) seguidos de 2 banhos de 5 minutos em tampão PBS. O bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com leite em pó desnatado 5% em solução tampão PBS, à temperatura ambiente, durante 60 minutos, seguido de 2 banhos de 5 minutos em PBS. A seguir os cortes foram incubados com anticorpos primários anti-HDAC1, anti-HDAC2, anti-HAT1 e anti-H4K5Ac (Quadro 6), em câmara úmida, na geladeira a 2°C, *overnight*. Na sequência realizou-se 2 banhos de 5 minutos em PBS. Então, as amostras foram incubadas com o kit de anticorpo secundário *EnVision* (*Dako Corporation*, Carpinteria, CA, EUA) à temperatura ambiente por 60 min, para as reações de anti-HDAC1, anti-HDAC2 e anti-H4K5Ac. Já para as reações com anti-HAT1, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário anti-cabra de frango em diluição 1:500 (*Santa Cruz Biotechnology*, Santa Cruz, CA, EUA) por 60 minutos e após, com anticorpo terciário *VectaStain ABC* (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, EUA) por 45 min, a temperatura ambiente.

Quadro 6. Descrição dos anticorpos utilizados.

<i>Anticorpo</i>	<i>Clone</i>	<i>Origem</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Controle Positivo</i>
<i>Anti-HDAC1</i>	H-51	Policlonal de coelho	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:50	Placenta
<i>Anti-HDAC2</i>	H-54	Policlonal de coelho	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:80	Placenta
<i>Anti-HAT1</i>	C-20	Policlonal de cabra	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:500	Placenta
<i>Anti-H4K5Ac</i>	D12B3	Monoclonal de coelho	<i>Cell Signalling</i>	1:3000	Carcinoma de colo uterino

A revelação da reação ocorreu pela incubação com o cromógeno diaminobenzidina (DAB+*Substrate Chromogen System*®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) por 2 minutos. Após, lavagem em água destilada por 5 minutos, a contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, por 3 minutos e então lavados em água corrente até a remoção do excesso do corante. A remoção do pigmento formólico procedeu-se com 3 rápidas imersões em hidróxido de amônio a 1%, seguida de lavagem em água corrente por 2 minutos.

Por fim realizou-se a desidratação da amostra com a sequência crescente de etanol, subsequente diafanização com 2 banho de 20 minutos em xilol e montagem da lâmina com Entellan® (MERCK, Darmstadt, Germany).

Espécimes de tecido de placenta foram utilizados em cada bateria de reação como controle positivo da imunorreatividade para HDAC1, HDAC2 e HAT1, e tecido proveniente de carcinoma de colo de útero para o anti-H4K5Ac. O controle negativo da reação foi obtido pela omissão do anticorpo primário.

4.6 AVALIAÇÃO DA IMUNORREATIVIDADE

As lâminas tiveram sua identificação mascarada de forma que a captura das imagens e a análise da imunorreatividade foi feita por um examinador (ES) às cegas quanto ao grupo a que cada lâmina pertence. Foram capturados cinco campos equidistantes de cada espécime, em aumento de 400x por meio de microscópio óptico binocular (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (A620, Cannon, Lake Success, NY, USA) e a um microcomputador (HP Compaq 6005, São Paulo, Brasil), onde foram armazenadas as imagens. A escolha dos campos foi padronizada de maneira que se localizassem de forma equidistante entre si. Para os casos de LB e ENN, sempre que possível, os campos envolveram toda a extensão do epitélio (Figura 3).

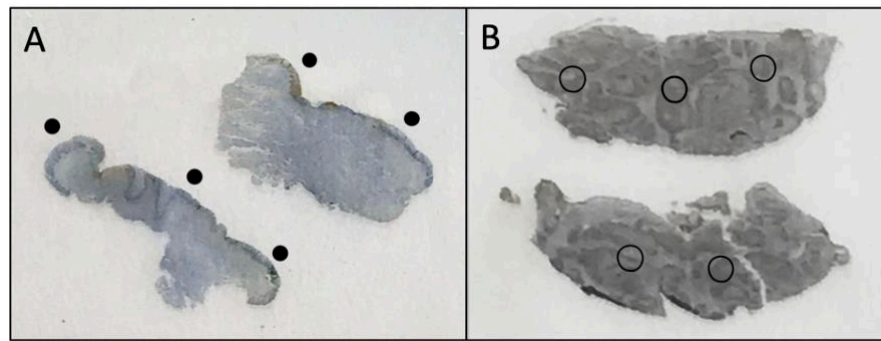


Figura 3. Cortes histológicos observados a olho nu, representando a marcação dos espécimes para captura das fotomicrografias. A) Corte de LB (pontos). B) Corte de CEB (áreas circuladas)

Para avaliação, foi empregado o software para análise de imagens digitalizadas *ImageJ* versão 1.41o (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Os núcleos corados em marrom (células positivas), independentemente da intensidade, e em azul (células negativas) foram manualmente contados, pela pesquisadora ES, por meio do software, totalizando ao menos 500 células por caso. Então, foi determinada a proporção de células com núcleos positivos em relação ao total de células contadas para cada amostra, expressas em porcentagem.

4.7 CALIBRAÇÃO DO EXAMINADOR

Previamente à análise, o examinador ES, responsável pela avaliação imuno-histoquímica, foi submetido a uma calibração, analisando 30 fotos escolhidas aleatoriamente, com intervalo de uma semana entre cada análise. Os resultados foram comparados para determinação do índice de correlação intraclassas, obtendo o valor de 0,86 (considerado satisfatório acima de 0,8).

4.8 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

Para os casos de LB foram coletados os seguintes dados do prontuário: sexo, idade, etnia, hábitos (tabagismo e etilismo), localização da lesão, data do diagnóstico, datas das consultas de acompanhamento e ocorrência, ou não, de transformação maligna. Para os casos de CEB, além dos dados citados anteriormente, foram coletados: classificação TNM, data de recidiva e/ou metástase e data de óbito (caso houvesse). Já para os pacientes diagnosticados com hiperplasias fibrosas, grupo que representa o ENN, foram coletados os dados disponíveis na ficha de biópsia (sexo, idade e hábitos) que acompanha o material doado para o Biobanco. Todos dados foram organizados e tabulados em planilhas do Excel® para posterior análise estatística.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, dentro de cada grupo. Pelo fato de alguns dos grupos apresentarem distribuição não-normal foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn (quando necessário), para analisar a comparação da imunorreatividade entre os três grupos e subgrupos (formados a partir da classificação histológica da LB e CEB). Para comparar os dois subgrupos (LB) decorrentes da classificação binária (baixo risco e alto risco) e para comparar se houve diferença na expressão dos anticorpos conforme o prognóstico nos pacientes de CEB foi aplicado o teste de Mann-Whitney. A correlação entre imunoexpressão das proteínas dentro dos grupos foi analisada por meio da correlação de Spearman. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do software Action Stat versão 3.7 (Estatcamp, São Carlos-SP, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

As características clínicas e demográficas dos pacientes envolvidos no estudo são mostradas na Tabela 1.

Tabela1. Características clínicas e demográficas dos pacientes.

Características clínicas/demográficas	Epitélio não-neoplásico n=32	Leucoplasia Bucal n=49	Carcinoma epidermoide n=41	Total
Idade (Média± Desvio padrão)	51,81(±12,78)	56,85(±12,78)	58,87(±9,30)	56,21(±11,98)
Sexo				
Masculino	48,4%	52%	95%	64,8%
Feminino	51,6%	48%	5%	35,2%
Etnia				
Leucoderma	77,5%	85,4%	54,9%	75,4%
Melanoderma	5%	4,2%	3,2%	4%
Feoderma	10%	6,2%	16,1%	9,9%
Desconhecida	7,5%	4,2%	25,8%	10,7%
Tabagismo				
Tabagistas e ex-tabagistas	ND	69,4%	77,5%	72,2%
Não-tabagista	ND	24,5%	5%	16,7%
Desconhecido	ND	6,1%	17,5%	11,1%
Etilismo				
Etilista	ND	28,6%	14,6%	44,5%
Não-etilista	ND	65,3%	63,4%	42,2%
Desconhecido	ND	6,1%	22%	13,3%
Localização da lesão				
Língua/Soalho	ND	53,1%	61%	56,7%
Palato	ND	16,3%	4,9%	11,1%
Outras localizações	ND	30,6%	34,1%	32,2%
Transformação maligna				
Sim	NA	4,1%	NA	4,1%
Não	NA	61,2%	NA	61,2%
Desconhecido	NA	34,7%	NA	34,7%
TNM				
I/II	NA	NA	22%	22%
III/IV	NA	NA	14,6%	14,6%
Desconhecido	NA	NA	63,4%	63,4%
Metástase				
Sim	NA	NA	7,3%	7,3%
Não	NA	NA	12,2%	12,2%
Desconhecido	NA	NA	80,5%	80,5%
Óbito				
Sim	NA	NA	4,9%	4,9%
Não	NA	NA	2,4%	2,4%
Desconhecido	NA	NA	92,7%	92,7%

ND: Dado não disponível; NA: Não se aplica.

Observou-se que a idade média geral dos pacientes foi de 56,21 (±11,98), estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis). Houve predomínio de pacientes de etnia leucoderma e do sexo masculino tanto para LB quanto CEB. A maioria dos pacientes com LB

e CEB declararam o hábito do tabagismo, o que não se repetiu para o etilismo. A língua e assoalho bucal foram os locais mais acometidos pelas duas lesões. A transformação maligna foi relatada em 2 dos 49 casos de LB (4,1%). Em um grande número de casos não foi possível obter informações sobre o estadiamento TNM, ocorrência de metástase e óbito dos pacientes com CEB, o que pode ser explicado, em parte, pelo fato de que o HU-UFSC/EBSERH não possui serviço de radioterapia e quimioterapia de cabeça e pescoço. Contudo, observou-se que 3 pacientes apresentaram sobrevida livre de doença maior que 5 anos, o que é considerado como bom prognóstico (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017), 3 pacientes tiveram metástase e 2 foram a óbito antes de 5 anos, caracterizando um prognóstico ruim.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A imunoposição de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac no ENN, LB e CEB está ilustrada na Figura 4. Houve diferença estatística na comparação entre os grupos ENN e LB para os marcadores HDAC2 e H4K5Ac e na comparação da expressão do marcador H4K5Ac entre os grupos ENN e CEB. A porcentagem de expressão dos marcadores é demonstrada na tabela 2 e figura 5.

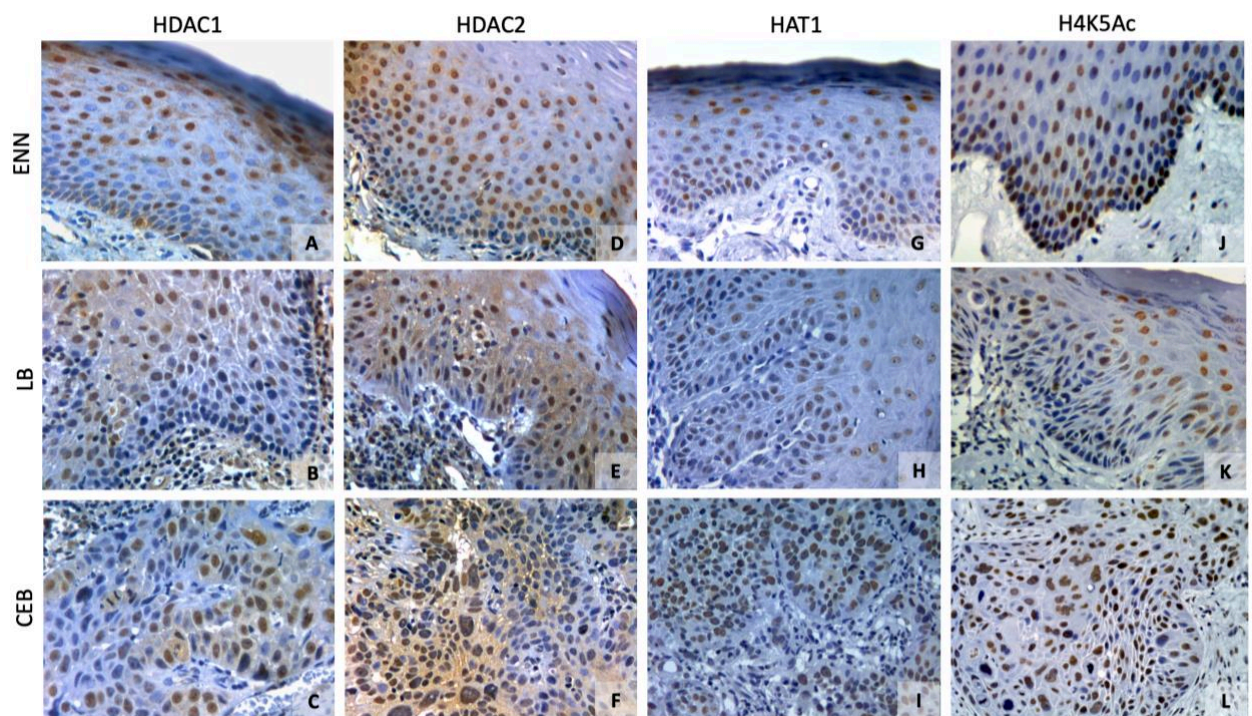


Figura 4. Expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac em epitélio não neoplásico (ENN), leucoplasia bucal (LB) e carcinoma epidermoide de boca (CEB) (Aumento de 400x). A-L: Imunomarcção nuclear dos marcadores em células de ENN, LB e CEB.

Tabela 2. Expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo (mediana e amplitude interquartis (AI)).

	ENN n=32	LB n=49	CEB n=41	Valor de p
HDAC1	57,52 (36,68)	67,54 (34,70)	73,13 (35,95)	0,09
HDAC2	50,67 (37,37) ^a	72,69 (37,91) ^a	61,05 (35,91)	0,04*
HAT1	50,69 (45,91)	53,40 (40,26)	59,73 (50,58)	0,47
H4K5Ac	70,65 (25,83) ^{ab}	81,92 (25,09) ^a	85,69 (20,29) ^b	0,005*

ENN: Epitélio não-neoplásico; LB: Leucoplasia Bucal; CEB: Carcinoma epidermoide de boca; AI: Amplitude interquartis.

*Diferença estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis)

^{a,b}Letras iguais evidenciam diferença estatisticamente significativa (Teste de comparações múltiplas)

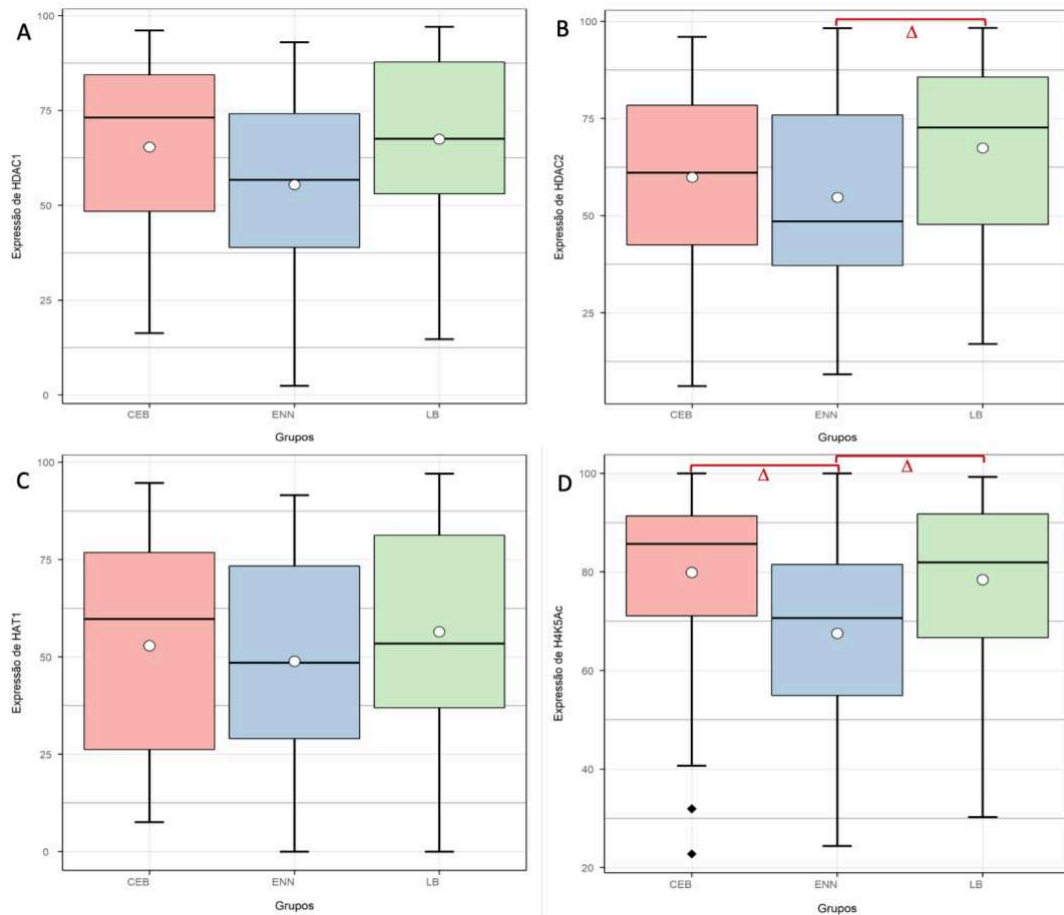


Figura 5. Gráfico boxplot representando a expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo. (A) Expressão de HDAC1; (B) Expressão de HDAC2, mostrando diferença estatisticamente significativa entre CEB e ENN ($p < 0,05$); (C) Expressão de HAT1; (D) Expressão de H4K5Ac, mostrando diferença estatisticamente significativa entre CEB e ENN e entre ENN e LB ($p < 0,05$). \blacklozenge *Outlier*; \blacktriangle diferença estatística entre dois grupos.

O grupo LB, subdividido de acordo com o sistema clássico da OMS, apresentou 22 casos de displasia epitelial leve (DEL), 16 casos de displasia epitelial moderada (DEM) e 11 casos de displasia epitelial intensa (DEI). A comparação da imunorreatividade entre eles mostrou

diferença estatisticamente significativa na expressão de H4K5Ac entre a DEL e DEM ($p=0,002$, teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn) (Tabela 3, Figura 6). Já de acordo com a classificação binária, foram encontrados 29 casos de baixo risco e 20 casos de alto risco, porém não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos de alto e baixo risco das LB (Teste de Mann-Whitney) (Tabela 4, Figura 7). Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão dos marcadores entre os grupos divididos conforme a diferenciação histopatológica dos CEB (OMS, 2017) (Teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 5, Figura 8).

Tabela 3. Imunorreatividade dos marcadores no grupo LB, conforme a classificação clássica da OMS (mediana (AI)).

	DEL n=22	DEM n=16	DEI n=11	Valor de p
HDAC1	72,68 (29,91)	58,56 (48,69)	64,97 (29,53)	p=0,36
HDAC2	80,81 (29,03)	68,94 (38,31)	72,69 (37,23)	p=0,24
HAT1	71,64 (46,91)	47,57 (37,67)	51,91 (45,09)	p=0,07
H4K5Ac	89,55 (20,29)*	73,34 (19,00)*	81,77 (27,81)	p=0,002*

DEL: Displasia epitelial leve; DEM: Displasia epitelial moderada; DEI: Displasia epitelial intensa, AI: amplitude interquartis.

*Estatisticamente significativa (Teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn)

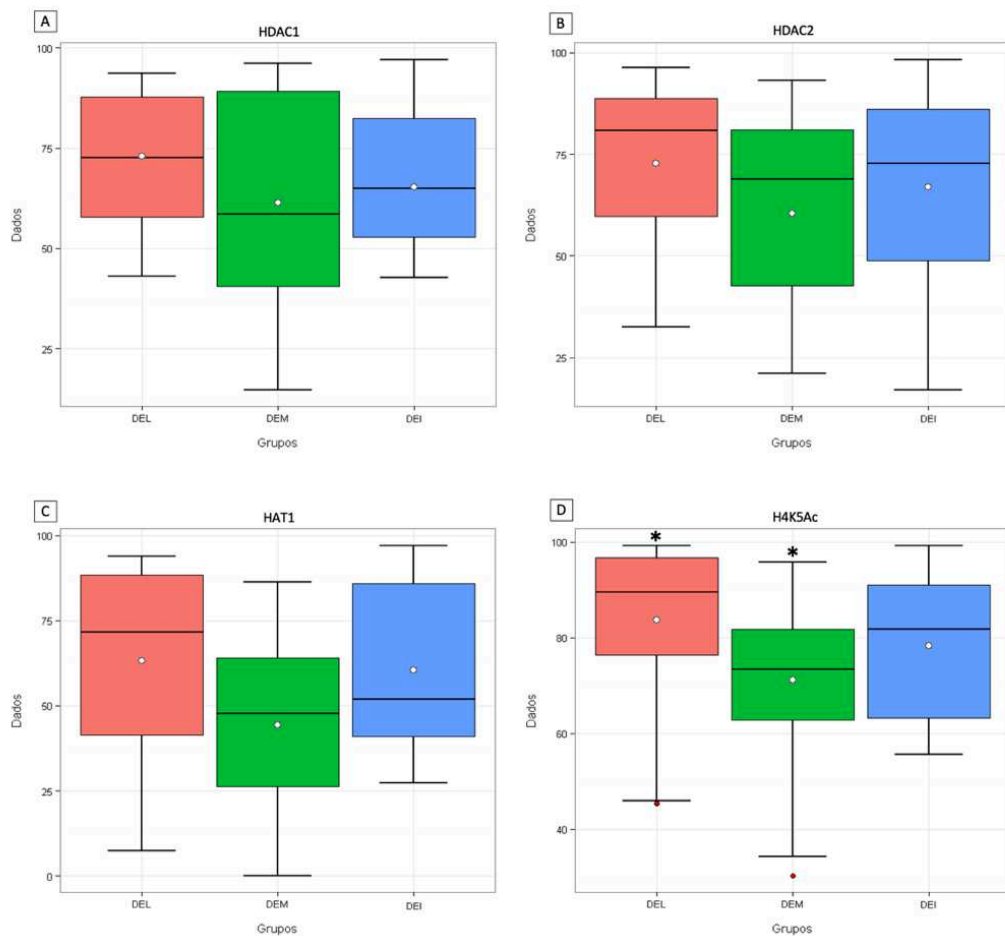


Figura 6. Imunoexpressão dos marcadores entre os subgrupos dos graus de displasia nas LB conforme o sistema clássico da OMS. DEL: Displasia epitelial leve; DEM: Displasia epitelial moderada; DEI: Displasia epitelial intensa. *Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis).

Tabela 4. Imunorreatividade dos marcadores no grupo LB, conforme a classificação binária (mediana (AI)).

	Alto risco n=20	Baixo risco n=29	Valor de p*
HDAC1	63,26(36,32)	70,13(32,83)	p=0,28
HDAC2	70,50(39,09)	76,98(31,44)	p=0,46
HAT1	48,80(47,75)	64,69(44,91)	p=0,78
H4K5Ac	74,41(21,10)	86,01(19,48)	p=0,06

AI: Amplitude interquartis.

*Teste de Mann-Whitney

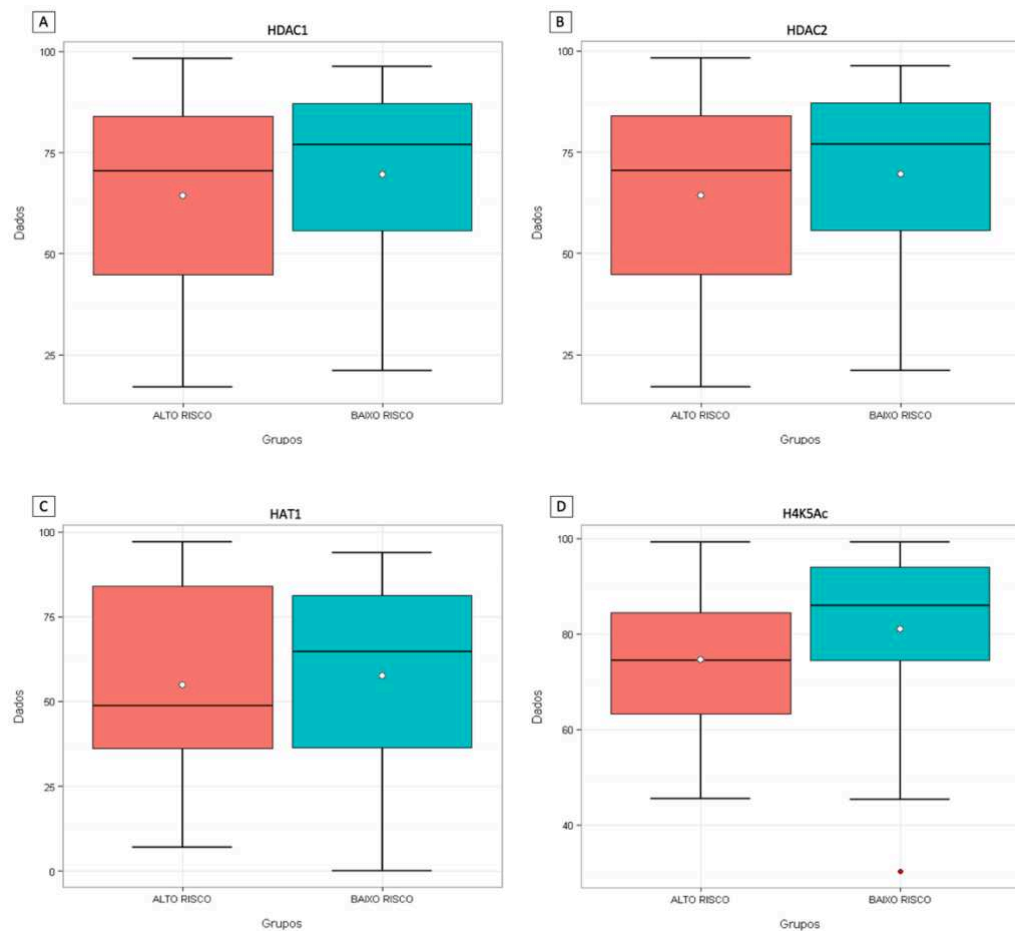


Figura 7. Imunoexpressão dos marcadores entre os subgrupos conforme a classificação binária nas LB ($p > 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

Tabela 5. Imunorreatividade dos marcadores no grupo CEB, conforme a gradação histopatológica (mediana (AI)).

	Bem diferenciado n=19	Moderadamente diferenciado n=13	Pouco diferenciado n=9	Valor de p*
HDAC1	78,85 (39,29)	72,60 (35,05)	60,15 (48,72)	p=0,24
HDAC2	67,69 (36,85)	59,97 (38,48)	48,83 (38,78)	p=0,74
HAT1	73,79 (56,84)	50,36 (40,66)	40,87 (53,10)	p=0,06
H4K5Ac	88,26 (8,98)	79,98 (35,90)	86,84 (23,21)	p=0,29

AI: Amplitude interquartis.

*Teste de Kruskal-Wallis

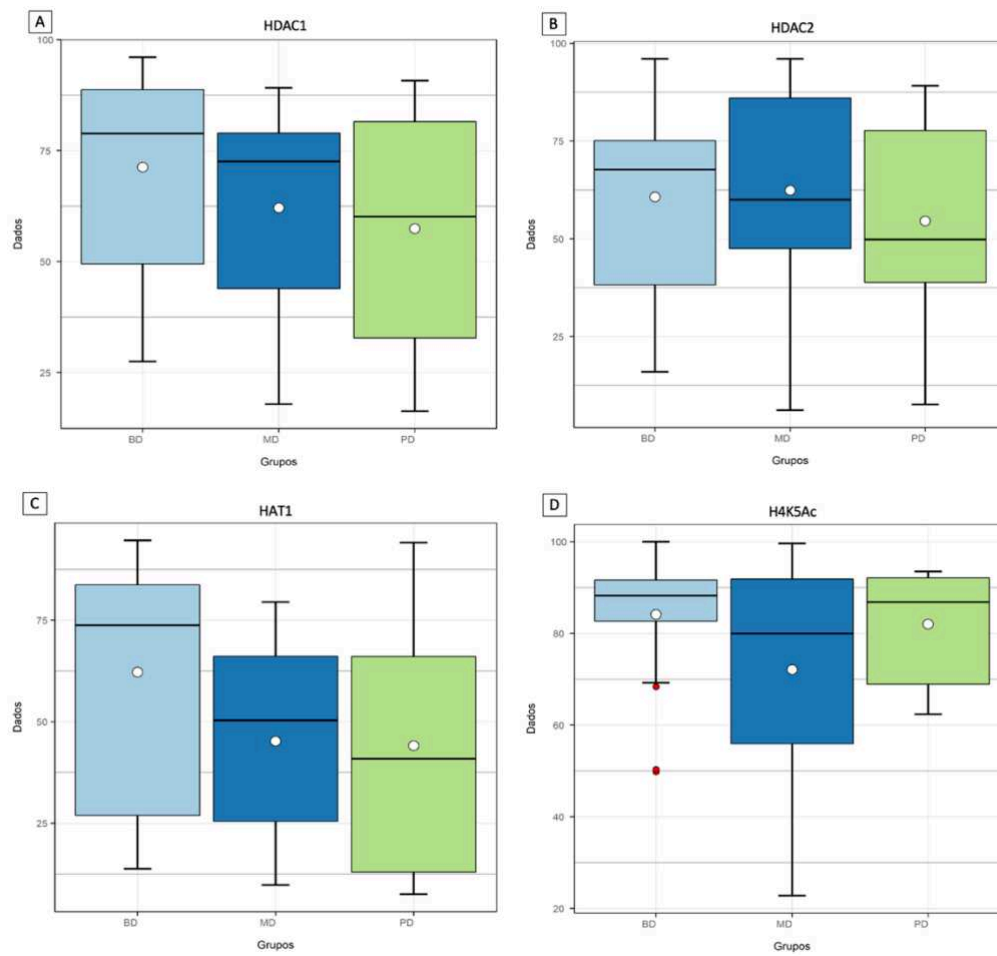


Figura 8. Imunoexpressão dos marcadores entre os subgrupos conforme a gradação histopatológica dos CEB ($p > 0,05$, Teste de Kruskal-Wallis). BD: Bem diferenciado; MD: Moderadamente diferenciado; PD: Pouco diferenciado.

A correlação entre a expressão dos marcadores dentro dos grupos foi testada através da matriz de correlação de Spearman, na qual foram observados os resultados apresentados nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6. Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores no ENN.

<i>ENN</i>	HDAC1	HDAC2	HAT1	H4K5Ac
HDAC1	1	---	---	---
HDAC2	$r_s=0,6840$	1	---	---
	$p=0,000^*$			
HAT1	$r_s=0,6641$	$r_s=0,6986$	1	---
	$p=0,000^*$	$0,000^*$		
H4K5Ac	$r_s=0,6797$	$r_s=0,6115$	$r_s=0,6048$	1
	$p=0,000^*$	$p=0,010^*$	$p=0,000^*$	

r_s = coeficiente de correlação de Spearman

* Estatisticamente significativa

Tabela 7. Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores na LB.

<i>LB</i>	HDAC1	HDAC2	HAT1	H4K5Ac
HDAC1	1	---	---	---
HDAC2	$r_s=0,7498$	1	---	---
	$p=0,000^*$			
HAT1	$r_s=0,6910$	$r_s=0,7597$	1	---
	$p=0,000^*$	$0,000^*$		
H4K5Ac	$r_s=0,5603$	$r_s=0,6168$	$r_s=0,6320$	1
	$p=0,000^*$	$p=0,010^*$	$p=0,000^*$	

r_s = coeficiente de correlação de Spearman

* Estatisticamente significativa

Tabela 8. Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores no CEB.

<i>CEB</i>	HDAC1	HDAC2	HAT1	H4K5Ac
HDAC1	1	---	---	---
HDAC2	$r_s=0,5189$	1	---	---
	$p=0,000^*$			
HAT1	$r_s=0,6095$	$r_s=0,4301$	1	
	$p=0,000^*$	$0,005^*$		
H4K5Ac	$r_s=0,4336$	$r_s=0,3735$	$r_s=0,3918$	1
	$p=0,004^*$	$p=0,016^*$	$p=0,011^*$	

r_s = coeficiente de correlação de Spearman

* Estatisticamente significativa

Foi observada correlação positiva e estatisticamente significativa entre todos os marcadores nos três grupos (ENN, LB e CEB). Considerando-se correlação fraca para $0 < r_s < 0,3$; moderada $0,3 < r_s < 0,6$ e forte $0,6 < r_s < 1$ (BARBETTA, 2012), foi observada correlação forte entre todos os marcadores no ENN. Nas LB a correlação entre H4K5Ac e HDAC1 apresentou-se moderada e as demais correlações também foram fortes. Nos CEB houve correlação forte entre HDAC1 e HAT1, porém entre os demais marcadores a correlação foi moderada.

5.3 IMUNOEXPRESSÃO E EVOLUÇÃO CLÍNICA

Dos 49 casos de LB avaliados, a evolução para CEB foi notificada em apenas 2 (4,1%). Um deles de DEI/Alto risco (paciente feminino, que negou hábitos de tabagismo e etilismo) evoluiu para CEB em 2 anos e o outro de DEL/Baixo risco (paciente masculino, tabagista e etilista) evoluiu para CEB em 4 meses, nos quais a expressão dos 4 marcadores foi maior do que a mediana nas LB.

Em apenas 8 dos 41 casos de CEB, tivemos acesso à evolução do caso com informação de acompanhamento do paciente nos primeiros cinco anos após o diagnóstico ou óbito nesse mesmo período de tempo. A tabela 9 mostra a imunomarcagem dos anticorpos conforme o prognóstico, desses pacientes. Dos pacientes em que o prognóstico foi considerado ruim, dois vieram a óbito e dois apresentaram metástase em menos de 5 anos.

Tabela 9. Imunorreatividade dos marcadores no grupo CEB, conforme o prognóstico (mediana (AI)).

Prognóstico	Bom (n=3)	Ruim (n=5)
HDAC1	89,18 (68,47)	74,59 (43,09)
HDAC2	75,08 (64,74)	55,22 (57,34)
HAT1	34,49 (60,57)	63,86 (45,30)
H4K5Ac	91,68 (14,68)	89,19 (10,06)

($p > 0,05$ (Teste de Mann-Whitney))

6 DISCUSSÃO

O reconhecimento de um grande número de substratos modificados pela acetilação sugere que a sua relação com a regulação do metabolismo tumoral é mais complexa do que se acreditava previamente. A acetilação desempenha um papel importante no metabolismo tumoral modificando diferentes substratos e principalmente proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Estudos estão sendo desenvolvidos na tentativa de entender como a acetilação modulada coordena diferentes vias metabólicas e contribui para a tumorigênese, acredita-se que esse entendimento forneça uma série de potenciais alvos para a terapia anticâncer (ZHAO; LI; CHENG; LEI, 2014). Neste trabalho, foi avaliada a expressão das proteínasificadoras de histonas: HDAC1, HDAC2 e HAT1, bem como o marcador do produto da acetilação da lisina 5 da histona H4: H4K5Ac, em carcinoma epidermoide de boca, leucoplasia bucal e epitélio não neoplásico.

O predomínio das lesões de CEB e LB foi em pacientes do sexo masculino, leucodermas e tabagistas, a maioria em região de língua e assoalho bucal, em acordo com o que está descrito pela OMS (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). A taxa de transformação maligna nas LB foi de 4,1% próximo aos 3,5% encontrados por Warnakulasuriya e Ariyawardana (2016) em sua revisão sistemática (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Observou-se sobrevida livre de doença menor que 5 anos em 37,5% dos casos, o que é compatível com o encontrado por Jehn *et al* (2019) em que a sobrevida dos pacientes com carcinoma de boca e orofaringe é menor que 50% (JEHN; DITTMANN; ZIMMERER; STIER *et al.*, 2019).

Hema *et al.* (2017), em sua revisão de literatura sobre epigenética e câncer bucal, declaram que modificações genéticas e epigenéticas podem contribuir para que mecanismos epigenéticos aberrantes sejam observados em DBPM e cânceres bucais (HEMA; SMITHA; SHEETHAL; MIRNALINI, 2017) e sugerem que, em um futuro próximo, essas variações encontradas nas células displásicas orais podem atuar como uma impressão digital molecular para doenças malignas. No presente trabalho, embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, a mediana da expressão nuclear dos marcadores HDAC1, HDAC2, HAT1 foi menor no ENN e maior na LB, sendo que o CEB apresenta imunexpressão intermediária. Para H4K5Ac as menores medidas de tendência central foram para o ENN, seguida da LB e então o CEB, permitindo supor que esses marcadores relacionados às modificações de histonas podem estar corroborando com a iniciação e progressão da carcinogênese de boca onde possivelmente esteja ocorrendo

concomitantemente a acetilação de proto-oncogenes e desacetilação de genes supressores tumorais.

A imunexpressão nuclear de HDAC2 foi significativamente maior nas LB em comparação com o ENN ($p=0,04$), o que vem ao encontro do que foi apresentado por Chang *et al.* (2009) que mostraram imunexpressão progressivamente crescente do epitélio normal para o epitélio displásico e CEB (CHANG; CHIANG; HUNG; LIN *et al.*, 2009) e Krishna *et al.* (2020) que observaram a sobre-expressão significativa de HDAC2 no tecido canceroso e pré-canceroso de boca, em relação ao tecido normal (KRISHNA; SINGH; SINGH; KUMAR *et al.*, 2020). Chrun *et al.* (2017), também encontrou maior expressão imuno-histoquímica de HDAC2 na queilite actínica (lesão potencialmente cancerizável) em comparação com o carcinoma epidermoide de lábio, sugerindo a relevância da participação da HDAC2 também nas fases mais iniciais da carcinogênese fotoinduzida (CHRUN; MODOLO; VIEIRA; BORGES-JUNIOR *et al.*, 2017). Assim, pode-se postular que a HDAC2 deva exercer um papel importante na iniciação da carcinogênese bucal, seja ela de origem química, seja ela de origem fotoinduzida.

Foi observado uma propensão à sobre-expressão de HDAC1 nos casos que apresentaram bom prognóstico, diferente do que foi descrito anteriormente na literatura (THEOCHARIS; KLIJANIENKO; GIAGINIS; RODRIGUEZ *et al.*, 2011; WEICHERT, 2009). Bem como uma inclinação à maior expressão de HDAC2 também nos casos com bom prognóstico, semelhante ao descrito por Weichert (2009) (WEICHERT, 2009) e oposto ao descrito por Chang *et al.* (2009) (CHANG; CHIANG; HUNG; LIN *et al.*, 2009).

Ao avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre os graus de displasia epitelial na LB, nota-se que a expressão de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac tende a se apresentar maior na DEL, seguida da DEI e menor expressão na DEM, com diferença estatisticamente significativa de H4K5Ac somente na comparação entre os subgrupos DEL e DEM ($p=0,02$). Já na classificação binária, embora sem diferença estatística, o grupo que apresenta baixo risco apresenta tendência a ter maior mediana de porcentagem de expressão nuclear para os quatro marcadores. Tais resultados contrariam os resultados de Chrun *et al.* (2017) em displasias epiteliais presentes na queilite actínica, onde a expressão de HDAC1, HDAC2 e HAT1 foi crescente conforme a gravidade da displasia epitelial (CHRUN; MODOLO; VIEIRA; BORGES-JUNIOR *et al.*, 2017). Tal fato pode refletir uma possível diferença de comportamento molecular de acordo com a etiologia e localização da lesão. A ausência de significância estatística pode ser devido ao pequeno número de casos da amostra nos subgrupos, porém, a alta expressão desses marcadores parece estar presente nas fases mais

precoces da carcinogênese. Em dois casos da amostra houve transformação maligna, e em ambos a mediana de expressão dos quatro marcadores é maior que a mediana de expressão geral do grupo de LB, porém por serem casos pontuais não é possível sugerir a sobre-expressão como marcador de potencial de transformação maligna.

A expressão imuno-histoquímica de H4K5Ac foi maior no CEB em comparação com o ENN e maior na LB em comparação com o ENN, com significância estatística ($p=0,005$), sugerindo que ocorra a hiperacetilação de H4K5 em LB e CEB, semelhante ao resultado observado em câncer de pulmão que exibiu padrão aberrante de modificações de histonas (VAN DEN BROECK; BRAMBILLA; MORO-SIBILOT; LANTUEJOUL *et al.*, 2008). No presente estudo, a imuno-expressão de H4K5Ac, nos pacientes com bom prognóstico foi ligeiramente maior que a dos casos em que o prognóstico foi ruim, apesar dos dados não terem apresentado significância estatística. Tal fato é compatível com os resultados encontrados para diferentes padrões de acetilação de H3 e H4 (dentre eles: H3K9Ac, H3K18Ac, H4K12Ac e H4K16Ac) em câncer de pulmão (SONG; KIM; KIM; PARK *et al.*, 2012), em câncer de mama (ELSHEIKH; GREEN; RAKHA; POWE *et al.*, 2009) e em CEB (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017), (CAMPOS-FERNANDEZ; MATSUO; ANDRADE; SERVATO *et al.*, 2019).

A escolha do H4K5Ac (marcador do produto da acetilação da histona H4 lisina 5) deu-se pela hipótese do código de histonas sugerir que esta seja acetilada pela HAT1 (KIM, 2014) e desacetilada pela HDAC1 (ZHOU; ZHOU; LENZMEIER; ZHOU, 2009). Portanto, esperava-se que houvesse correlação positiva da expressão de H4K5Ac e HAT1, enquanto com a HDAC1 apresentasse correlação negativa, porém, os resultados mostram correlação positiva moderada ou forte entre os marcadores dentro de todos os grupos (ENN, LB e CEB). As modificações de histonas são mecanismos importantes de adaptação celular em diferentes condições fisiológicas e a regulação dinâmica dessas modificações ocorre em resposta à disponibilidade de nutrientes, estimulação hormonal, diferenciação e controle do ciclo celular (FAN; KRAUTKRAMER; FELDMAN; DENU, 2015). A desregulação epigenética que acontece na carcinogênese explica a perda de equilíbrio da acetilação, na qual apesar da presença (imunomarcção) de HDAC1 (enzima que promove a desacetilação de H4K5) sua função pode estar comprometida apresentando menor atividade ou até mesmo podendo produzir proteínas disfuncionais, pela necessidade de reagir rapidamente à acetilação exacerbada, por mutações no gene que codifica a HDAC ou deficiência de cofatores em complexos correpressores.

A correlação positiva e significativa na expressão dos marcadores também foi observada no ENN, que apesar de ter sido selecionado cuidadosamente a partir de biópsias de hiperplasias fibrosas, nas quais observou-se nenhuma ou pequena quantidade de células inflamatórias, é uma lesão reativa e tecidos submetidos à inflamação persistente podem apresentar alterações na proliferação do epitélio decorrente do metabolismo do processo inflamatório (KAWANISHI; HIRAKU; PINLAOR; MA, 2006). Assim, podemos sugerir que as alterações epigenéticas aberrantes que estão presentes no CEB e na LB estejam presentes no epitélio não-neoplásico das hiperplasias fibrosas, porém com diferente impacto, já que a hiperacetilação da cromatina modula de forma diferente as células não neoplásicas e neoplásicas. Giudice *et al.* (2013) notou que ao inibir a função das HDAC mantendo a acetilação, as células epiteliais neoplásicas apresentam modificações em sua morfologia tornando-se fusiformes e perdendo a coesão, já as células epiteliais não neoplásicas, apesar da hiperacetilação, mantém sua morfologia original (GIUDICE; PINTO; NÖR; SQUARIZE *et al.*, 2013).

O "código das histonas" propõe combinações específicas de modificações na mesma ou em diferentes caudas de histonas que regulam principalmente a ativação ou silenciamento gênico (JENUWEIN; ALLIS, 2001), as alterações na ordem e especificidade dessa maquinaria pode inferir na capacidade de transcrição gênica em processos fisiológicos e patológicos, porém ainda é pouco conhecida (CHEN; SUN; WANG, 2015). Nesse trabalho, primordialmente, foram investigados os marcadores de três proteínas modificadoras de histonas e um de seus produtos, em conjunto, o que levou a sugerir a participação da HDAC2 e H4K5Ac nas fases iniciais da carcinogênese oral. Através da análise da correlação entre os marcadores dentro de cada grupo foi observado que as proteínas aparecem com imunexpressão concomitante, tanto a acetiltransferase quanto a desacetilase, tanto no epitélio neoplásico, como no epitélio displásico e não neoplásico, enquanto o marcador do produto da acetilação também aumenta sua expressão. Levantam-se, então, duas hipóteses: a primeira de que, mesmo que o marcador esteja presente, sua atividade esteja comprometida e o segundo, que HDAC 1 não esteja envolvida na desacetilação da H4K5, observando de toda forma que existe um desequilíbrio entre a acetilação e a desacetilação no processo de carcinogênese bucal. Assim, o trabalho corrobora com uma parte, apesar de diminuta, essencial, do processo de desvendar o código das histonas, um campo que apesar de bastante estudado ainda reserva muitas descobertas especialmente promissoras no entendimento da carcinogênese oral, diagnóstico precoce e inclusive no tratamento do câncer de boca.

7 CONCLUSÃO

- A expressão imuno-histoquímica de HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac se apresentou mais acentuada nos casos de LB, sugerindo um papel nas fases iniciais da carcinogênese oral;

- Existiu correlação positiva moderada/forte entre os marcadores nos três grupos estudados;

- A imunoposição dos marcadores diminuiu da DEL para a DEM e voltou a aumentar na DEI, de acordo com a classificação clássica (porém com significância estatística apenas no caso do marcador H4K5Ac); considerando-se a classificação binária, diminuiu das displasias epiteliais de baixo risco para as de alto risco, para os quatro marcadores estudados (porém sem significância estatística);

- A imunomarcção de HDAC, HDAC2 e HAT1 tende a ser menor conforme o carcinoma perde a diferenciação celular, enquanto a expressão de H4K5Ac tem propensão a diminuir comparado aos demais subgrupos;

- Não foi possível estabelecer uma correlação da expressão dos marcadores com o prognóstico para LB e CEB.

REFERÊNCIAS

- ALMANGUSH, A.; HEIKKINEN, I.; MÄKITIE, A.; COLETTA, R. *et al.* Prognostic Biomarkers for Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. **British journal of cancer**, 117, n. 6, 09/05/2017 2017.
- BARBETTA, P. A. **Estatística aplicada às ciências sociais**. 9 ed. 2012. 315 p.
- BARNES, L.; EVESON, J.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Surgical Pathology of the head and neck**. 2005.
- BRIERLEY, J.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM Classification of Malignant Tumours**. 8th ed. Chichester, West Sussex, UK: 2017.
- CADET, J.; JAYANTHI, S.; MCCOY, M.; LADENHEIM, B. *et al.* Genome-wide profiling identifies a subset of methamphetamine (METH)-induced genes associated with METH-induced increased H4K5Ac binding in the rat striatum. **BMC genomics**, 14, 08/12/2013 2013.
- CAMPOS-FERNANDEZ, E.; MATSUO, F. S.; ANDRADE, M. F.; SERVATO, J. P. S. *et al.* Prognostic value of histone H3 serine 10 phosphorylation and histone H4 lysine 12 acetylation in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, 74, n. 2, p. 227-238, Jan 2019.
- CARRARD, V. C.; VAN DER WAAL, I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 23, n. 1, p. e59-64, 2018.
- CHANG, H. H.; CHIANG, C. P.; HUNG, H. C.; LIN, C. Y. *et al.* Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. **Oral Oncol**. 45 (7): 610-614 p. 2009.
- CHEN, X. A.; SUN, J.; WANG, Y. Chapter 5 - Techniques Analyzing Chromatin Modifications at Specific Single Loci. *In*: ZHENG, Y. G. (Ed.). **Epigenetic Technological Applications**. Boston: Academic Press, 2015. p. 79-100.
- CHENG, X.; BLUMENTHAL, R. M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. **Structure**, 16, n. 3, p. 341-350, Mar 2008.
- CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J Clin**, 65, n. 5, p. 401-421, Sep-Oct 2015.
- CHRUN, E. S.; MODOLO, F.; DANIEL, F. I. Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. **Pathol Res Pract**, 213, n. 11, p. 1329-1339, Nov 2017.
- CHRUN, E. S.; MODOLO, F.; VIEIRA, D.; BORGES-JUNIOR, A. *et al.* Immunoexpression of HDAC1, HDAC2, and HAT1 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Dis**, Jan 20 2017.
- CRESS, W. D.; SETO, E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. **J Cell Physiol**, 184, n. 1, p. 1-16, Jul 2000.

- DANIEL, F. I.; ALVES, S. R.; VIEIRA, D. S.; BIZ, M. T. *et al.* Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, May 9 2016.
- DANIEL, F. I.; RIVERO, E. R.; MODOLO, F.; LOPES, T. G. *et al.* Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a and 3b in oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. **Arch Oral Biol**, 55, n. 12, p. 1024-1030, Dec 2010.
- DE FREITAS FILHO, S. A. J.; SERVATO, J. P. S.; DE SA, R. T.; SIQUEIRA, C. S. *et al.* Evaluation of specific modified histones in lip carcinogenesis. **Pathol Res Pract**, 214, n. 6, p. 876-880, Jun 2018.
- DE RUIJTER, A. J.; VAN GENNIP, A. H.; CARON, H. N.; KEMP, S. *et al.* Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochem J**, 370, n. Pt 3, p. 737-749, Mar 15 2003.
- DOST, F.; LE CAO, K.; FORD, P. J.; ADES, C. *et al.* Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 117, n. 3, p. 343-352, Mar 2014.
- ELSHEIKH, S. E.; GREEN, A. R.; RAKHA, E. A.; POWE, D. G. *et al.* Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. **Cancer Res**, 69, n. 9, p. 3802-3809, May 1 2009.
- FAN, J.; KRAUTKRAMER, K. A.; FELDMAN, J. L.; DENU, J. M. Metabolic regulation of histone post-translational modifications. **ACS Chem Biol**, 10, n. 1, p. 95-108, Jan 16 2015.
- FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, 4, n. 2, p. 143-153, Feb 2004.
- FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nat Rev Genet**, 9, n. 2, p. 102-114, Feb 2008.
- GENG, H.; HARVEY, C. T.; PITTSBARGER, J.; LIU, Q. *et al.* HDAC4 protein regulates HIF1 α protein lysine acetylation and cancer cell response to hypoxia. **J Biol Chem**, 286, n. 44, p. 38095-38102, Nov 4 2011.
- GIAGINIS, C.; ALEXANDROU, P.; DELLADETSIMA, I.; GIANNOPOULOU, I. *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**, 35, n. 1, p. 61-71, Jan 2014.
- GIUDICE, F. S.; PINTO, D. S., JR.; NÖR, J. E.; SQUARIZE, C. H. *et al.* Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e58672, 2013.

- GLOZAK, M. A.; SETO, E. Histone deacetylases and cancer. **Oncogene**, 26, n. 37, p. 5420-5432, Aug 13 2007.
- GOTTE, M. MicroRNAs in breast cancer pathogenesis. **Minerva Ginecol**, 62, n. 6, p. 559-571, Dec 2010.
- GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **J Mol Biol**, 338, n. 1, p. 17-31, Apr 16 2004.
- HASSIG, C. A.; FLEISCHER, T. C.; BILLIN, A. N.; SCHREIBER, S. L. *et al.* Histone deacetylase activity is required for full transcriptional repression by mSin3A. *In: Cell*. United States, 1997. v. 89, p. 341-347.
- HEMA, K. N.; SMITHA, T.; SHEETHAL, H. S.; MIRNALINI, S. A. Epigenetics in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, 21, n. 2, p. 252-259, 2017.
- INCA, I. N. D. C. **Câncer de boca**. <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca>, 2020. Acesso em: 20/04/2020.
- JAVIERRE, B. M.; FERNANDEZ, A. F.; RICHTER, J.; AL-SHAHROUR, F. *et al.* Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus. **Genome Res**, 20, n. 2, p. 170-179, Feb 2010.
- JAYAPRAKASH, V.; REID, M.; HATTON, E.; MERZIANU, M. *et al.* Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. **Oral Oncol**, 47, n. 11, p. 1048-1054, Nov 2011.
- JEHN, P.; DITTMANN, J.; ZIMMERER, R.; STIER, R. *et al.* Survival Rates According to Tumour Location in Patients With Surgically Treated Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer Res**, 39, n. 5, p. 2527-2533, May 2019.
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, 293, n. 5532, p. 1074-1080, Aug 10 2001.
- JIE, M.; WU, Y.; GAO, M.; LI, X. *et al.* CircMRPS35 suppresses gastric cancer progression via recruiting KAT7 to govern histone modification. **Mol Cancer**, 19, n. 1, p. 56, Mar 12 2020.
- JORDAN, R. C.; MACABEO-ONG, M.; SHIBOSKI, C. H.; DEKKER, N. *et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase-1 and -9 mRNA is associated with progression of oral dysplasia to cancer. **Clin Cancer Res**, 10, n. 19, p. 6460-6465, Oct 1 2004.
- JUNG, K. H.; NOH, J. H.; KIM, J. K.; EUN, J. W. *et al.* HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins. **J Cell Biochem**, 113, n. 6, p. 2167-2177, Jun 2012.
- KANWAL, R.; GUPTA, S. Epigenetic Modifications in Cancer. **Clinical genetics**, 81, n. 4, 2012 Apr 2012.

- KAROUZAKIS, E.; GAY, R. E.; GAY, S.; NEIDHART, M. Epigenetic control in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Nat Rev Rheumatol**, 5, n. 5, p. 266-272, May 2009.
- KAWANISHI, S.; HIRAKU, Y.; PINLAOR, S.; MA, N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. **Biol Chem**, 387, n. 4, p. 365-372, Apr 2006.
- KHOSHNAW, S. M.; GREEN, A. R.; POWE, D. G.; ELLIS, I. O. MicroRNA involvement in the pathogenesis and management of breast cancer. **J Clin Pathol**, 62, n. 5, p. 422-428, May 2009.
- KIM, Y. Z. Altered histone modifications in gliomas. **Brain Tumor Res Treat**, 2, n. 1, p. 7-21, Apr 2014.
- KRISHNA, A.; SINGH, V.; SINGH, S.; KUMAR, S. *et al.* Upregulated histone deacetylase 2 gene correlates with the progression of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Biomark**, Aug 21 2020.
- KRUSCHE, C. A.; WULFING, P.; KERSTING, C.; VLOET, A. *et al.* Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. **Breast Cancer Res Treat**, 90, n. 1, p. 15-23, Mar 2005.
- KUJAN, O.; KHATTAB, A.; OLIVER, R. J.; ROBERTS, S. A. *et al.* Why Oral Histopathology Suffers Inter-Observer Variability on Grading Oral Epithelial Dysplasia: An Attempt to Understand the Sources of Variation. **Oral oncology**, 43, n. 3, 2007 Mar 2007.
- KUJAN, O.; OLIVER, R. J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S. A. *et al.* Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, 42, n. 10, p. 987-993, Nov 2006.
- KUO, C. H.; HSIEH, C. C.; LEE, M. S.; CHANG, K. T. *et al.* Epigenetic regulation in allergic diseases and related studies. **Asia Pac Allergy**, 4, n. 1, p. 14-18, Jan 2014.
- LAKSHMAIAH, K. C.; JACOB, L. A.; APARNA, S.; LOKANATHA, D. *et al.* Epigenetic therapy of cancer with histone deacetylase inhibitors. **J Cancer Res Ther**, 10, n. 3, p. 469-478, Jul-Sep 2014.
- LANE, A. A.; CHABNER, B. A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. **J Clin Oncol**, 27, n. 32, p. 5459-5468, Nov 10 2009.
- LEUNG, Y. T.; SHI, L.; MAURER, K.; SONG, L. *et al.* Interferon regulatory factor 1 and histone H4 acetylation in systemic lupus erythematosus. **Epigenetics**, 10, n. 3, p. 191-199, 2015.
- LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 6, n. 10, Oct 3 2016.

- LINGEN, M. W.; PINTO, A.; MENDES, R. A.; FRANCHINI, R. *et al.* Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. **Oral Dis**, 17 Suppl 1, p. 7-22, Apr 2011.
- LO MUZIO, L.; PANNONE, G.; LEONARDI, R.; STAIBANO, S. *et al.* Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. **J Dent Res**, 82, n. 11, p. 923-928, Nov 2003.
- MAHLKNECHT, U.; HOELZER, D. Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. **Mol Med**, 6, n. 8, p. 623-644, Aug 2000.
- MEHANNA, H. M.; RATTAY, T.; SMITH, J.; MCCONKEY, C. C. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. **Head Neck**, 31, n. 12, p. 1600-1609, Dec 2009.
- MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, 431, n. 7006, p. 343-349, Sep 16 2004.
- MELLO, F. W.; MIGUEL, A. F. P.; DUTRA, K. L.; PORPORATTI, A. L. *et al.* Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. **J Oral Pathol Med**, 47, n. 7, p. 633-640, Aug 2018.
- MIAO, F.; SMITH, D. D.; ZHANG, L.; MIN, A. *et al.* Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation: an epigenetic study in diabetes. **Diabetes**, 57, n. 12, p. 3189-3198, Dec 2008.
- MIN, S. K.; KOH, Y. H.; PARK, Y.; KIM, H. J. *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**, 46, n. 2, p. 142-150, Apr 2012.
- MORENO, D. A.; SCRIDELI, C. A.; CORTEZ, M. A.; DE PAULA QUEIROZ, R. *et al.* Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, 150, n. 6, p. 665-673, Sep 2010.
- NASCIMENTO-FILHO, C. H. V.; SILVEIRA, E. J. D.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; DE SOUZA, L. B. *et al.* Skin wound healing triggers epigenetic modifications of histone H4. **J Transl Med**, 18, n. 1, p. 138, Mar 26 2020.
- NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin**, 52, n. 4, p. 195-215, Jul-Aug 2002.
- O'CONNOR, O.; FALCHI, L.; LUE, J.; MARCHI, E. *et al.* Oral 5-azacytidine and Romidepsin Exhibit Marked Activity in Patients With PTCL: A Multicenter Phase 1 Study. **Blood**, 134, n. 17, 10/24/2019 2019.
- PACHECO, M.; NIELSEN, T. O. Histone deacetylase 1 and 2 in mesenchymal tumors. **Mod Pathol**, 25, n. 2, p. 222-230, Feb 2012.

- PARK, C. S.; REHRAUER, H.; MANSUY, I. M. Genome-wide analysis of H4K5 acetylation associated with fear memory in mice. **BMC Genomics**, 14, p. 539, Aug 8 2013.
- PETERSON, C. L.; LANIEL, M. A. Histones and histone modifications. **Curr Biol**, 14, n. 14, p. R546-551, Jul 27 2004.
- PINTO, A. C.; CARAMES, J.; FRANCISCO, H.; CHEN, A. *et al.* Malignant transformation rate of oral leukoplakia-systematic review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, Apr 2 2020.
- PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, 28, n. 10, p. 1057-1068, Oct 2010.
- RAY, A.; ALALEM, M.; RAY, B. K. Loss of epigenetic Kruppel-like factor 4 histone deacetylase (KLF-4-HDAC)-mediated transcriptional suppression is crucial in increasing vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in breast cancer. **J Biol Chem**, 288, n. 38, p. 27232-27242, Sep 20 2013.
- RHEE, I.; JAIR, K. W.; YEN, R. W.; LENGAUER, C. *et al.* CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. **Nature**, 404, n. 6781, p. 1003-1007, Apr 27 2000.
- RIVERA, C.; OLIVEIRA, A. K.; COSTA, R. A. P.; DE ROSSI, T. *et al.* Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncol**, 72, p. 38-47, Sep 2017.
- ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Mol Oncol**, 1, n. 1, p. 19-25, Jun 2007.
- SCHEIPL, S.; LOHBERGER, B.; RINNER, B.; FROEHLICH, E. V. *et al.* Histone deacetylase inhibitors as potential therapeutic approaches for chordoma: an immunohistochemical and functional analysis. **J Orthop Res**, 31, n. 12, p. 1999-2005, Dec 2013.
- SKENE, P. J.; HENIKOFF, S. Histone variants in pluripotency and disease. **Development**, 140, n. 12, p. 2513-2524, Jun 2013.
- SMITH, J.; RATTAY, T.; MCCONKEY, C.; HELLIWELL, T. *et al.* Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. **Oral Oncol**, 45, n. 8, p. 647-653, Aug 2009.
- SONG, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, D. K.; PARK, S. I. *et al.* Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients. **Pathol Int**, 62, n. 3, p. 182-190, Mar 2012.
- SPEIGHT, P. M.; KHURRAM, S. A.; KUJAN, O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 612-627, Jun 2018.
- SUDO, T.; MIMORI, K.; NISHIDA, N.; KOGO, R. *et al.* Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer. **Oncol Rep**, 26, n. 4, p. 777-782, Oct 2011.

SUN, R.; JUAN, Y.; SU, Y.; ZHANG, W. *et al.* Hypermethylated PAX1 and ZNF582 Genes in the Tissue Sample Are Associated With Aggressive Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, 05/19/2020 2020.

TAKATA, T.; SLOOTWEG, P. J. Tumors of the oral cavity and mobile tongue. *In*: EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C., *et al* (Ed.). **WHO Classification of Head and Neck Tumors**. 4th ed. Lion: IARC, 2017.

TAKEUCHI, S.; HASE, T.; SHIMIZU, S.; ANDO, M. *et al.* Phase I Study of Vorinostat With Gefitinib in BIM Deletion Polymorphism/Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Double-Positive Lung Cancer. **Cancer science**, 111, n. 2, 2020 Feb 2020.

TANDON, P.; DADHICH, A.; SALUJA, H.; BAWANE, S. *et al.* The prevalence of squamous cell carcinoma in different sites of oral cavity at our Rural Health Care Centre in Loni, Maharashtra - a retrospective 10-year study. **Contemp Oncol (Pozn)**, 21, n. 2, p. 178-183, 2017.

THEOCHARIS, S.; KLIJANIENKO, J.; GIAGINIS, C.; RODRIGUEZ, J. *et al.* Histone deacetylase-1 and -2 expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. **J Oral Pathol Med**, 40, n. 9, p. 706-714, Oct 2011.

TURNER, B. M. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. **Nat Struct Mol Biol**, 12, n. 2, p. 110-112, Feb 2005.

UICC, U. F. I. C. C. **TNM Classification**.

https://www.uicc.org/sites/main/files/atoms/files/How_to_use_TNM.pdf, 15th november 2019 2019. Acesso em: 05/19/2020.

UMA MAHESWARI, T.; NIVEDHITHA, M.; RAMANI, P. Expression Profile of Salivary Micro RNA-21 and 31 in Oral Potentially Malignant Disorders. **Brazilian oral research**, 34, 02/10/2020 2020.

URDINGUIO, R. G.; SANCHEZ-MUT, J. V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **Lancet Neurol**, 8, n. 11, p. 1056-1072, Nov 2009.

VAN DEN BROECK, A.; BRAMBILLA, E.; MORO-SIBILOT, D.; LANTUEJOUL, S. *et al.* Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, 14, n. 22, p. 7237-7245, Nov 15 2008.

VERVERIS, K.; KARAGIANNIS, T. C. An atlas of histone deacetylase expression in breast cancer: fluorescence methodology for comparative semi-quantitative analysis. **Am J Transl Res**, 4, n. 1, p. 24-43, 2012.

VILLA, A.; WOO, S. B. Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm. **J Oral Maxillofac Surg**, 75, n. 4, p. 723-734, Apr 2017.

WARNAKULASURIYA, S. Clinical Features and Presentation of Oral Potentially Malignant Disorders. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, 125, n. 6, 2018 Jun 2018.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **J Oral Pathol Med**, 45, n. 3, p. 155-166, Mar 2016.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, 36, n. 10, p. 575-580, Nov 2007.

WARNAKULASURIYA, S.; REIBEL, J.; BOUQUOT, J.; DABELSTEEN, E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, 37, n. 3, p. 127-133, Mar 2008.

WEBBER, L. P.; WAGNER, V. P.; CURRA, M.; VARGAS, P. A. *et al.* Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathology**, 71, n. 2, p. 278-286, Aug 2017.

WEICHERT, W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. **Cancer Lett**, 280, n. 2, p. 168-176, Aug 8 2009.

WEICHERT, W.; ROSKE, A.; GEKELER, V.; BECKERS, T. *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**, 98, n. 3, p. 604-610, Feb 12 2008.

WEINHOLD, B. Epigenetics: The Science of Change. **Environ Health Perspect**, 114, n. 3, p. A160-167, 2006.

WHO, W. H. O. **Oral Cancer**. <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/oral-cancer/en/>, 2020. Acesso em: 20/04/2020.

WU, S. C.; ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 11, n. 9, p. 607-620, Sep 2010.

YANG, H.; MADDIPOTI, S.; QUESADA, A.; BOHANNAN, Z. *et al.* Analysis of class I and II histone deacetylase gene expression in human leukemia. **Leuk Lymphoma**, 56(12), p. 3426-3433, May 26 2015.

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

ZHANG , H.; SUN, P.; WANG, Y.; YU, X. *et al.* MiR-214 Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis of Oral Cancer Cells Through MAPK/ERK Signaling Pathway. **European review for medical and pharmacological sciences**, 24, n. 7, 2020 Apr 2020.

ZHANG, Y. M.; LIU, Y. Q.; LIU, D.; ZHANG, L. *et al.* The Effects of Astragalus Polysaccharide on Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Morphology Induced by A549 Lung Cancer Cells. **Med Sci Monit**, 25, p. 4110-4121, Jun 2 2019.

ZHAO, D.; LI, F.; CHENG, Z.; LEI, Q. Impact of acetylation on tumor metabolism. **Molecular & cellular oncology**, 1, n. 3, 10/29/2014 2014.

ZHOU, J.; ZHOU, B.; LENZMEIER, B.; ZHOU, J. Histone Deacetylase Rpd3 Antagonizes Sir2-dependent Silent Chromatin Propagation. **Nucleic acids research**, 37, n. 11, 2009 Jun 2009.

ZUPKOVITZ, G.; GRAUSENBURGER, R.; BRUNMEIR, R.; SENESE, S. *et al.* The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is a crucial target for histone deacetylase 1 as a regulator of cellular proliferation. **Mol Cell Biol**, 30, n. 5, p. 1171-1181, Mar 2010.

APÊNDICE A – 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 “**Avaliação da imunorreatividade de HDAC1, HDAC2, HAT1 E H4K5Ac e a sua correlação com o prognóstico de lesões potencialmente cancerizáveis e carcinoma epidermoide de boca**”, a ser desenvolvida pela cirurgiã-dentista **Emanuely da Silva**, aluna do Curso de Doutorado em Odontologia/UFSC, sob orientação do **Prof. Dr. Filipe Modolo**. O (a) Sr. (a) apresentou, no passado, uma lesão em boca, 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 das substâncias chamadas HDAC1, HDAC2, HAT1 e H4K5Ac, na pequena parte do material que foi colhido durante a sua cirurgia, relacionando com as suas características clínicas, para observar se a presença dessas substâncias podem estar relacionadas com o tipo da lesão que o senhor(a) teve.

Metodologia: Assinando esse termo o (a) Sr.(a) concorda em participar desse trabalho e será utilizado o material que já foi coletado para fins de diagnóstico e que está armazenado no LPB/UFSC, não sendo necessário uma nova cirurgia para isso. As informações necessárias sobre o seu caso, serão coletadas da ficha de biópsia ou de seu prontuário.

Benefícios: Não haverá benefício direto ao senhor(a). 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, armazenando os dados em um computador que será acessado somente pelos pesquisadores.

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)**3721-8380/99190-9480** (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 **3721-9206**, e e-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br, sito à Rua Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401, Trindade, Florianópolis/SC, CEP 88.040-400. 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 via deste termo, assinada pelos pesquisadores.
Florianópolis, ____ de _____ de 2019.

Assinatura do participante

Emanuely da Silva
Pesquisadora Participante
(48)91909480
emanuely.silva@gmail.com

Filipe Modolo
Pesquisador Principal
(48)37219473
filipe.modolo@ufsc.br

ANEXO A – TCLE do Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC



ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC), localizado no Prédio H, do Centro de Ciências da Saúde da UFSC, se destina a armazenar amostras de materiais biológicos que serão utilizadas em futuros projetos de pesquisa. Esses projetos serão desenvolvidos junto as linhas de pesquisa relacionadas área de concentração em Diagnóstico Bucal do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC: Estudos clínicos, imaginológicos e histopatológicos na abordagem de doenças do sistema estomatognático; Estudos dos eventos celulares e moleculares envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos de interesse para a Odontologia. A identidade dos participantes é preservada em todo o processo e o material só será utilizado em projetos de pesquisa que tenham sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes.

Benefícios: o material armazenado irá possibilitar futuros trabalhos de pesquisa, dentro da linha com o objetivo de entender melhor os processos que levam ao aparecimento das doenças. Cabe ressaltar que não somente as amostras biológicas, mas também os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras. Uma vez que a participação é espontânea, não há benefícios financeiros para os sujeitos que autorizarem o armazenamento de sua amostra de material no BioBanco.

Desconfortos/Riscos: O cadastro do material no BioBanco segue os princípios éticos estabelecidos em legislação nacional e aceitos internacionalmente. Os riscos e desconfortos decorrentes da coleta dos materiais biológicos são aqueles inerentes aos procedimentos clínicos/cirúrgicos necessários para o estabelecimento do diagnóstico das doenças. Para minimizar os mesmos, todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, que tomarão todos os cuidados necessários que os riscos/desconfortos sejam reduzidos. A não autorização do cadastro do material no BioBanco não prejudica em nada o processamento diagnóstico que é efetuado pelo Laboratório de Patologia Bucal.

Manutenção da privacidade e garantia da retirada do consentimento e material biológico: a privacidade dos participantes será mantida a todo tempo, de forma que somente os pesquisadores envolvidos terão acesso aos dados destes, tomando todos os cuidados para que não haja perda do anonimato, inclusive na divulgação dos resultados da(s) pesquisa(s). O participante, ou seu representante legal, tem a garantia de retirar o seu consentimento de guarda da amostra biológica, a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo. A retirada do consentimento deverá ser formalizada por meio de uma manifestação, por escrito e assinada pelo consentidor ou seu representante legal. Caso haja transferência do material biológico armazenado entre biobancos, desta ou de outra instituição, o participante será prontamente comunicado e poderá optar por manter ou não sua amostra armazenada.

Garantia da qualidade de conservação e acesso aos resultados: A qualidade da conservação e integridade do material biológico serão mantidos a todo tempo. Os participantes serão prontamente comunicados sobre a perda, alteração ou destruição de suas amostras, ou da decisão de interrupção da pesquisa, quando for o caso, bem como sobre o fechamento ou transferência deste biobanco. Será garantido o acesso do participante aos resultados obtidos a partir do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, como riscos para doenças ou riscos familiares, incluindo aconselhamento genético (quando aplicável), respeitando-se a autonomia do mesmo.

Meios de contato: Os participantes poderão entrar em contato, a qualquer momento, com o coordenador/sub-coordenador do Biobanco do LPB-UFSC pelo telefone (48) 37215068. Poderá também contatar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos da UFSC, o qual é um órgão público tendo, dentre os seus objetivos, defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e



dignidade. O CEP da UFSC se localiza no prédio da Reitoria II, Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401, Bairro Trindade, Florianópolis; Telefone (48) 3721-6094. O horário de atendimento do CEP é de segunda a sexta-feira das 10h às 12h e das 16h às 18h.

Outras informações: Este termo é elaborado em duas vias, assinado ao final e rubricado em todas as páginas, tanto pelo consentidor ou seu responsável, como pelo responsável pelo biobanco ou pessoa por ele delegada. Uma das vias ficará retida pelo biobanco e a outra ficará com o consentidor ou responsável. Além disso, há a garantia de que os responsáveis seguirão a resolução CNS 441/2011 e que as pesquisas a serem desenvolvidas utilizando o material armazenado deverão ser aprovadas pelo CEP-UFSC/CONEP (quando for o caso) e seguirão as regras constantes na resolução CNS 466/2012 e demais pertinentes.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu,....., portador do RG/CPF:..... autorizo, que o material coletado com finalidade diagnóstica, seja cadastrado junto ao Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC).

Responsável legal (em caso de voluntário menor de idade ou incapaz): _____

Material Cedido: () tecido () sangue () células () saliva

Telefone de contato do participante:

Declaro que (assinale apenas uma das alternativas abaixo):

() novas pesquisas realizadas com o material biológico cedido poderão ser realizadas **SEM** a necessidade de minha aprovação para uso em cada uma delas.

() a cada nova pesquisa realizada com o material biológico cedido quero ser contatado para assinar um consentimento de que meu material seja utilizado na pesquisa;

No caso de óbito ou incapacitação, indico o (a) Sr (a) _____, portador do RG/CPF _____ a consentir a utilização ou descarte do material por mim cedido ao BioBanco.

Participante / Responsável

Coordenador/subcoordenador do Biobanco

Florianópolis, de de 20.....



TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC), localizado no Prédio H, do Centro de Ciências da Saúde da UFSC, se destina a armazenar amostras de materiais biológicos que serão utilizadas em futuros projetos de pesquisa. Esses projetos serão desenvolvidos junto as linhas de pesquisa relacionadas área de concentração em Diagnóstico Bucal do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC: Estudos clínicos, imaginológicos e histopatológicos na abordagem de doenças do sistema estomatognático; Estudos dos eventos celulares e moleculares envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos de interesse para a Odontologia. A identidade dos participantes é preservada em todo o processo e o material só será utilizado em projetos de pesquisa que tenham sido aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes.

Benefícios: o material armazenado irá possibilitar futuros trabalhos de pesquisa, dentro da linha com o objetivo de entender melhor os processos que levam ao aparecimento das doenças. Cabe ressaltar que não somente as amostras biológicas, mas também os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras. Uma vez que a participação é espontânea, não há benefícios financeiros para os sujeitos que autorizarem o armazenamento de sua amostra de material no BioBanco.

Desconfortos/Riscos: O cadastro do material no BioBanco segue os princípios éticos estabelecidos em legislação nacional e aceitos internacionalmente. Os riscos e desconfortos decorrentes da coleta dos materiais biológicos são aqueles inerentes aos procedimentos clínicos/cirúrgicos necessários para o estabelecimento do diagnóstico das doenças. Para minimizar os mesmos, todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, que tomarão todos os cuidados necessários que os riscos/desconfortos sejam reduzidos. A não autorização do cadastro do material no BioBanco não prejudica em nada o processamento diagnóstico que é efetuado pelo Laboratório de Patologia Bucal.

Manutenção da privacidade e garantia da retirada do consentimento e material biológico: a privacidade dos participantes será mantida a todo tempo, de forma que somente os pesquisadores envolvidos terão acesso aos dados destes, tomando todos os cuidados para que não haja perda do anonimato, inclusive na divulgação dos resultados da(s) pesquisa(s). O participante, ou seu representante legal, tem a garantia de retirar o seu consentimento de guarda da amostra biológica, a qualquer tempo, sem qualquer prejuízo. A retirada do consentimento deverá ser formalizada por meio de uma manifestação, por escrito e assinada pelo consentidor ou seu representante legal. Caso haja transferência do material biológico armazenado entre biobancos, desta ou de outra instituição, o participante será prontamente comunicado e poderá optar por manter ou não sua amostra armazenada.

Garantia da qualidade de conservação e acesso aos resultados: A qualidade da conservação e integridade do material biológico serão mantidos a todo tempo. Os participantes serão prontamente comunicados sobre a perda, alteração ou destruição de suas amostras, ou da decisão de interrupção da pesquisa, quando for o caso, bem como sobre o fechamento ou transferência deste biobanco. Será garantido o acesso do participante aos resultados obtidos a partir do seu material biológico e às orientações quanto as suas implicações, como riscos para doenças ou riscos familiares, incluindo aconselhamento genético (quando aplicável), respeitando-se a autonomia do mesmo.

Meios de contato: Os participantes poderão entrar em contato, a qualquer momento, com o coordenador/sub-coordenador do Biobanco do LPB-UFSC pelo telefone (48) 37215068. Poderá também contatar o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos da UFSC, o qual é um órgão público tendo, dentre os seus objetivos, defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade. O CEP da UFSC se localiza no prédio da Reitoria II, Rua Desembargador Vitor Lima, 222, sala 401, Bairro Trindade, Florianópolis; Telefone (48) 3721-6094. O horário de atendimento do CEP é



de segunda a sexta-feira das 10h às 12h e das 16h às 18h.

Outras informações: Este termo é elaborado em duas vias, assinado ao final e rubricado em todas as páginas, tanto pelo consentidor ou seu responsável, como pelo responsável pelo biobanco ou pessoa por ele delegada. Uma das vias ficará retida pelo biobanco e a outra ficará com o consentidor ou responsável. Além disso, há a garantia de que os responsáveis seguirão a resolução CNS 441/2011 e que as pesquisas a serem desenvolvidas utilizando o material armazenado deverão ser aprovadas pelo CEP-UFSC/CONEP (quando for o caso) e seguirão as regras constantes na resolução CNS 466/2012 e demais pertinentes

TERMO DE ASSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Nome do participante:

Responsável legal: RG/CPF:.....

Após explicação a criança sobre a cessão de material biológico ao Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC a mesma deverá marcar (ou apontar) em uma das opções abaixo:



Concordo em participar



Não concordo em participar

Gostaria que:

me avisassem sobre cada pesquisa e me perguntassem se aceito participar de cada uma delas

as pesquisas poderão ser realizadas sem me avisar

Assinatura do Participante

Coordenador/subcoordenador do Biobanco