

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

SILAS ANTONIO JUVENCIO DE FREITAS FILHO

AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS H3K36me3, H3K9ac,
H4K12ac E H3S10ph EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

UBERLÂNDIA

2015

SILAS ANTONIO JUVENCIO DE FREITAS FILHO

AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES DE HISTONAS H3K36me3, H3K9ac,
H4K12ac E H3S10ph EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

UBERLÂNDIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- F866a
2015
- Freitas Filho, Silas Antonio Juvencio de, 1990-
Avaliação das modificações de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio / Silas Antonio Juvencio de Freitas Filho. - 2015.
96 p. : il.
- Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Inclui bibliografia.
1. Citologia - Teses. 2. Histonas - Teses. 3. Lábios - Câncer - Teses. 4. Radiação - Teses. I. Cardoso, Sérgio Vitorino. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Área de Concentração: Biologia Celular

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número 039/2015 do PPGBC

Data: 31 de março de 2015

Discente: Silas Antônio Juvêncio de Freitas Filho

Matrícula Nº. 11312BCE014

título do trabalho: "Avaliação das modificações de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio".

Às oito horas do dia trinta e hum de março de 2015 no Auditório do Bloco 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Adriano Mota Loyola/UFU, Carla Silva Siqueira/UNIPAC e Sérgio Vitorino Cardoso/UFU, orientador do candidato. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso apresentou a Comissão Examinadora e o candidato Silas Antônio Juvêncio de Freitas Filho; agradeceu a presença do público, e concedeu à Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da discente ocorreu conforme as normas do Programa. A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Concluída a arguição, a qual se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato Silas Antônio Juvêncio de Freitas Filho Aprovado

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 12:00. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
UFU

Profa. Dra. Carla Silva Siqueira
UNIPAC

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola
UFU

*À minha avó, Genuca Maria de Freitas, mulher
batalhadora, amável, a qual sempre transmitiu
valiosos ensinamentos e virtudes. Ao lado de Deus
ela está, e do plano terrestre segue esta singela e
autêntica homenagem.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos e proporcionar a concretização deste grandioso sonho.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso, idealizador deste projeto, por me aceitar em seu laboratório desde os tempos da graduação e por não medir esforços em compartilhar o conhecimento. Muito obrigado pelas oportunidades, ensino e tamanha paciência!

Agradeço ao Prof. Dr. Adriano Mota Loyola pela imensa atenção aos meus questionamentos e dúvidas, pelos inúmeros ensinamentos na análise morfológica das lesões.

A Prof.^a Carla pela disponibilidade, paciência e contribuição em minha formação. O incentivo e a confiança depositada foram fundamentais!

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da UFU em proporcionar inúmeros conhecimentos. Em especial aos professores Paulo, Eloísa, Alberto, Renata e Tatiana.

A Renata, secretária da Pós-Graduação, pelas contribuições e colaboração em diversos momentos.

A Lúbia em não medir esforços em colaborar para execução desta pesquisa. Sua colaboração foi imprescindível, muito importante! Muito obrigado!

A Ângela pela grandiosa ajuda nos procedimentos laboratoriais. A sua habilidade, tão quanto a de um “artesão” foi essencial para o estudo.

Ao Adalci pela atenção, auxílio e colaboração em todos estes anos.

Aos colegas do mestrado e em especial aos colegas do Laboratório de Patologia Oral: João Paulo, Flávia, Marília, Roberta, Luiz Henrique, Leana, Luiz Fernando, Gabriela e Kamilla.

Agradeço também aos colegas que já passaram pelo Laboratório, deixaram suas marcas e são sempre lembradas: Talita, Débora e Laís.

Ao Rodrigo Tavares pela disponibilidade, interesse e colaboração em várias etapas desta pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e colegas de trabalho pelo incentivo e apoio.

A toda minha família, avós, tios, tias, primos e primas que me ajudaram nestes anos. O carinho e apoio transmitidos foram essenciais.

Aos meus irmãos, Miguel e Rafael, pelo companheiro e motivação.

Às minhas primas, Bethânia e Gabrielly, pelo imenso companheirismo, ajuda e colaboração!

Agradeço a minha namorada Ludimila, companheira de laboratório nas madrugadas, por me ajudar em diversos momentos, pela paciência e carinho em todos estes anos.

Agradeço ao meu pai Silas e minha mãe Eliene por ser o esteio dos meus sonhos projetados. Agradeço pelo imenso amor, carinho e créditos depositados. Amo muito vocês!

Agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente com a concretização deste estudo.

"Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo teve início de outra maneira - mas tantos sonhos se realizaram que não temos o direito de duvidar de nenhum". (Monteiro Lobato)

RESUMO

A queilite actínica e o carcinoma epidermóide de lábio são doenças causadas por exposição prolongada à radiação ultravioleta da luz solar. As modificações de histonas são desregulações epigenéticas que estão associadas a diversos processos celulares, como, por exemplo, transcrição, replicação, reparo e presentes em processos patológicos, como o câncer. O objetivo do presente estudo foi investigar a expressão de antígenos relacionados às modificações histonas em amostras de queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) em comparação com o tecido normal (TN), através da técnica de imunoistoquímica. Para tanto, foram avaliados 33 casos de QA, 27 de CEL e de nove amostras de mucosa de lábio normal, diagnosticados pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, entre os anos 1978 e 2013. Após revisão histopatológica foram realizadas as reações imunoistoquímicas com os anticorpos contra H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph. A proporção de células reativas e a intensidade da reação foram avaliadas com o método de Quickscore. Houve diminuição significativa ($p < 0,05$) da reatividade imunoistoquímica para H3K36me3 e H3S10ph nos grupos de QA e CEL quando comparados ao grupo tecido de lábio normal. O grupo de QA apresentou diminuição significativa da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac e H4K12ac comparado ao tecido normal, não havendo diferenças entre os grupos de tecido normal e CEL. Associação estatisticamente significativa foi observada entre H3K9ac e o gênero em portadores de carcinomas. Não houve qualquer resultado significativo na comparação entre casos de QA com displasia leve e moderada/intensa, tampouco entre carcinomas bem diferenciados comparados aos moderadamente/pouco diferenciados. Conclui-se que variação nas modificações de histonas avaliadas são relevantes para o início do processo de carcinogênese, mas não para a progressão tumoral na agressão actínica ao lábio.

Palavras-chave: Queilite actínica. Carcinoma epidermóide de lábio. Modificações de histonas.

ABSTRACT

The actinic cheilitis (AC) and lip squamous cell carcinoma (LSCC) are caused by prolonged exposure to the ultraviolet radiation in sunlight. Histone modifications are epigenetic deregulation that are associated with diverse cellular processes such as, for example, transcription, replication, repair, and present in pathological processes such as cancer. The aim of this study was to investigate the expression of antigens related to histone modifications in AC and LSCC compared to normal tissue by immunohistochemistry. Were evaluated 33 samples of AC, 27 cases of LSCC and nine cases of normal mucosa lip, diagnosed in the Pathology Laboratory of the School of Dentistry, Federal University of Uberlandia, between 1978 and 2013. After histopathological review, immunohistochemical was performed with antibodies against H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac and H3S10ph. The proportion of reactive cells and the intensity were evaluated through the Quickscore index. There was a significant reduction ($p < 0.05$) of the immunohistochemical reactivity of H3S10ph and H3K36me3 in ACs and LSCCs when compared to normal mucosa lip. A statistically significant decrease was found for immunohistochemical reactivity of H3K9ac and H4K12ac compared to normal tissue, there was not differences between the normal mucosa lip and LSCC. There was a statistically significant association between H3K9ac and gender in patients with carcinomas. There was not a statistically significant result when comparing AC with mild to moderate/intense dysplasia, or between well-differentiated compared to moderately/poorly differentiated carcinomas. The variations in histone modifications evaluated are relevant to begin in the process of carcinogenesis, but not to tumor progression in actinic aggression lip.

Keywords: Actinic cheilitis. Lip squamous cell carcinoma. Histone modifications.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1– Representação esquemática de um nucleossomo..... 28

Figura 2– Representação esquemática de caudas N-terminais de histonas exibindo modificações pós-traducionais 29

Figura 3– Imagens representativas das lesões coradas em HE após revisão das classificações histopatológicas. **A:** Mucosa labial normal (200x); **B:** Queilite actínica apresentando hiperqueratose, displasia leve e lâmina própria mostrando elastose solar e inflamação leve (200x); **C:** Queilite actínica apresentando hiperqueratose, displasia intensa e lâmina própria com elastose solar e inflamação moderada (200x); **D:** Carcinoma epidermóide bem diferenciado (200x); **E:** Carcinoma epidermóide pouco diferenciado (200x). 40

Figura 4– Reatividade imunoistoquímica para **H3K36me3**. **A:** Mucosa labial normal representativa da elevada reatividade (200x); **B:** Queilite actínica mostrando baixa reatividade (200x); **C:** Queilite actínica exibindo alta reatividade (400x); **D:** Carcinoma epidermóide exibindo baixa reatividade (400x); **E:** Carcinoma epidermóide evidenciando alta reatividade (400x). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase..... 48

Figura 5– Reatividade imunoistoquímica para **H3K9ac**. **A:** Mucosa labial normal (200x); **B:** Queilite actínica apresentando baixa reatividade (400x); **C:** Queilite actínica exibindo alta reatividade (200x); **D:** Carcinoma epidermóide exibindo baixa reatividade (400x); **E:** Carcinoma epidermóide evidenciando elevada reatividade (200x). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase 51

Figura 6– Reatividade imunoistoquímica para **H4K12ac**. **A:** Mucosa labial normal representativa de elevada reatividade (200x); **B:** Queilite actínica mostrando baixa reatividade (200x); **C:** Queilite actínica exibindo alta reatividade (200x); **D:** Carcinoma epidermóide exibindo baixa reatividade (400x); **E:** Carcinoma epidermóide evidenciando alta reatividade. (400x). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase..... 54

Figura 7– Reatividade imunoistoquímica para **H3S10ph**. **A:** Mucosa labial normal exibindo elevada reatividade (200x); **B:** Queilite actínica evidenciando baixa reatividade (200x); **C:** Queilite actínica exibindo alta reatividade (200x); **D:** Carcinoma epidermóide exibindo baixa reatividade; seta vermelha aponta célula em anáfase (400x); **E:** Carcinoma epidermóide evidenciando elevada reatividade (400x). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase.57

GRÁFICOS

Gráfico 1– Distribuição dos casos avaliados por faixa etária.....46

Gráfico 2– Distribuição das 33 amostras de queilite actínica quanto à classificação das displasias epiteliais46

Gráfico 3– Distribuição de 27 amostras de carcinoma epidermóide de lábio quanto aos graus de diferenciação celular47

Gráfico 4– Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K36me3. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0024$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.....49

Gráfico 5– Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K36me3. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,8335$). Barras centrais correspondem à mediana.....49

Gráfico 6– Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K36me3. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 1,0000$). Barras centrais correspondem à mediana.....50

Gráfico 7– Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0183$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.....52

Gráfico 8– Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste t não pareado, $p = 0,4803$). Barras centrais correspondem à média.....52

Gráfico 9– Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste t não pareado, $p = 0,0956$). Barras centrais correspondem à média.....53

Gráfico 10– Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queiliteactínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0176$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.....55

Gráfico 11– Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,3979$). Barras centrais correspondem à mediana.....55

Gráfico 12– Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,7699$). Barras centrais correspondem à mediana.....56

Gráfico 13– Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3S10ph. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0008$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana. 58

Gráfico 14– Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3S10ph. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,5703$). Barras centrais correspondem à mediana..... 58

Gráfico 15– Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3S10ph. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste t não pareado, $p = 0,0520$). Barras centrais correspondem à média 59

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADROS

Quadro 1- Estudos recentes publicados referentes às modificações globais de histonas em diferentes tipos de cânceres utilizando como metodologia a técnica de imunoistoquímica (CHERVONA; COSTA, 2012). Adaptado pelo autor.....	30
Quadro 2- Critérios para identificação de displasia (GALE et al., 2005).....	39
Quadro 3- Critérios para graduação de displasias (GALE et al., 2005)	39
Quadro 4- Critérios para graduação histológica dos carcinomas epidermóides (CARDESA et al., 2005)	40
Quadro 5- Anticorpos e procedimentos utilizados para imunoistoquímica	42
Quadro 6- Parâmetros, classes e valores utilizados para avaliação das reações imunoistoquímicas (DETRE; JOTTI; DOWSETT, 1995)	43

TABELAS

Tabela 1- Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de queilite actínica e de carcinoma epidermóide de lábio avaliados no presente estudo	45
Tabela 2- Resultados imunoistoquímicos associados com parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de QA.....	60
Tabela 3- Resultados imunoistoquímicos associados com parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de CEL.....	60
Tabela 4- Dados individuais dos casos de queilite actínica.....	89

Tabela 5- Dados individuais dos casos de carcinoma epidermóide de lábio	90
Tabela 6- Dados individuais dos casos de mucosa de lábio normal.....	91
Tabela 7- Dados individuais da reatividade imunoistoquímica dos casos de queilite actínica	92
Tabela 8- Dados individuais da reatividade imunoistoquímica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio	93
Tabela 9- Dados individuais da reatividade imunoistoquímica dos casos de mucosa de lábio normal	94
Tabela 10- Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K36me3	94
Tabela 11- Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K36me3 com estratificação dos grupos	94
Tabela 12- Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac	95
Tabela 13- Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac com estratificação dos grupos	95
Tabela 14- Dados da reatividade imunoistoquímica para H4K12ac	95
Tabela 15- Dados da reatividade imunoistoquímica para H4K12ac com estratificação dos grupos	95
Tabela 16- Dados da reatividade imunoistoquímica para H3S10ph	96
Tabela 17- Dados da reatividade imunoistoquímica para H3S10ph com estratificação dos grupos	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
≤	menor ou igual
°C	grau Celsius
ARK2	aurora quinase B (Aurora kinase B)
BD	bem diferenciado
<i>BORIS</i>	gene (do inglês, brother of regulator of imprinting sites)
CA	Califórnia, Estados Unidos da América
CEB	carcinoma epidermóide bucal
CECO	carcinoma epidermóide da cavidade oral
CEL	carcinoma epidermóide de lábio
CPD	dímeros de pirimidina-ciclobutanos (cyclobutane pyrimidine dimers)
CpG	dinucleotídeo citosina-guanina, ilhas próximas a regiões de genes promotres
DL	displasia leve
DMI	displasia moderada ou intensa
DNA	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ERK	quinase regulada por sinalização extracelular (extracellular signal-regulated kinases)
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	gene <i>Enhancer of zeste 2</i>
F	Feminino
G ₂	fase da interfase, (abreviação G para Gap)
h	Horas
H1	histona H1
H2A	histona H2A
H2B	histona H2B
H3	histona H3
H4	histona H4

H2AK5ac	acetilação da lisina 5 da histona H2A
H2BK12ac	acetilação da lisina 12 da histona H2B
H3K18ac	acetilação da lisina 18 da histona H3
H3K27me1	monometilação da lisina 27 da histona H3
H3K27me2	dimetilação da lisina 27 da histona H3
H3K27me3	trimetilação da lisina 27 da histona H3
H3K36	lisina 36 da histona H3
H3K36me3	trimetilação da lisina 36 da histona H3
H3K4me1	monometilação da lisina 4 da histona H3
H3K4me2	dimetilação da lisina 4 da histona H3
H3K4me3	trimetilação da lisina 4 da histona H3
H3K9ac	acetilação da lisina 9 da histona H3
H3K9me1	monometilação da lisina 9 da histona H3
H3K9me2	dimetilação da lisina 9 da histona H3
H3K9me2	dimetilação da lisina 9 da histona H3
H3K9me3	trimetilação da lisina 9 da histona H3
H3S10ph	fosforilação da serina 10 da histona H3
H4K12ac	acetilação da lisina 12 da histona H4
H4K16ac	acetilação da lisina 16 da histona H4
H4K1me1	monometilação da lisina 1 da histona H4
H4K1me2	dimetilação da lisina 1 da histona H4
H4K1me3	trimetilação da lisina 1 da histona H4
H4K20me	metilação da lisina 20 da histona H4
H4K20me1	monometilação da lisina 20 da histona H4
H4K20me2	dimetilação da lisina 20 da histona H4
H4K20me3	trimetilação da lisina 20 da histona H4
H4K5ac	acetilação da lisina 5 da histona H4
H4K8ac	acetilação da lisina 8 da histona H4
H4R3me2	dimetilação da arginina 3 da histona H4
HAT	acetil-transferase de histonas (histone acetyltransferase)
HCl	ácido clorídrico
HDAC	desacetilase de histona (histone deacetylase)
HDAC6	desacetilase de histona 6 (histone deacetylase)

HDMTs	demetilases de histona (histone demethylases)
HE	hematoxilina e eosina
HMTs	metiltransferases de histona (histone methyltransferases)
IQ	índice Quickscore
Ki-67	antígeno de proliferação celular
nm	Nanômetro
M	Masculino
<i>MAGE A1</i>	antígeno específico de melanoma
MAP quinases	Proteínas quinases ativadas por mitógenos (mitogen activated protein kinases)
NI	não informado
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>p</i>	nível de significância
p38	quinase regulada por sinalização extracelular
p53	gene e proteína de mesmo nome (53 refere-se ao peso molecular)
pH	potencial hidrogeniônico
PSI	unidade de pressão no sistema inglês
QA	queilite actínica
RNA	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
T3	classificação da variável extensão do tumor primário
T4	classificação da variável extensão do tumor primário
TMA	microarranjo tecidual
TN	tecido (de lábio) normal
TNM	Estadiamento
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano (hydroxymethylaminomethane)
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV	Ultravioleta
UVA	ultravioleta, tipo A
UVB	ultravioleta, tipo B
UVC	ultravioleta, tipo C

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
3. OBJETIVOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5. RESULTADOS.....	44
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	81
APÊNDICES.....	88

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma doença inflamatória crônica dos lábios, principalmente do lábio inferior, causada pela exposição prolongada à radiação solar. Na grande maioria dos casos, a doença se desenvolve em homens, que exercem alguma atividade exposta ao sol, acima dos 40 anos de idade, de pele clara e que não fazem uso de proteção labial (MARTINS-FILHO; SILVA; PIVA, 2011; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; ROGERS; BEKIC, 1997). A QA é a lesão precursora do carcinoma epidermóide de lábio (CEL) (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012).

O aparecimento do CEL está diretamente associado à exposição à luz solar, é usualmente precedido por QA, e surge frequentemente entre homens acima de 50 anos (SOUZA LUCENA et al., 2012; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009). O CEL apresenta melhor prognóstico em relação aos carcinomas epidermóides que surgem nos demais sítios intraorais (língua, assoalho bucal e outros), fato justificado pela localização anatômica que favorece a detecção precoce, embora haja escassez quanto aos programas de prevenção da doença (SOUZA et al., 2011; BATISTA et al., 2010; SARGERAN et al., 2009).

As modificações epigenéticas em tumores humanos têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas, e evidências recentes sugerem uma participação de componentes epigenéticos no desenvolvimento de lesões precoces (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; JONES; BAYLIN, 2007; TABY; ISSA, 2010; ISSA, 2008; ESTELLER, 2008).

A epigenética se refere às alterações herdadas durante a divisão celular, sem modificação na sequência da molécula de DNA (TABY; ISSA, 2010). Tais alterações são necessárias durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação celular, envelhecimento e demais processos fisiológicos (JONES; BAYLIN, 2007; LENNARTSSON, EKWALL, 2009), além de estarem relacionadas no processo de carcinogênese (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; ELLINGER et al., 2010; JONES; BAYLIN, 2007; TABY; ISSA, 2010; LENNARTSSON, EKWALL, 2009; ISSA, 2008; ESTELLER, 2008). Fatores ambientais podem determinar mudanças epigenéticas e exibir correlação com o processo de envelhecimento (HUIDOBRO; FERNANDEZ; FRAGA, 2013).

Pouco se sabe sobre a influência dos fatores epigenéticos na queilite actínica e no câncer de lábio, sendo importante explorar marcadores moleculares relacionados às modificações de histonas (SANT'ANA, 2014; CHEN et al., 2013a). O reconhecimento dos

fatores epigenéticos envolvidos nessas doenças é necessário para melhor compreender o processo de carcinogênese por indução da radiação ultravioleta, visto que marcadores moleculares podem ser úteis na identificação de características para o diagnóstico precoce, definir casos agressivos e, fornecer melhores definições sobre o tratamento aos pacientes.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de antígenos relacionados aos mecanismos epigenéticos em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio, comparando a reatividade imunoistoquímica entre as lesões e entre casos com características clínico-patológicas diversas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queilite actínica

A queilite actínica (QA), descrita primeiramente por Ayres em 1923, é uma desordem inflamatória crônica dos lábios causada por exposição prolongada à luz solar. É considerada uma lesão com elevado potencial de transformação maligna (VIEIRA et al., 2012; WOOD et al., 2011; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; KAUGARS et al., 1999, ROGERS; BEKIC, 1997). Por exemplo, mostra uma probabilidade 2,5 vezes maior de transformação maligna quando comparada a lesões de pele similares (queratose actínica) (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012).

A radiação ultravioleta (UV) é o componente mutagênico da luz solar, e é definida como uma radiação eletromagnética com comprimento de onda entre 10 e 400nm. Há três tipos principais de radiação UV: UVA, UVB e UVC, diferenciadas pelo comprimento de onda (320 a 400nm, 280 a 320nm, e 200 a 280nm, respectivamente). Em função do seu comprimento de onda, tais formas de radiação variam também no seu poder de penetração na atmosfera e no corpo humano: a radiação UVC é predominantemente absorvida pela camada de ozônio, enquanto UVB e UVA chegam à pele (e à semi-mucosa labial) com efeitos benéficos (p. e.: produção de vitamina D induzida por UVB) e danosos (destruição de vitamina A e colágeno, e carcinogênese) (VISSCHER et al, 1998a; OSTERLIND, 1993). A UVB, com comprimento de onda entre 280-320nm apresenta maior envolvimento com o processo de cancerização do que a UVA, uma vez que promove mutações no DNA (WOOD et al., 2011; CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010), sendo comum a formação de ligações aberrantes entre as bases adjacentes de citosinas no DNA dos queratinócitos (WOOD et al., 2011). A radiação UV provoca mutação do gene p53, gene supressor de tumor, e promove descontrole da proliferação celular, e conseqüentemente o desenvolvimento de câncer (SOUZA LUCENA, et al. 2012). O acúmulo de mutações no DNA causado pela radiação UV constitui um processo chamado de fotocarcinogênese (RICARDO, 2009).

De modo geral, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio induzidos por radiação UV podem se combinar para excitar um elétron em produtos derivados da degradação da melanina após horas de exposição, e assim formar os dímeros de pirimidina-ciclobutanos (CPD), a partir dos quais é comum o surgimento de mutações e lesões ao DNA (PREMI et al., 2015).

Mais comumente, a QA acomete pessoas acima dos quarenta anos de idade, com predomínio de indivíduos de pele clara (MARTINS-FILHO; SILVA; PIVA, 2011; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; SILVEIRA et al., 2009; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI, KAYAVIS; 2004; KAUGARS et al., 1999; ROGERS; BEKIC, 1997). A QA atinge com maior frequência o lábio inferior, com predomínio de homens que trabalham expostos à luz solar e ao ar livre por tempo prolongado, na sua grande maioria representada por residentes ou trabalhadores da zona rural, como, agricultores e pescadores, embora pessoas da zona urbana também possam ser afetadas quando expostas a radiação (SOUZA LUCENA et al., 2012; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI, KAYAVIS; 2004; VISSCHER et al., 1998a; ROGERS; BEKIC, 1997; NICOLAU; BAELUS, 1964).

Clinicamente, a QA pode exibir variações, mas sua apresentação mais característica é a de uma placa branca no lábio inferior, com aspecto semelhante ao de uma leucoplasia; outras formas são placas branco-acinzentadas ou escuras, atrofia, bordas avermelhadas e irregulares, lábio edemaciado e com crostas de sangue, ocasionalmente dor, erosão e ulceração, sendo que na presença de úlcera a suspeita de carcinoma epidermóide de lábio deve ser considerada (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; SCHWARTZ et al., 2008).

As características microscópicas da QA incluem epitélio apresentando acantose, ortoqueratose ou paraquetatose com variação de espessamento, (hiper)granulose, zonas de atrofia, hiperplasia e displasia leve a intensa; lâmina própria apresentando degeneração basofílica (elastose solar), telangiectasia e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário adjacente ao epitélio e perivascular (VIEIRA et al., 2012; WOOD et al., 2011; NEVILLE et al., 2008; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI, KAYAVIS; 2004). Critérios mínimos para o diagnóstico incluem lesão localizada em lábio, com alterações epiteliais que incluam displasia minimamente leve, e elastose solar (KAUGARS et al., 1999). A graduação histopatológica da displasia epitelial tem sido historicamente considerada importante na definição da melhor conduta terapêutica, porém essa importância tem sido contestada (DOST et al., 2014). Eventualmente, lesões diagnosticadas clinicamente como QA se mostram verdadeiros carcinomas à análise histopatológica (VIEIRA et al., 2012; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; ONOFRE et al., 1997). A literatura disponível não define claramente qual deve ser a melhor classificação para lesões labiais provocadas pelo sol que apresentam carcinoma *in situ* na análise histopatológica, mas indica tratamento mais radical para essas lesões do que para

aquelas que apresentem apenas displasia (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012; VISSCHER et al., 2002).

2.2 Carcinoma epidermóide de lábio

O câncer bucal está entre os dez cânceres mais frequentes na população brasileira, e representa um problema de saúde pública. No Brasil as estimativas para o ano de 2014 indicaram a ocorrência de 11.280 novos casos de câncer de boca (interior da cavidade oral e lábio) em homens e 4.010 em mulheres. Com exceção dos tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral é o quarto mais frequente entre os homens das regiões sudeste e nordeste. No ano de 2010, o número de mortes em decorrência da doença foi de 4.891, sendo 3.882 homens e 1.009 mulheres (INCA, 2013). Na América do Sul, o Brasil é o país com maior taxa de incidência e mortalidade relacionada à doença (WARNAKULASURIYA, 2009).

Elevada incidência de câncer de lábio tem sido relatada para indivíduos de pele branca do Canadá e Austrália (WARNAKULASURIYA, 2009). A proporção de CEL varia de 4% a 66% dentre os casos de carcinoma epidermóide bucal (CEB), considerando-se a região geográfica de estudo (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; CHEN et al., 1999). Países com elevada incidência de CEL podem ser encontrados na América do Sul, Europa e Oceania (MOORE et al., 1999).

O CEL é detectado precocemente na maioria dos casos, sendo assim uma condição de prognóstico mais favorável, fato que se mantém mesmo quando diagnosticado em estágio mais avançado (T3 e T4) (BATISTA et al., 2010). O CEB, comparado ao CEL, geralmente é diagnosticado em estágio avançado (T3 e T4), justificado pela localização da lesão, a qual não se desenvolve em uma área tão exposta quanto as lesões de lábio (BATISTA et al., 2010; CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010).

O processo do desenvolvimento do CEL pode envolver diferentes fatores de risco (endógenos e/ou exógenos) que podem se associar, embora o maior fator de risco, agente etiológico predominante, seja reconhecidamente a radiação ultravioleta (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008; MOORE et al., 1999; VISSCHER et al., 1998a). O consumo de álcool e o fumo associados com a exposição à luz solar e a suscetibilidade genética do indivíduo, podem potencializar o risco de desenvolvimento do CEL, no entanto falta clareza nos dados (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; ABREU et al., 2009; VISSCHER et al., 1998a). No estudo

epidemiológico de Souza et al. (2011), a avaliação de 30 pacientes permitiu apurar que 80% dos pacientes portadores de CEL declararam fumantes e 60% etilistas. São citados ainda, fatores de risco que possivelmente podem contribuir com o processo de carcinogênese labial, tais como: a predisposição genética, infecções virais, imunossupressão, más condições de saúde oral e nutrição deficiente. Entretanto não há dados que evidenciam o papel destes fatores com o desenvolvimento de carcinoma epidermóide de lábio (WARNAKULASURIYA, 2009; MOORE et al., 1999; VISSCHER et al., 1998a).

O CEL atinge em maior proporção os homens (BATISTA et al., 2010; CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009; CHEN et al., 1999). Tal dado é explicado pelo fato dos homens estarem mais expostos a radiação solar em relação às mulheres, principalmente na execução de atividades relacionadas ao trabalho (áreas rurais e ao ar livre) (BATISTA et al., 2010; CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009; ABREU et al., 2004; MOORE et al., 1999; CHEN et al., 1999). Geralmente, a média de idade no momento do diagnóstico é em torno de 50 a 60 anos. O acometimento em pacientes jovens é comum entre homens de pele branca (BATISTA et al., 2010; CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009; ABREU et al., 2004; MOORE et al., 1999; CHEN et al., 1999).

O CEL afeta frequentemente o vermelhão do lábio (área externa, lábio seco), enquanto que na porção interna (lábio molhado) é incomum (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009). O lábio inferior é mais afetado que o lábio superior, devido à localização anatômica e direta exposição à radiação solar quando comparado ao lábio superior (OSTERNE et al., 2011; SOUZA et al., 2011; BATISTA et al., 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009; MOORE et al., 1999; VISSCHER et al., 1998a). Clinicamente, a lesão pode apresentar-se como úlcera, crosta, eritema, aspectos vegetativos, e em estágios avançados é possível encontrar grande extensão e/ou infiltração, embora de crescimento lento (ABREU et al., 2004; MOORE et al., 1999).

O quadro histopatológico dos carcinomas epidermóides é classificado em três graduações: I. Bem diferenciado – células epiteliais malignas que se assemelham às do epitélio normal e queratinização; II. Moderadamente diferenciado: células epiteliais neoplásicas com pleomorfismo nuclear, atividade mitótica típica ou atípica, e menor queratinização; III. pobremente diferenciado: células neoplásicas imaturas (elevado

pleomorfismo celular), mitoses atípicas e típicas e escassas áreas de queratinização (NEVILLE et al., 2008; CARDESA et al., 2005; JOHNSON et al., 2005).

De modo geral a taxa de mortalidade do CEL é considerada baixa (ABREU et al., 2009) e alguns fatores influenciam na sobrevida dos pacientes, como, por exemplo: o tipo histológico, o tamanho do tumor primário, presença/ausência de metástase para linfonodos ou regiões distantes, invasão perineural e o tratamento executado (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010; CHEN et al., 1999; VISSCHER et al, 1998a; VISSCHER et al, 1998b; GOORIS et al., 1998; ANTONIADES et al., 1995). Pacientes com neoplasias localizadas em lábio apresentam maior taxa de sobrevida em relação aos portadores de carcinoma epidermóide da cavidade oral (ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010). Metástases e recidiva podem ocorrer, embora seja incomum (ABREU et al., 2004; MOORE et al., 1999).

2.3 Modificações epigenéticas

Epigenética refere-se às alterações herdadas após divisão celular sem qualquer modificação fundamental na sequência da molécula de DNA interferindo na expressão gênica (TABY; ISSA, 2010; JONES; BAYLIN, 2007).

As alterações epigenéticas têm papel crítico na transcrição, reparo e replicação do DNA (DAWSON; KOUZARIDES, 2012) e são necessárias para o desenvolvimento embrionário, crescimento e diferenciação celular, envelhecimento e demais processos biológicos, além de influenciar no desenvolvimento de doenças, com destaque para o câncer (TABY; ISSA, 2010).

As modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas, e evidências recentes sugerem a participação de componentes epigenéticos em lesões cancerizáveis (ISSA, 2008; ESTELLER, 2008; DAWSON; KOUZARIDES, 2012; TABY; ISSA; 2010; JONES; BAYLIN; 2007). Várias modificações epigenéticas têm sido relatadas: metilação do DNA, modificações globais de histonas (principalmente, acetilação e metilação), sumoilação, presença de RNAs não codificantes, alterações físicas de posicionamento de nucleossomos e outros (TABY; ISSA, 2010; JONES; BAYLIN, 2007). Acredita-se que a metilação do DNA é um dos possíveis eventos precoces no desenvolvimento do câncer (MINARDI et al., 2009; ESTTELER et al., 2001).

2.3.1 As histonas e suas modificações globais

As histonas são proteínas altamente alcalinas encontradas no núcleo de células eucariontes, constituindo a principal porção protéica da cromatina. (DECKERT; STRUHL, 2001; GREGORY, et al., 2001; YOUNGSON, 2006). Sua função primordial parece ser auxiliar na compactação do DNA (WOLFFE, 1998). O DNA e as proteínas histonas se organizam formando nucleossomos. Um nucleossomo consiste em um complexo agregado de oito proteínas histonas, duas moléculas de cada histona (H2A, H2B, H3 e H4) formando assim um octâmero ou cerne protéico, ao redor do qual a dupla fita de DNA se enrola 1,75 vezes, com aproximadamente 147 nucleotídeos de comprimento (ALBERTS et al., 2010; KOUZARIDES, 2007; WOLFFE, 1998). O cerne protéico de oito histonas é formado por dois dímeros de H2A-H2B e um tetrâmero formado a partir de dois dímeros H3-H4, o qual localiza-se centralmente e os dímeros se acomodam em lados opostos, sendo esta interação denominada aperto de mãos (ALBERTS et al., 2010).

A fita de DNA entre um nucleossomo e outro é denominada DNA de ligação (ALBERTS et al., 2010; KOUZARIDES, 2007). A histona H1 é conhecida como histona de ligação atuando na organização da fibra de 30nm e interage com o DNA, promovendo a ligação da molécula envolta em um cerne protéico ao outro (adaptador nucleossomal), atuando diretamente com o DNA de ligação, embora não seja considerada uma cola (ALBERTS et al., 2010; CLAPIER; CAIRNS, 2009; HAPPEL; DOENECKE, 2009; WIDOM, 1998; SMITH, 1991).

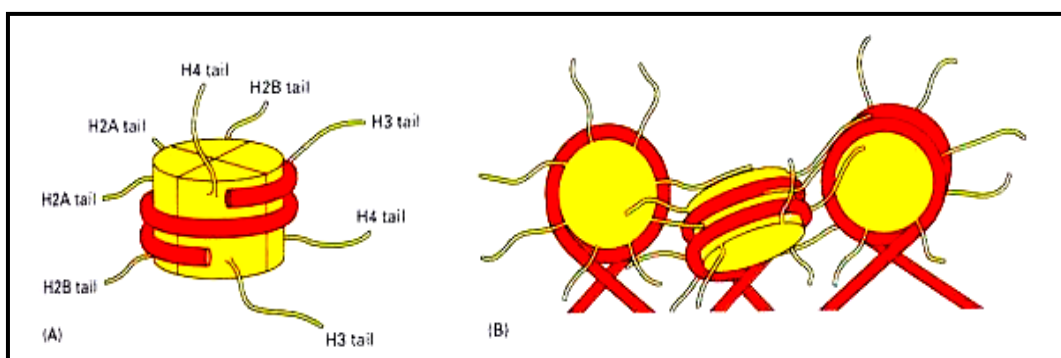


Figura 1 – Representação esquemática de um nucleossomo. (ALBERTS et al., 2010)

A cauda N-terminal das histonas está sujeita a diversas modificações covalentes, tais como, acetilação, metilação (em lisina e arginina), fosforilação, ubiquitinação e outros (ALBERTS et al., 2010; TABY; ISSA, 2010; KOUZARIDES, 2007). Ainda é possível também a ocorrência de modificações em suas cadeias globulares (ALBERTS et al., 2010).

As alterações nestas proteínas constroem um complexo código – o código de histonas, que modula a expressão gênica e afeta o acesso da maquinaria transcricional da célula ao DNA. Algumas modificações geram condensação da cromatina (heterocromatina), na qual o DNA e as proteínas histonas são firmemente embalados, bloqueando o acesso dos fatores de transcrição e outras instigam a expressão gênica (ROACH; BRONNER; OREFFO, 2011). Reguladores de cromatina expressos anormalmente podem influenciar no desenvolvimento de vários tipos de cânceres (DAWSON; KOUZARIDES, 2012). A figura 2 apresenta um esquema básico de modificações globais de histonas.

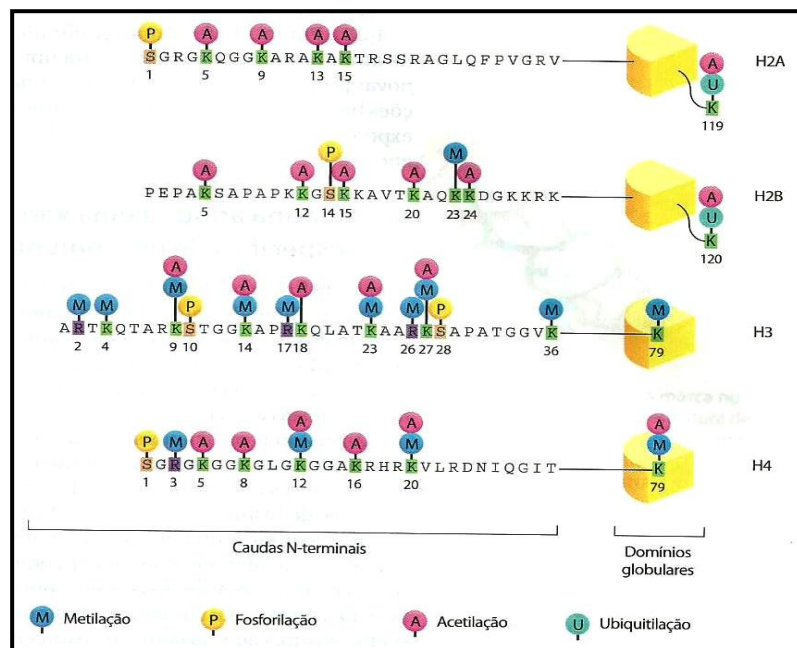


Figura 2 – Representação esquemática de caudas N-terminais de histonas exibindo modificações pós-traducionais (ALBERTS et al., 2010)

Diversos estudos têm mostrado que a reatividade imunoistoquímica das modificações globais de histonas pode ser utilizada como preditivo de prognóstico para diferentes tipos de cânceres. As modificações pós-traducionais de histonas mais estudadas são a metilação e acetilação (CHERVONA; COSTA, 2012). Tais estudos são apresentados no **Quadro 1**.

Quadro 1 - Estudos recentes publicados referentes às modificações globais de histonas em diferentes tipos de cânceres utilizando como metodologia a técnica de imunistoquímica (CHERVONA; COSTA, 2012). Adaptado pelo autor.

Estudo	Neoplasia	Modificações de histonas avaliadas
Seligson et al., 2005	Próstata	H3K9ac, H3K18ac*, H3K4me2*, H4K12ac, H4R3me2
Barlési et al., 2007	Pulmão	H3K4me2*, H2AK5ac, H2BK12ac, H3K9ac*, H4K8ac
Park et al., 2008	Estômago	H3K9ac, H4K16ac, H3K9me3*, H4K20me3
Van Den Broek et al., 2008	Pulmão	H4K5ac*, H4K8ac*, H4K12ac*, H4K16ac*, H4K20me3*
Elsheikh et al., 2009	Mama	H3K18ac*, H3K9ac, H3K4me2*, H4K12ac*, H4K16ac*, H4K20me3*, H4R3me2*,
Seligson et al., 2009	Pulmão	H3K18ac*, H3K4me2*
	Rim	H3K18ac*, H3K9me2*, H3K4me2*
	Próstata	H3K9me2*
Tzao et al., 2009	Esôfago	H3K18ac*, H4K12ac, H4R3me2*, H3K4me2, H3K27me3*
Bianco-Miotto et al., 2010	Próstata	H3K18ac*, H3K4me2*
Ellinger et al., 2010	Rim	H3K4me1*, H3K4me2*, H3K4me3*
I et al., 2010	Esôfago	H3K9ac, H3K18ac*, H4K12ac, H3K9me2, H4R3me2*
Manuyakorn et al., 2010	Pâncreas	H3K9me2*, H3K18ac*, H3K4me2*
Cai et al., 2011	Fígado	H3K27me3*
Behbahani et al., 2012	Próstata	H4K20me1*, H4K20me2*, H4K20me3
Ellinger et al., 2012	Próstata	H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3*
He et al., 2012	Fígado	H3K4me3*
Rogenhofer et al., 2012a	Rim	H3K9me1*, H3K9me2, H3K9me3, H4K20me
Rogenhofer et al., 2012b	Rim	H3K27me1*, H3K27me2*, H3K27me3*
Song et al., 2012	Pulmão	H3K9ac*, H3K9me3*, H4K16ac*, H4K20me3

*: Preditivo de prognóstico.

2.3.2 Metilação de histonas

A adição de grupos metil as caudas N-terminais das histonas é catalisado pelas metiltransferases de histonas (HMTs) e a remoção pelas demetilases de histonas (HDMTs) (TABY; ISSA, 2010).

A metilação de histonas está relacionada com a ativação ou repressão da transcrição, sendo o efeito dependente do aminoácido envolvido (TABY; ISSA, 2010). Por exemplo, a metilação de H3-lisina4 e lisina-36 associam-se com a ativação da transcrição, enquanto que H3-lisina9 e lisina-27 estão diretamente relacionadas à repressão da transcrição ou silenciamento gênico (TABY; ISSA, 2010). A metilação dos aminoácidos de lisina tem sido amplamente estudada em vários tecidos normais e neoplásicos (ROGENHOFER et al., 2012a; TABY; ISSA, 2010; KONDO et al., 2008; KOUZARIDES, 2007; MARTIN; ZHANG, 2005).

Eventos epigenéticos, com destaque para as modificações globais de histonas, têm sido estudados em diferentes tipos de cânceres e geralmente comparados aos tecidos normais ou lesões precoces utilizando como metodologia a técnica de imunoistoquímica em áreas teciduais representativas de tumores – os microarranjos teciduais (TMAs) (ROGENHOFER et al., 2012a; ROGENHOFER et al., 2012b; MASCOLO et al., 2012; SAMARTZIS et al., 2011; ELLINGER et al., 2010; KANAI, 2008; KRUSCHE et al., 2005).

A metilação de histonas parece não ter relação com a metilação do DNA (KONDO et al., 2008; BACHMAN et al., 2003). Demonstrou-se que a metilação de histonas ocorre juntamente com o re-silenciamento de gene supressor tumor na ausência de metilação do DNA (BACHMAN et al., 2003).

2.3.3 Acetilação de histonas

Os domínios N-terminais são mais susceptíveis as modificações covalentes do processo de acetilação (TABY; ISSA, 2010; KOUZARIDES, 2007). A acetilação é catalisada pela acetiltransferase de histona (HAT), enquanto que a reação de desacetilação é mediada pela desacetilase de histona (HDAC) (TABY; ISSA, 2010). A adição do composto é derivado do acetil-Co-A, o qual é destinado para um grupo lisina (CARROZZA et al., 2003).

A adição de um grupo acetil às caudas N-terminais das H3 e H4 promove afrouxamento da cromatina, visto que na forma desacetilada tais histonas carregadas positivamente estão em íntima associação com DNA de carga negativa (TABY; ISSA, 2010).

A acetilação implica diretamente na ativação da transcrição, devido à cromatina tornar-se mais acessível (TABY; ISSA, 2010; KOUZARIDES, 2007). A acetilação está presente em processos celulares como o reparo do DNA, silenciamento gênico e progressão do ciclo celular (CARROZZA et al., 2003).

Há dois tipos de HATs, uma de localização citoplasmática (HATs tipo B) e outra de localização nuclear (HATs tipo A). Os principais subtipos de acetiltransferases de lisina em mamíferos e os mais estudados são: PCAF, *p300*, MYST (TIP160, HBO1, MOZ e MORF) e p160. Estes complexos possuem função específica e atuam no processo de transcrição (TABY; ISSA, 2010; YANG, 2004).

Foram identificados 17 genes que codificam HDAC, porém os mais conhecidos são HDAC1 e HDAC2 (JOHNSTONE, 2002). Mutações ou mudanças no padrão de expressão de genes que codificam HAT e HDAC são fatores que interferem no desenvolvimento do câncer (JOHNSTONE, 2002). Inibidores de HDACs têm sido utilizados no tratamento de cânceres, embora os resultados não mostrassem eficácia, sendo indicados como tratamento complementar ao usual (HIDESHIMA; ANDERSON, 2013; JOHNSTONE, 2002; ELLIS; PILI, 2010). Os inibidores de HDAC atuam de diferentes formas: indução da ação de p21, inibição da angiogênese, ativação do processo de apoptose, inibição dos efeitos dos fatores de crescimento e outros (HIDESHIMA; ANDERSON, 2013).

As HDAC 1, 2 e 3, estudadas pela técnica de imunoistoquímica através de TMAs neoplasia vulvar intraepitelial e em carcinoma de células escamosas de vulva parecem ter importante papel no processo de transformação maligna das lesões, visto a obtenção de diferentes formas no padrão de imunorreatividade (SAMARTZIS et al., 2011).

2.3.4 Fosforilação de histonas

A fosforilação da histona H3 é regulada pelas enzimas Aurora quinases promovendo o controle de eventos críticos da mitose, como a maturação do centrôssomo e orientação cromossômica e segregação (NIGG, 2001). Este processo está envolvido também com a remodelação da cromatina e condensação cromossômica durante a mitose (ZHONG; MA; DONG, 2000).

A fosforilação da histona H3 pode iniciar em diferentes fases da divisão, sendo notório na metáfase e não é possível detectar este evento na intérfase (VERAS et al., 2009). Prigent e Dimitrov (2003) salientaram que o domínio serina 10 tem sido amplamente

estudado e que a fosforilação de H3S10 inicia-se na fase G₂ somente sobre a cromatina centromérica.

A amplificação e o aumento da expressão de Aurora quinase podem levar a diversas desordens celulares, dentre elas o desenvolvimento tumoral (BISCHOFF et al., 1998). O resultado da ação destas enzimas, a fosforilação da histona H3, pode ser avaliado através de expressão imunoistoquímica, e é possível que a identificação de células positivas para H3S10 apresente-se como um marcador mitótico seguro, principalmente em tecidos que apresentam distúrbios do crescimento e diferenciação celular (VERAS et al., 2009; TSUTA et al., 2011; MARTINEZ et al., 2012).

2.3.4 As modificações epigenéticas no câncer bucal

Há poucos trabalhos retratando a participação dos mecanismos epigenéticos no CEB, dentre eles:

- (1) Marcinkiewicz e Gudas (2014) analisaram que os níveis de modificações de histonas em genes homeobox e padrão de metilação do DNA estão associados com a desregulação deste gene em células de CEB;
- (2) Sant'Ana (2014) mostrou que elevada reatividade imunoistoquímica para H3K9ac está associado com a baixa sobrevida em pacientes com CEB;
- (3) Chen et al. (2013b) avaliaram a elevada expressão de proteínas relacionadas a metilação e fosforilação de histonas estão associadas com prognóstico de indivíduos portadores de CEB em Taiwan, principalmente ARK2, Aurora quinase que está envolvida na segregação cromossômica e citocinese;
- (4) Chen et al. (2013a) avaliaram por ensaios imunoistoquímicos as modificações globais de histonas e associaram a diversos parâmetros clínico-patológicos e demonstraram que estas marcações têm enorme utilidade em traçar prognóstico em casos de CEB;
- (5) González-Ramírez, Garcia-Cuellar e Granados-García (2011) apresentaram uma revisão referente à metilação no promotor de diversos genes envolvidos na carcinogênese oral e em carcinomas de cabeça e pescoço, e salientaram que a criação de painéis de metilação de genes pode ser útil no diagnóstico precoce, monitoramento e tratamento de portadores de CE.

- (6) Jithesh et al. (2013) avaliaram a metilação do DNA de células tumorais e células normais em pacientes portadores de CEB; alguns genes apresentaram diferenças no perfil de metilação entre os dois grupos, e elevado fenótipo de metilação nas ilhas CpG foi associado com pior prognóstico;
- (7) Cao et al. (2011) observaram que a forte expressão do gene “*Enhancer of zeste 2*” (EZH2) foi fortemente associado com displasia em lesões de leucoplasia e desenvolvimento do CEB. EZH2 é uma metiltransferase para lisina 27 em histonas H3;
- (8) Díez-Perez et al. (2011) apresentaram uma revisão sobre a metilação de genes envolvidos no câncer e lesões potencialmente malignas da mucosa oral; em sua revisão destacou os genes supressores tumorais;
- (9) Pereira (2011) avaliou a expressão de genes *MAGE A1* e *BORIS* e a metilação destes, tendo observado hipometilação na ilha CpG de *MAGE A1* nas amostras de CEB;
- (10) Sakuma et al. (2006) investigaram a participação da desacetilase de histona HDAC6 em linhagens celulares e em tumores primários (CEB), e a expressão dessa molécula relaciona-se com a agressividade e direciona o planejamento de novos tratamentos.

As alterações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese, na investigação de novos marcadores moleculares e no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento das neoplasias malignas (VIRANI et al., 2012). Entretanto, há poucos estudos associando as modificações globais de histonas e/ou metilação do DNA com o CEB (MARCINKIEWICZ; GUDAS, 2014; SANT’ANA, 2014; CHEN et al., 2013a; CHEN et al., 2013b; JITHESH et al., 2013; CAO et al., 2010; DÍEZ-PEREZ et al, 2011; PEREIRA, 2011; SAKUMA et al., 2006). Não foi possível identificar estudos sobre esses fenômenos em QA e CEL. Este estudo propôs investigar a participação das alterações epigenéticas na carcinogênese e nas diferentes lesões com suas respectivas subclassificações de QA e CEL.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a expressão de antígenos relacionados aos mecanismos epigenéticos, especificamente as modificações de histonas, em amostras queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio, comparando a reatividade imunoistoquímica entre as lesões e aos diferentes parâmetros clínico-patológicas.

3.2 Específicos

- Descrever e comparar o padrão de reatividade imunoistoquímica nas lesões de QA e CEL para as diferentes modificações pós-traducionais de histonas avaliadas;
- Comparar os padrões de reatividade imunoistoquímica com os dados clínico-patológicos nas diferentes lesões.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (parecer 844.944, Anexo A).

4.1 Casuística

Para este estudo foram selecionados casos de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio provenientes de biópsias ou ressecções cirúrgicas, diagnosticados entre os anos de 1978 e 2013 pelo Laboratório de Patologia do Hospital Odontológico da UFU. Para controle, foram selecionados fragmentos de mucosa labial com aspectos histológicos normais do seu epitélio de revestimento, e sem história clínica de exposição prolongada à luz solar ou alterações na lâmina própria que pudessem se relacionar a dano actínico (elastose solar).

Para o rastreamento inicial, foi consultado o banco de dados do referido Laboratório para identificação de casos cuja conclusão da análise histopatológica tenha sido de queilite actínica ou de carcinoma epidermóide de lábio.

Dos casos identificados, as amostras teciduais arquivadas, previamente fixadas em formalina e incluídas em blocos de parafina, foram utilizadas para a confecção de novas lâminas, com cortes de 4µm, corados em hematoxilina e eosina (HE). As novas lâminas foram então avaliadas por dois examinadores (Silas Antonio Juvencio de Freitas Filho e Adriano Mota Loyola) para seleção apenas dos casos que mostravam as características diagnósticas típicas de cada doença de interesse. Para queilite actínica, tais critérios foram os seguintes: lesão localizada em lábio, displasia minimamente leve do epitélio de revestimento, e elastose solar (KAUGARS et al., 1999). Todos os casos selecionados como carcinomas epidermóides de lábio deveriam mostrar invasão inequívoca de tecidos profundos por células epiteliais atípicas e com diferenciação escamosa (JOHNSON et al., 2005).

Após selecionados os casos, os respectivos formulários de solicitação de exame anatomopatológico e prontuários médicos e odontológicos foram consultados para obtenção de dados demográficos dos pacientes (idade, sexo e cor) e clínicos das lesões (tamanho, cor, hipótese diagnóstica, sinais, sintomas, natureza, etiologia, tratamento, grau histológico e estadiamento clínico para os carcinomas epidermóides de lábio).

4.2 Avaliação histopatológica

As amostras de queilite actínica foram classificadas quanto ao grau máximo de displasia epitelial presente, de acordo com a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005), apresentada nos **Quadros 2 e 3**.

Quadro 2 – Critérios para identificação de displasia (GALE et al., 2005).

Arquitetura	Citologia
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose
Perda de polaridade de células basais	Pleomorfismo nuclear
Projeções epiteliais rombosas (“em gota”)	Anisocitose
Aumento do número de figuras mitóticas	Pleomorfismo celular
Figuras mitóticas superficiais anormais	Aumento da proporção núcleo/citoplasma
Disqueratose	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas córneas nas projeções epiteliais	Figuras mitóticas atípicas
	Aumento do número e tamanho de nucléolos

Quadro 3– Critérios para graduação de displasia (GALE et al., 2005).

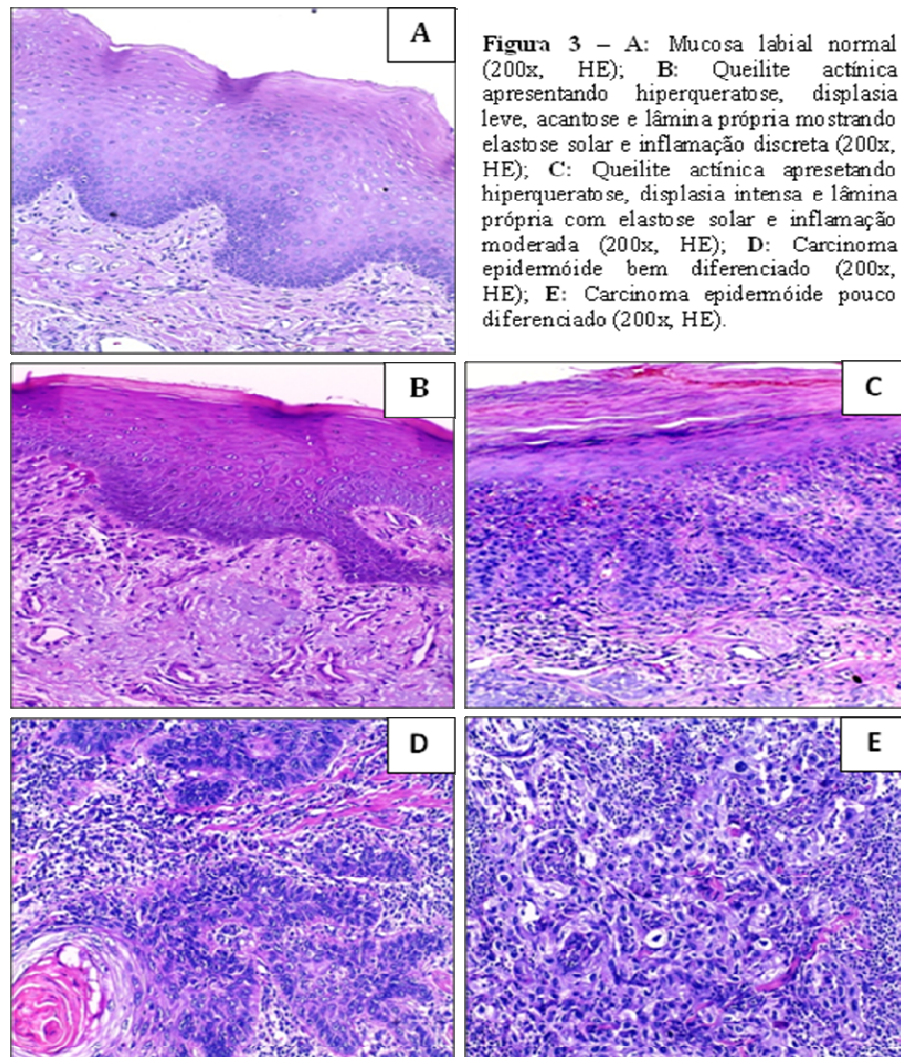
Grau	Características histopatológicas
Leve	Alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio e acompanhadas por atipia citológica.
Moderada	Alterações arquiteturais se estendem até o terço médio da espessura epitelial, acompanhadas por atipia citológica discreta ou moderada
Intensa	Alterações arquiteturais ultrapassam dois terços da espessura epitelial e são acompanhadas por atipia citológica. Se a atipia citológica for intensa, deve ser graduada como intensa mesmo quando se estende apenas até o terço médio do epitélio.

As amostras de carcinoma epidermóide foram avaliadas quanto à diferenciação histopatológica, também seguindo o preconizado pela OMS (CARDESA et al., 2005), conforme apresentado no **Quadro 4**.

Quadro 4– Critérios para graduação histológica dos carcinomas epidermóides (CARDESA et al., 2005).

Grau de diferenciação	Características histopatológicas
Bem diferenciado	Semelhante ao epitélio de origem, com elevado número de pérolas de queratina.
Moderadamente diferenciado	Apresenta evidentes pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, e menor queratinização.
Pouco diferenciado	Predomínio de células imaturas, com numerosas mitoses (típicas e atípicas), com mínima queratinização.

A **Figura 3** apresenta imagens histológicas, coradas em HE, representativas de mucosa labial normal, QA e CEL selecionadas para este estudo.



4.4 Ensaios imunoistoquímicos

A partir do material emblocado em parafina foram preparados cortes histológicos de 4µm de espessura, dispostos em lâmina de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltrietoxisilano (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA).

Para os ensaios imunoistoquímicos, os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol: um de 16 horas e outro de 15 minutos, ambos em temperatura ambiente. Após desparafinização, os cortes foram hidratados em soluções aquosas de etanol em concentrações decrescentes (100%, 95% e 80%), por cinco minutos cada. Para a remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% por dez minutos seguidos de sete lavagens em água destilada.

Para detecção de H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph, a recuperação antigênica foi realizada com os cortes imersos em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 1,0mM), pH 8,0, em ciclo de quinze minutos, em câmara eletrônica de pressão (Decloaking Chamber NxGen, Biocare Medical, Pike Lane, Concord, CA, EUA) a 110°C e pressão de 6 a 8PSI. Para detecção de H3K36me3, o procedimento foi feito também com EDTA, em forno de microondas (AW42, Continental, São Paulo, Brasil), à potência máxima, por três ciclos de 5 minutos.

Após resfriamento das amostras por 35 minutos e então lavagens em água destilada, realizou-se o bloqueio da atividade endógena de avidina, com solução aquosa de clara de ovo por 15 minutos, seguida de dez banhos em água destilada. O bloqueio da atividade endógena de biotina foi realizado com os cortes imersos em solução aquosa de leite em pó desnatado, por 15 minutos, seguida por dez banhos em água destilada. Logo, seguiram para a etapa de eliminação da atividade endógena de peroxidase, utilizando peróxido de hidrogênio a 10 volumes, em três banhos de dez minutos cada, seguidos por cinco banhos em água destilada e três novos banhos em solução tampão TRIS-HCl (pH 7.4).

Para bloqueio de ligações inespecíficas das soluções imunológicas utilizadas em seguida, os cortes foram incubados em solução de caseína (Background Sniper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 15 minutos. Logo, os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonais específicos para detecção de cada molécula em estudo, diluídos em solução de TRIS-HCl e armazenados em câmara úmida. Os dados referentes aos anticorpos e à incubação são apresentados no **Quadro 5**.

Quadro 5 – Anticorpos e procedimentos utilizados para imunistoquímica.

Anticorpo específico	Fabricante	Diluição	Incubação	
			Tempo (h)	Temperatura
H3K36me3	ABCAM	1:10.000	18	Ambiente
H3K9ac	ABCAM	1:2.000	2	Ambiente
H4K12ac	ABCAM	1:10.000	2	Ambiente
H3S10ph	ABCAM	1:500	2	Ambiente

Após a incubação com os anticorpos primários, foram realizados dois banhos de dois minutos cada em solução de TRIS-HCl, seguindo-se por incubação com sistema de amplificação composto por estreptavidina-biotina-peroxidase (Starr Trek, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), inicialmente com solução de complexo secundário biotinilado por vinte minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, seguida por banhos em solução de TRIS-HCl, dois banhos de dois minutos cada. Em seguida, incubação novamente por dez minutos em câmara úmida à temperatura ambiente em solução de estreptavidina conjugada a peroxidase, seguindo-se por dois banhos lavagens em tampão TRIS-HCl. Logo, a reação foi revelada com substrato cromogênico 3,3'tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio, por 5 minutos em temperatura ambiente, seguido por lavagens em água corrente. As lâminas foram então contra-coradas com hematoxilina de Harris, seguidos de banho em água corrente por cinco minutos. Finalmente, os cortes foram desidratados em soluções de etanol em concentrações crescentes (80%, 95% e 100%) por cinco minutos, diafanizadas em dois banhos de xilol com duração de sete minutos, e montagem das lâminas com lamínulas de vidro e resina histológica (Precision, Cralplast, China).

4.5 Análise da reatividade imunistoquímica

As reações imunistoquímicas foram avaliadas em microscópio de luz convencional (Leica DM750), por três avaliadores previamente calibrados, de forma independente. Para cada amostra, verificou-se inicialmente a área de hotspot (marcação mais evidente em menor aumento), e então, nessa área, cinco campos histológicos em grande aumento (objetiva de 40x) foram avaliados quanto à presença ou não de reatividade nuclear, à intensidade de

reação, e à proporção de células reativas. Para as amostras de queilite actínica, todas as camadas epiteliais foram consideradas para a avaliação. Finalmente, um índice semiquantitativo para avaliação da reatividade, denominado *Quickscore* (IQ), foi calculado segundo os critérios apresentados no **Quadro 6**, consistindo na multiplicação dos valores de intensidade de reação e proporção de células reativas (DETRE; JOTTI; DOWSETT, 1995). Na avaliação, o valor final do índice de reatividade foi dado pela média do valor atribuído por cada avaliador, exceto quando havia variação maior do que três pontos entre eles. Nessa situação, procedia-se a nova avaliação, mas agora em conjunto, até que a discrepância se mostrasse no intervalo desejado.

Quadro 6 – Parâmetros, classes e valores utilizados para avaliação das reações imunoistoquímicas (DETRE; JOTTI; DOWSETT, 1995).

Variáveis	Classes						
	0	1	2	3	4	5	6
Proporção de células neoplásicas reativas	Ausência de células positivas	De 0-4% de células positivas	De 5-19% de células positivas	De 20-39% de células positivas	De 40-59% de células positivas	De 60-79% de células positivas	De 80-100% de células positivas
Intensidade de reação	Ausência de células positivas	Fraca	Moderada	Intensa	-	-	-

4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism, versão 5.00 (GraphPad Software, Inc. San Diego, EUA).

Considerando os intervalos não contínuos da possível distribuição dos valores finais do índice Quickscore (0 a 6, 8 a 10, 12, 15, e 18), apenas testes estatísticos não paramétricos foram utilizados neste estudo. Comparações entre valores médios foram realizadas com os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis (com pós-teste de Dunn). Análise de correlação foi feita com o teste de Spearman. Comparações entre dados clínicos e a reatividade das moléculas de interesse foram ainda realizadas com o teste exato de Fisher. Significância estatística dever-se-ia atribuir a valores de p menores que 0,05.

5. RESULTADOS

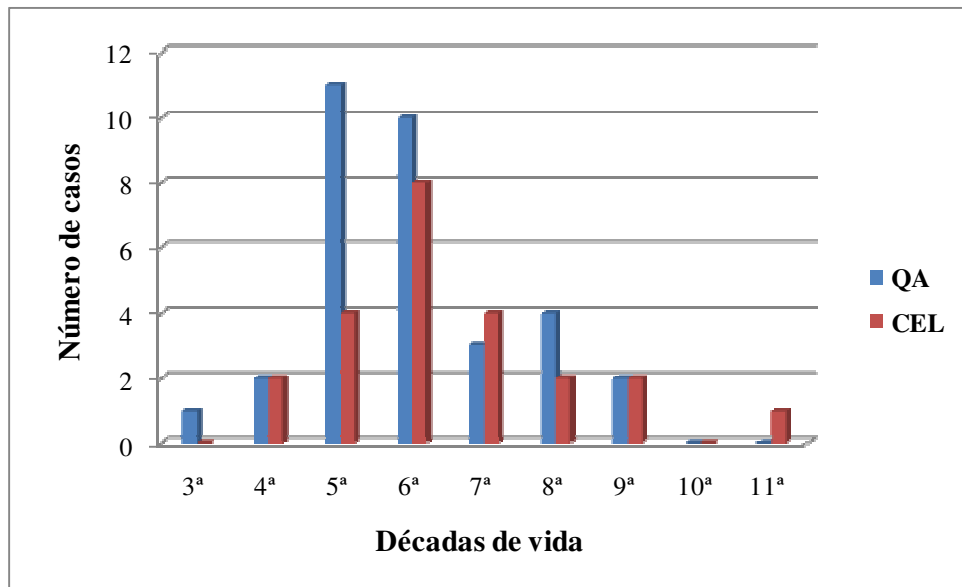
5. RESULTADOS

Dados individuais de cada caso estão disponíveis no **Apêndice A**. Características demográficas e clínicas dos pacientes são sumarizadas na **Tabela 1**, com sua distribuição por faixa etária apresentada no **Gráfico 1**.

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de queilite actínica e de carcinoma epidermóide de lábio (CEL) avaliados no presente estudo.

Variável	Queilite actínica n(%)	CEL n (%)
Gênero		
Masculino	26 (78,8)	23 (85,2)
Feminino	7 (21,2)	4 (14,8)
Idade		
Média	53,2 anos	59,7 anos
Desvio-padrão	13,8 anos	16,0 anos
Variação	23 a 82 anos	38 a 100 anos
≤ 60 anos	25 (75,8)	14 (51,9)
> 60 anos	8 (24,2)	9 (33,3)
Desconhecida (não informada)	0	4 (14,8)
Cor/raça		
Branca	20 (60,6)	17 (63,0)
Outras (parda e indígena)	6 (18,2)	3 (11,1)
Desconhecida (não informada)	7 (21,2)	7 (25,9)
Ocupação com exposição prolongada ao sol		
Sim	8 (24,2)	13 (48,1)
Não	8 (24,2)	3 (11,1)
Ocupação desconhecida (não informada)	17 (51,6)	11 (40,8)
Localização		
Lábio superior	0	3 (11,1)
Lábio inferior	29 (87,9)	20 (74,1)
Desconhecida (não informada)	4 (12,1)	4 (14,8)
Tabagismo		
Sim	7 (21,2)	16 (59,3)
Não	0	1 (3,7)
Desconhecido (não informado)	26 (78,8)	10 (37,0)
Consumo frequente de bebida alcoólica		
Sim	3 (9,1)	12 (44,4)
Não	2 (6,1)	4 (14,8)
Desconhecido (não informado)	28 (84,8)	11 (40,8)
Total	33 (100)	27 (100)

Gráfico 1 – Distribuição dos casos avaliados por faixa etária.



Para as amostras de queilite actínica, predominaram os casos com displasia leve, conforme mostrado no **Gráfico 2**. Para os carcinomas, houve predomínio de casos bem diferenciados conforme apresentado no **Gráfico 3**.

Gráfico 2 – Distribuição de 33 amostras de queilite actínica quanto à classificação das displasias epiteliais.

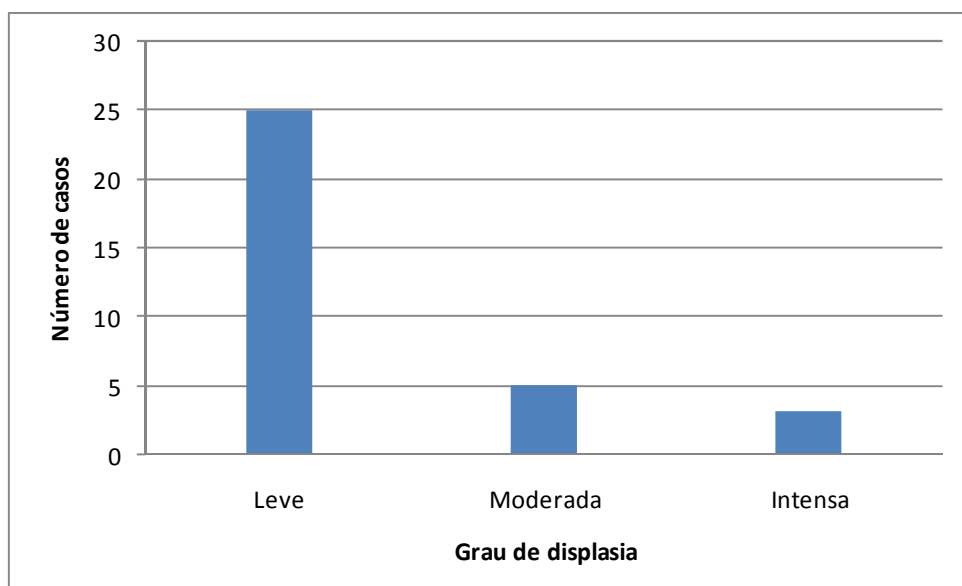
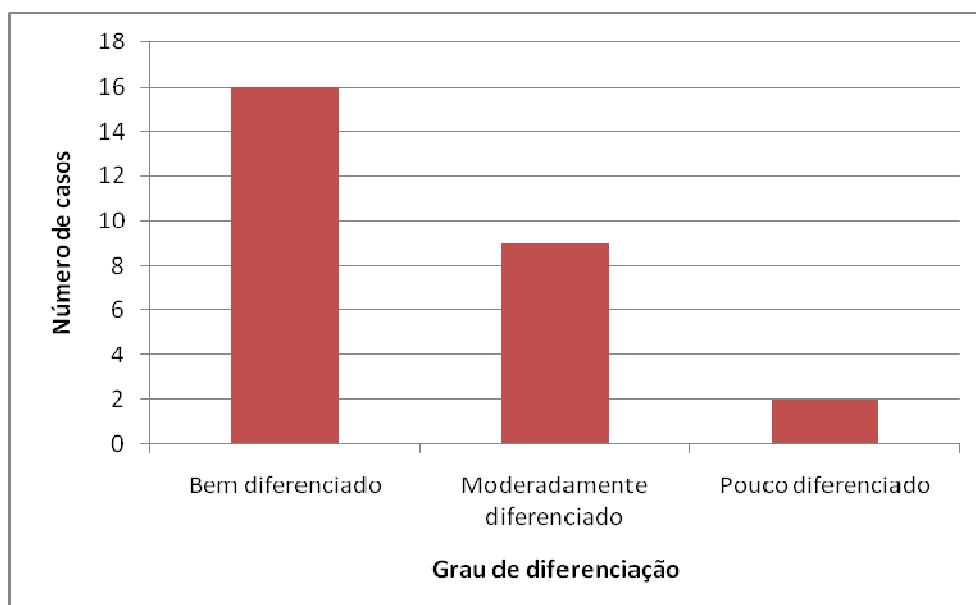
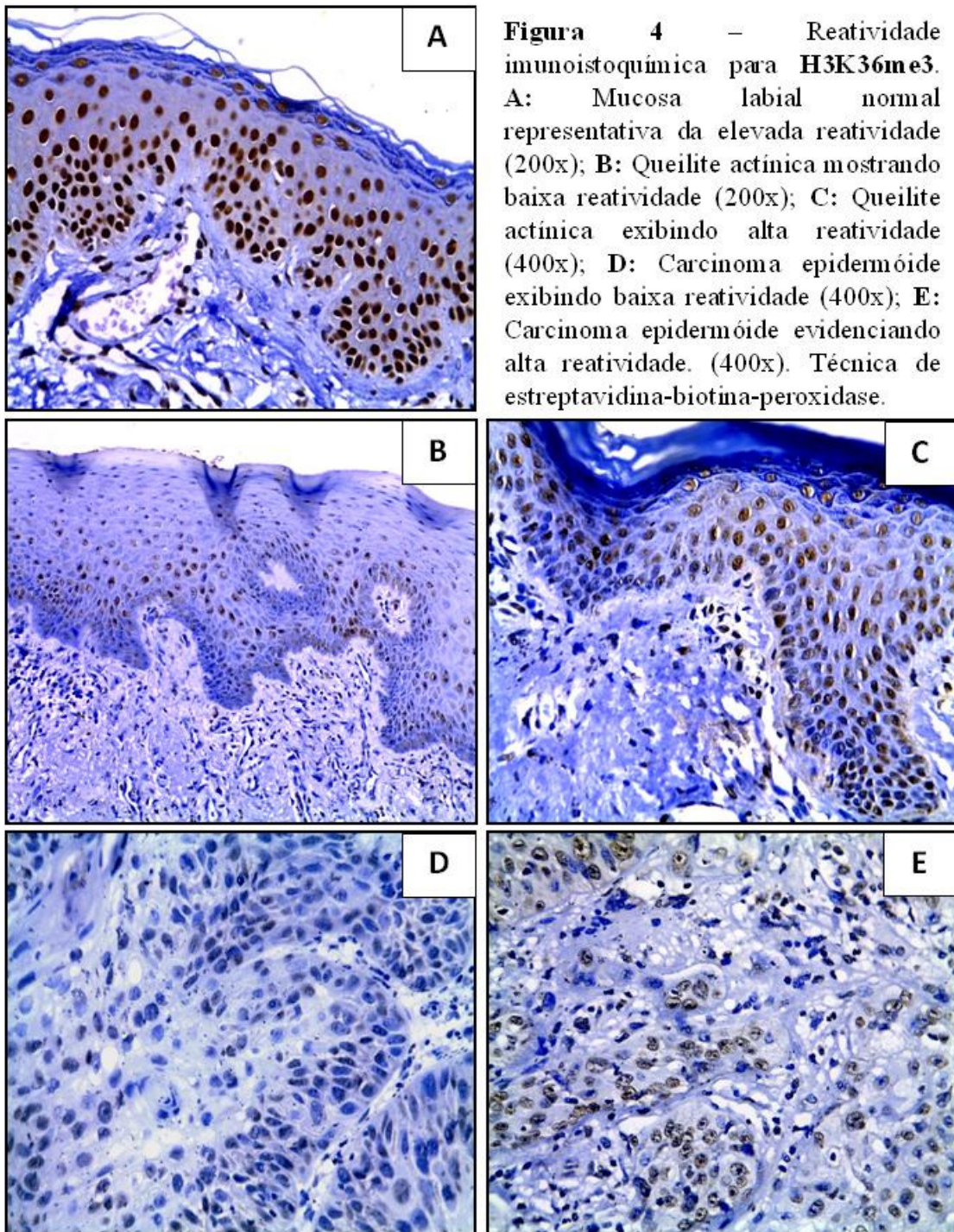


Gráfico 3 – Distribuição de 27 amostras de carcinoma epidermóide de lábio quanto aos graus de diferenciação celular.



H3K36me3 foi identificada em todas as amostras, exceto em um caso de carcinoma epidermóide de lábio. Conforme ilustrado na **Figura 4**, nas amostras de lábio normal verificou-se que a reatividade estava presente em todas as camadas do epitélio de revestimento. Nos casos de queilite actínica a reatividade também pôde ser evidenciada em todas as camadas, porém em frequência e intensidade reduzidas frente às amostras de lábio normal. Nos carcinomas, não foi observada diferença evidente na distribuição das células reativas entre camadas externas e internas das formações tumorais.

As amostras de lábio normal mostraram todas índices de reatividade superiores a 11, enquanto maior variação foi observada nos casos de queilite actínica e, especialmente, de carcinomas. Conforme mostrado no **Gráfico 4**, a mediana do grupo de amostras de tecido normal mostrou-se significativamente maior do que aquelas dos grupos de queilites actínicas e de carcinomas, ainda que entre esses dois grupos a diferença observada não tenha se mostrado significativa. Também não foi identificada diferença significativa nos índices de reatividade entre diferentes graus de displasia para as queilites actínicas ou graus de diferenciação para os carcinomas epidermóides, conforme mostrado nos **Gráficos 5 e 6**, respectivamente.



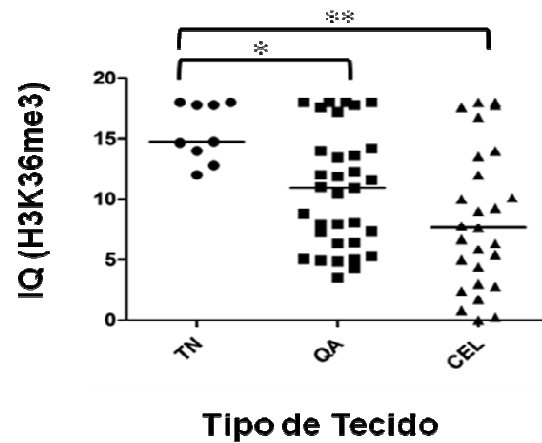


Gráfico 4 – Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K36me3. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0024$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.

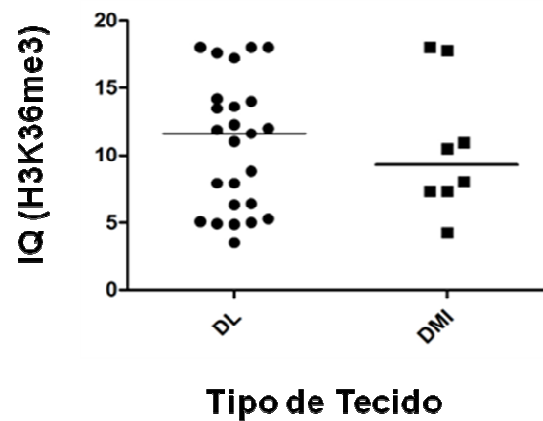


Gráfico 5– Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K36me3. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,8335$). Barras centrais correspondem à mediana.

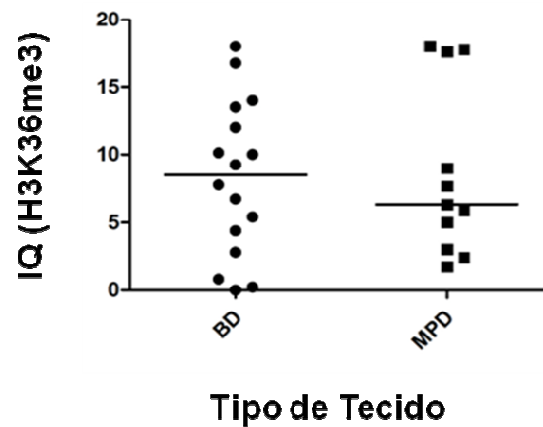


Gráfico 6– Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K36me3. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 1,0000$). Barras centrais correspondem à mediana.

Reatividade imunoistoquímica para H3K9ac foi identificada em todas as amostras de mucosa normal, e na maioria dos casos de queilite actínica e de carcinoma epidermóide. Conforme apresentado na **Figura 5**, em mucosa normal a reatividade foi identificada em todas as camadas do epitélio de revestimento da mucosa normal, entretanto com predomínio em camadas inferiores das queilites actínicas, enquanto a distribuição foi heterogênea nas amostras de carcinomas. Todas as amostras de mucosa normal mostraram índices de reatividade acima de 9, todavia havendo grande heterogeneidade nos demais grupos, como mostrado no **Gráfico 7**. Houve diferença significativa apenas entre os índices de reatividade de mucosa normal e de queilites actínicas. Como mostrado nos **Gráficos 8 e 9**, não houve variação significativa nos índices de reatividade entre diferentes graus de displasia para queilites actínicas, ou graus de diferenciação nos carcinomas.

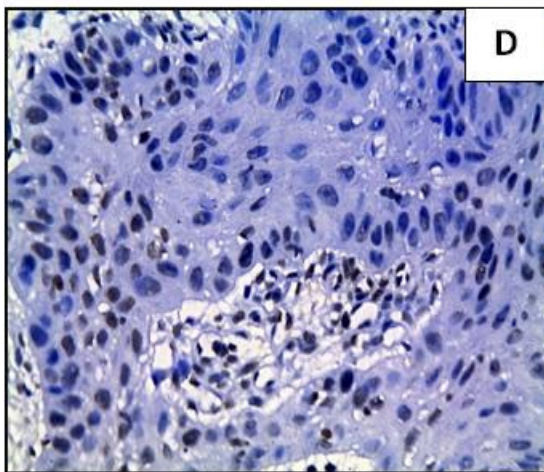
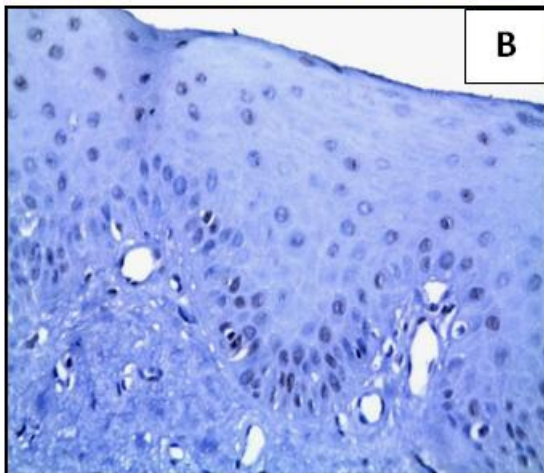
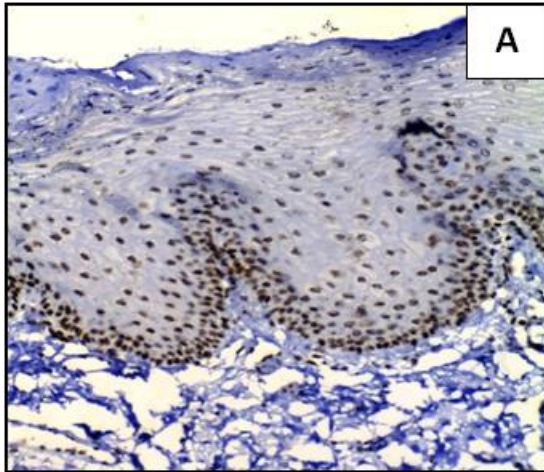
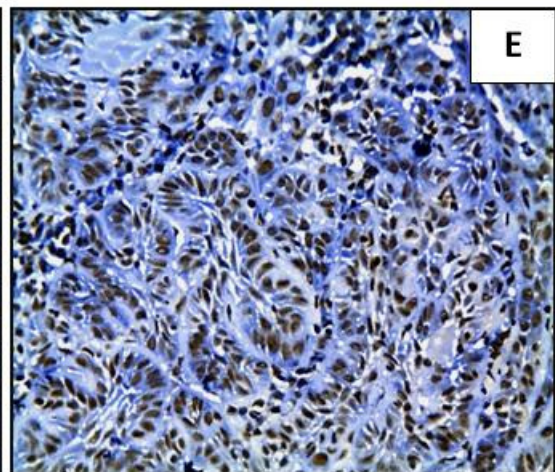
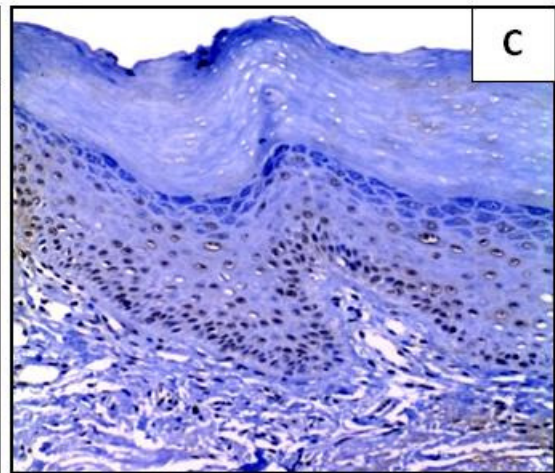


Figura 5 – Reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. **A:** Mucosa labial normal (200x); **B:** Queilite actínica apresentando baixa reatividade (400x); **C:** Queilite actínica exibindo alta reatividade (200x); **D:** Carcinoma epidermóide exibindo baixa reatividade (400x); **E:** Carcinoma epidermóide evidenciando elevada reatividade (200x). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase.



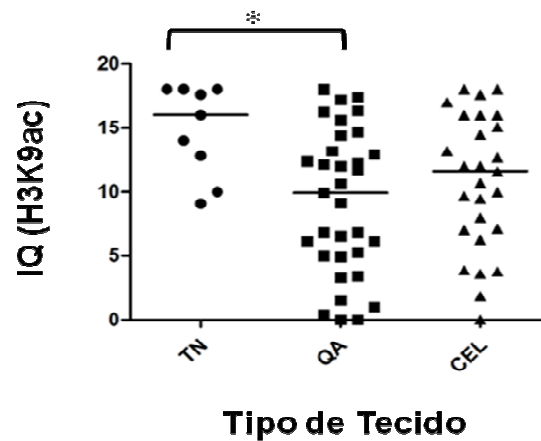


Gráfico 7 – Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0183$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.

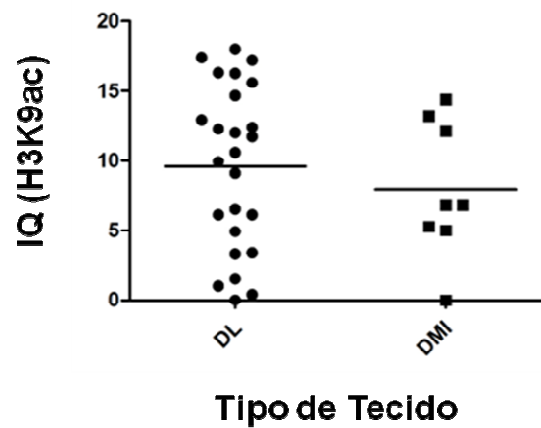


Gráfico 8– Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste t não pareado, $p = 0,4803$). Barras centrais correspondem à média.

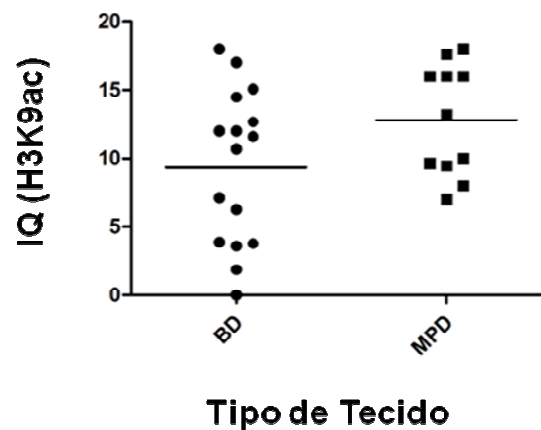
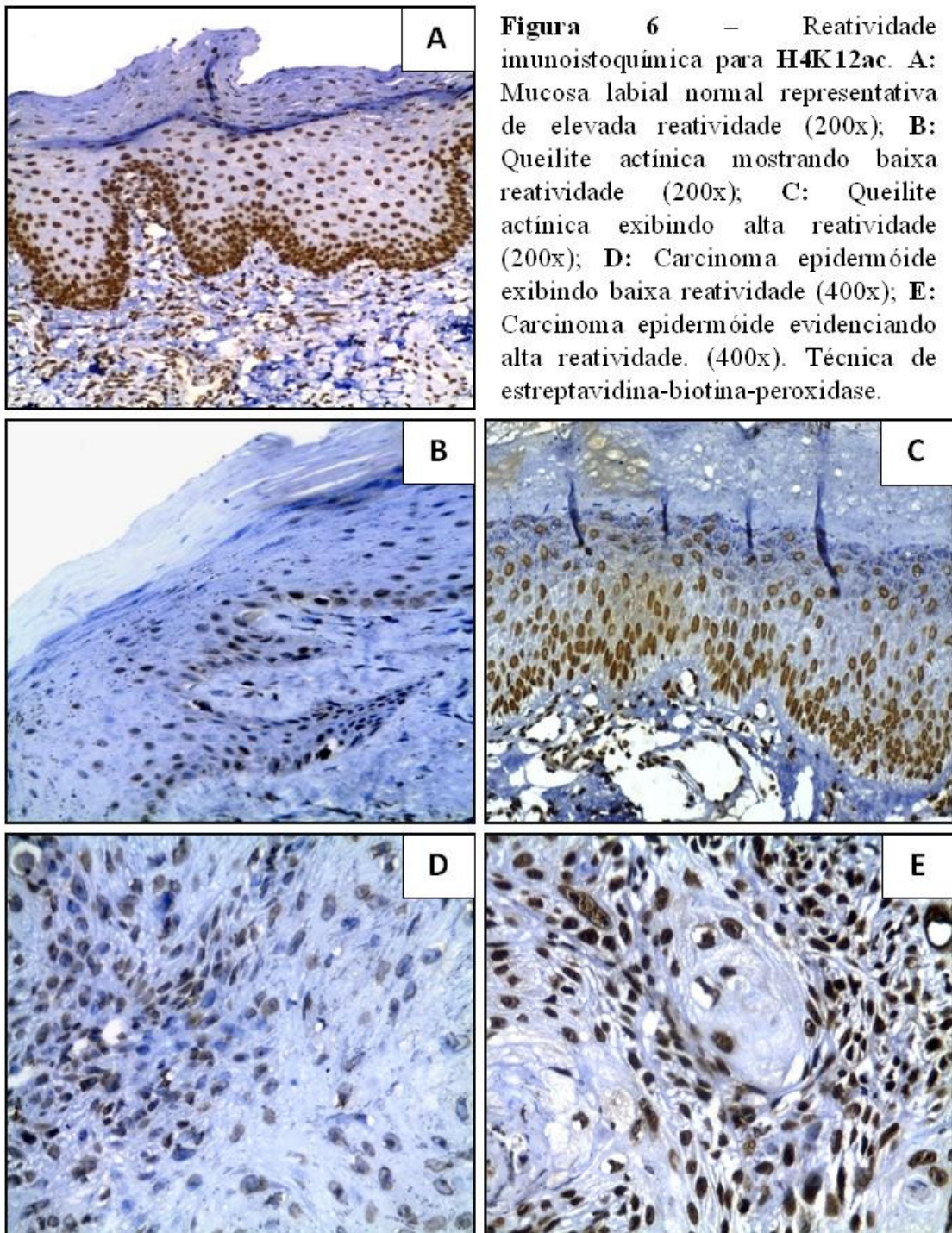


Gráfico 9– Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3K9ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste t não pareado, $p = 0,0956$). Barras centrais correspondem à média.

H4K12ac foi identificada em todas as amostras de mucosa normal, queilite actínica e de carcinoma epidermóide. Conforme apresentado na **Figura 6**, nas amostras de mucosa normal a reatividade foi identificada em todas as camadas do epitélio de revestimento. Nos casos de queilite actínica a reatividade pôde ser evidenciada em todas as camadas ou era limitada ao terço inferior do epitélio, variando também em intensidade em contraste à mucosa de lábio normal. Nos carcinomas a distribuição de células reativas foi homogênea, entretanto com variação da intensidade. As amostras de lábio normal mostraram índices de reatividade superior a 17, com distribuição heterogênea nos demais grupos, como mostrado no **Gráfico 10**. Houve diferença significativa apenas entre os índices de reatividade de mucosa normal e de queilites actínicas. Não houve diferença significativa nos índices de reatividade entre diferentes graus de displasia para queilites actínicas, ou graus de diferenciação nos carcinomas, conforme apresentado nos **Gráficos 11 e 12**, respectivamente.



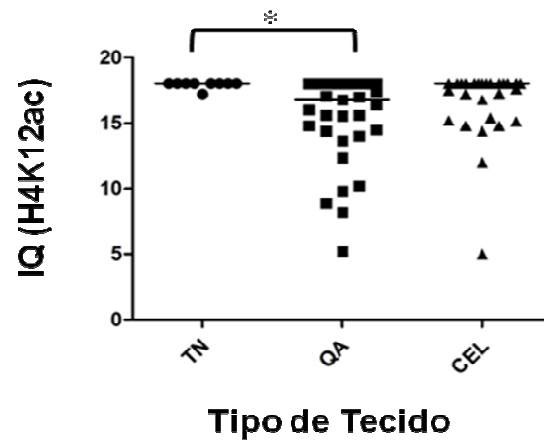


Gráfico 10 – Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queiliteactínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0176$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.

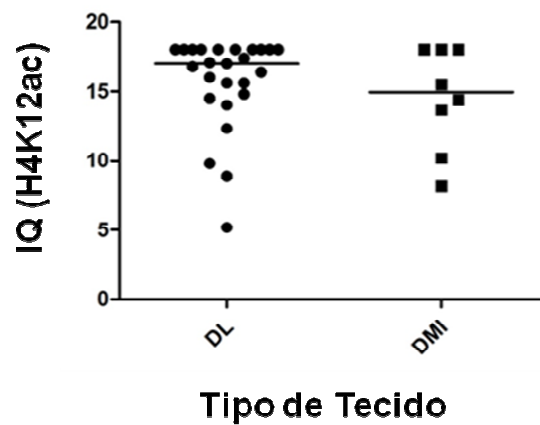


Gráfico 11 – Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,3979$). Barras centrais correspondem à mediana.

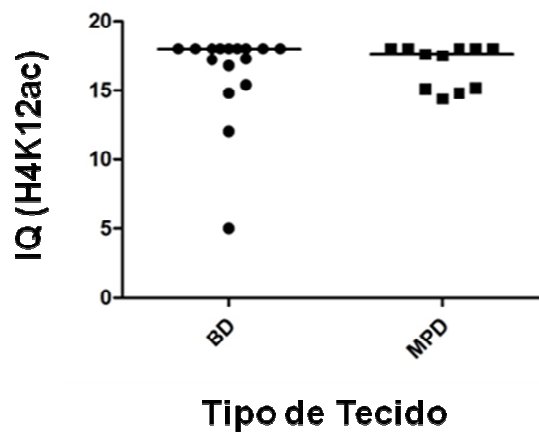
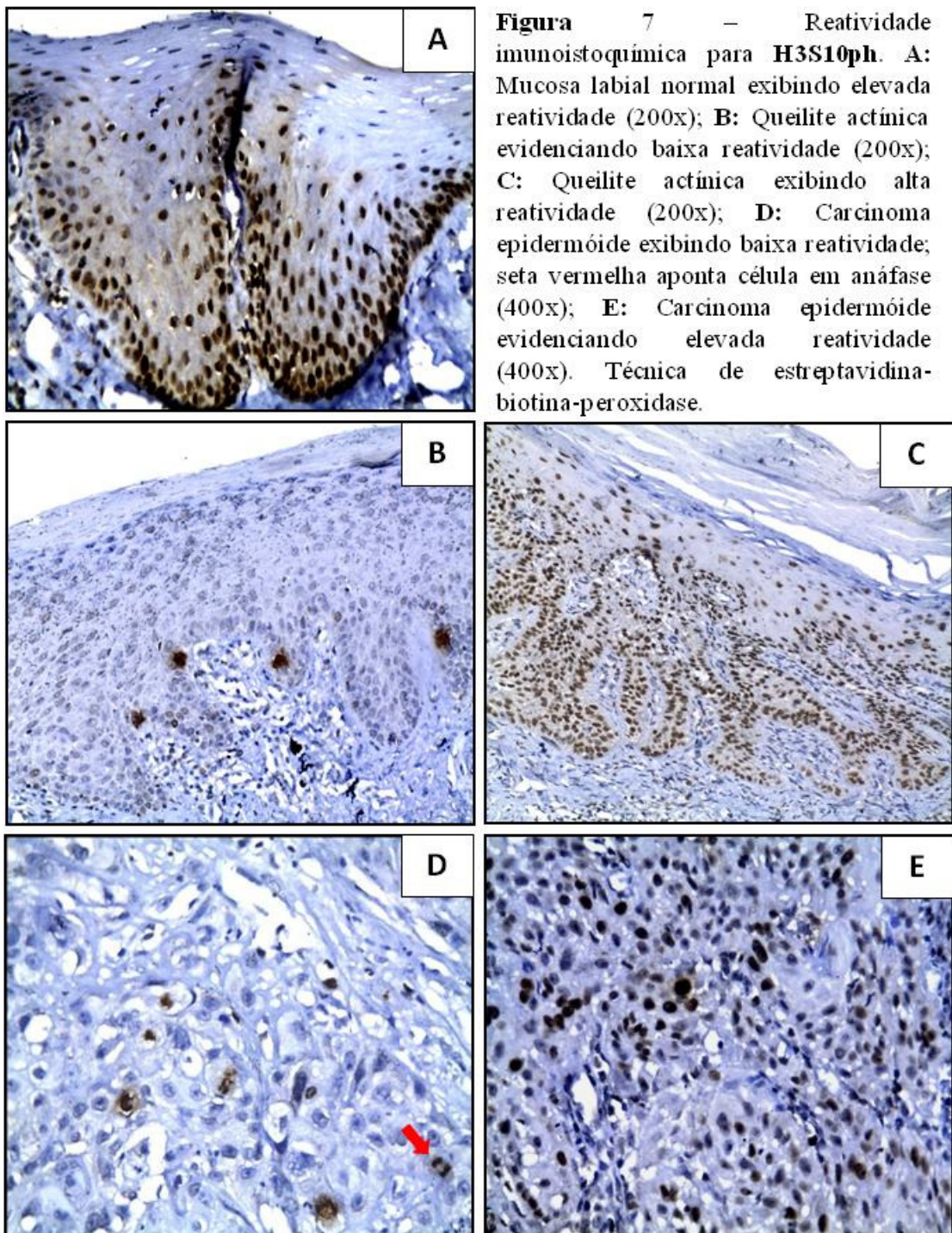


Gráfico 12 – Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H4K12ac. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,7699$). Barras centrais correspondem à mediana.

Reatividade imunoistoquímica para H3S10ph foi identificada em todas as amostras, exceto em um caso de queilite actínica. Conforme ilustrado na **Figura 7**, em mucosa normal a reatividade foi identificada em todas as camadas do epitélio de revestimento, entretanto exibiu variação de frequência e intensidade nas amostras de queilite actínica, e a distribuição foi heterogênea nas amostras de carcinomas. Apenas um caso de mucosa normal não mostrou índice de reatividade acima de 8, no entanto houve elevada heterogeneidade nos demais grupos, como mostrado no **Gráfico 13**. A média do grupo de amostras de tecido normal mostrou-se significativamente maior do que aquelas dos grupos de queilites actínicas e de carcinomas, embora entre esses dois grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Como mostrado nos **Gráficos 14 e 15**, não houve variação significativa nos índices de reatividade entre diferentes graus de displasia para queilites actínicas, ou graus de diferenciação nos carcinomas.



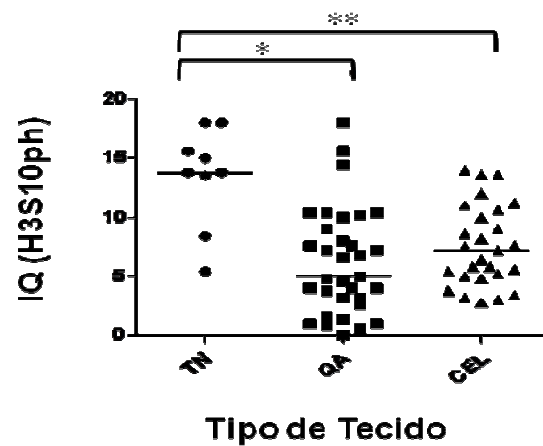


Gráfico 13 – Distribuição dos casos de tecido (lábio) normal (TN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermóide de lábio (CEL) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3S10ph. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $p = 0,0008$, com pós-teste de Dunn). Barras centrais correspondem à mediana.

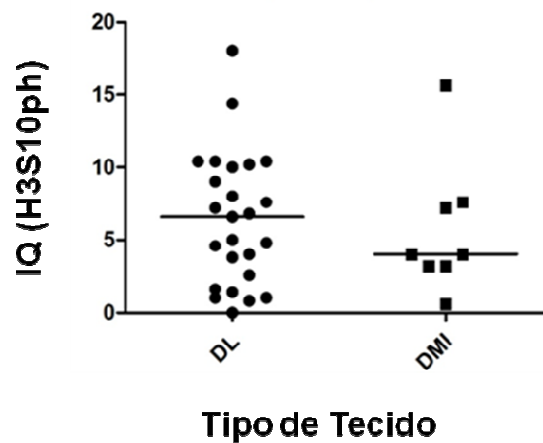


Gráfico 14 – Distribuição dos casos de QA apresentando displasia leve (DL) e displasia moderada ou intensa (DMI) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3S10ph. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,5703$). Barras centrais correspondem à mediana.

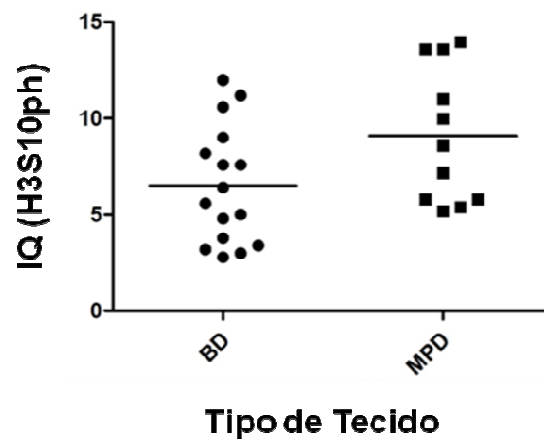


Gráfico 15 – Distribuição dos casos de CEL em bem diferenciados (BD) e moderadamente ou pouco diferenciados (MPD) segundo índice de quickscore (IQ) de reatividade imunoistoquímica para H3S10ph. Asteriscos mostram diferenças estatísticas significativas (Teste t não pareado, $p = 0,0520$). Barras centrais correspondem à média.

O índice combinado (Quickscore, IQ) médio foi de 10,4, 10,5 e 16,1, 7,7 para o estudo das modificações pós-traducionais de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph, respectivamente. Em função disso, foram definidos os valores de corte de 10 (para H3K36me3), 11 (para H3K9ac), 16 (para H4K12ac) e 8 (para H3S10ph) para segregar as amostras e então compará-las estatisticamente com parâmetros clínico-patológicos.

Os dados da associação dos resultados imunoistoquímicos segundo o índice de quickscore (IQ) (baixo e alto) com diferentes parâmetros clínico-patológicos para pacientes portadores de QA e CEL podem ser vistos nas **Tabelas 2 e 3**, respectivamente. Não foi observada correlação estatisticamente significante entre os pacientes portadores de queilite actínica. Verificou-se correlação estatisticamente significante apenas entre valor do IQ para reatividade de H3K9ac e o gênero para pacientes portadores de carcinoma epidermóide de lábio.

A associação dos achados imunoistoquímicos com demais parâmetros clínico-patológicos não foi realizada devido à falta de informações nos respectivos prontuários.

Tabela 2 – Resultados imunoistoquímicos associados com parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de QA

Características	<i>n</i>	Padrões de modificações globais de histonas											
		H3K36me3			H3K9ac			H4K12ac			H3S10ph		
		Baixo	Alto	<i>p</i>	Baixo	Alto	<i>p</i>	Baixo	Alto	<i>p</i>	Baixo	Alto	<i>p</i>
Masculino	26	12	14	0,3883	16	10	0,2028	12	14	1,0000	19	7	0,6456
Feminino	7	5	2		2	5		3	4		4	3	
≤ 60 anos	25	10	15	0,4184	15	10	1,0000	13	12	0,2419	18	7	0,6728
> 60 anos	8	5	3		5	3		2	6		5	3	
Grau I	25	11	14	1,000	13	12	0,6992	10	15	0,4184	16	9	0,3820
Grau II/Grau III	8	4	4		5	3		5	3		7	1	

(*p* < 0,05 é o nível de significância; teste exato de Fisher).

Tabela 3 – Resultados imunoistoquímicos associados com parâmetros clínico-patológicos de pacientes portadores de CEL

Características	<i>n</i>	Padrões de modificações globais de histonas											
		H3K36me3			H3K9ac			H4K12ac			H3S10ph		
		Baixo	Alto	<i>p</i>	Baixo	Alto	<i>p</i>	Baixo	Alto	<i>p</i>	Baixo	Alto	<i>p</i>
Masculino	23	15	8	1,0000	9	14	0,0407*	5	18	0,0646	13	10	0,6239
Feminino	4	3	1		4	0		3	1		3	1	
≤ 60 anos ¹	14	8	6	0,3998	5	9	0,2138	4	10	1,0000	8	6	1,0000
> 60 anos ¹	9	7	2		6	3		3	6		6	3	
Bem diferenciado	16	10	6	0,6924	8	8	1,0000	4	12	0,6754	11	5	0,2638
Moderado/ Pouco diferenciado	11	8	3		5	6		4	7		5	6	

(*p* < 0,05 é o nível de significância (*); teste exato de Fisher); 1: Análise estatística realizada com o número de casos que tinham informações disponíveis.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O perfil dos casos de queilite actínica aqui estudados é muito similar ao descrito em outras séries: a maioria dos pacientes são homens, na quinta e sexta década de vida, de pele branca, e a lesão se localiza no lábio inferior (SOUZA-LUCENA et al., 2012; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; NICO et al., 2007; SILVA et al., 2006; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; KAUGARS et al., 1999). Pelo menos 10% das queilites actínicas não tratadas devem sofrer transformação para carcinoma epidermóide, visto que essa é a proporção de casos diagnosticados clinicamente como queilite actínica, mas que na verdade já são neoplasias invasivas (MARKOPOULOS, 2004; KAUGARS, 1999). A proporção verdadeira é certamente bem maior, mas ainda não foi documentada. Estima-se que mais de duas décadas de exposição à luz solar sejam necessárias para ocorrência do processo de malignização (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012). Logo, é esperado que indivíduos portadores de carcinoma apresentem idade superior aos que são diagnosticados com queilite actínica. Neste estudo, a média de idade dos pacientes portadores de carcinoma foi de 59,7 ante 53,2 anos do outro grupo. Usualmente o carcinoma epidermóide de lábio é considerada uma doença que afeta os idosos (GÉRAUD et al., 2012).

Verificou-se ausência do registro da ocupação de grande parte dos pacientes. O registro incompleto de informações em saúde é um fato reconhecido em diferentes países, e tem sido atribuído ao desconhecimento da relevância das informações colhidas, situação provavelmente decorrente de falhas no ensino (CHONG et al., 2014; PESSIAN; BECKETT, 2004). A ausência do registro de ocupação, no presente estudo, é preocupante, uma vez que o principal fator etiológico na patogênese da queilite actínica e do carcinoma é a radiação UV (NEVILLE et al., 2002; MOORE et al., 1999). Não obstante, a maioria dos pacientes aqui apresentados com informações disponíveis tem trabalho com exposição à luz solar (SOUZA et al., 2011; LÓPEZ et al., 2003).

Junto ao trabalho com exposição ao ar livre, o tabagismo tem sido mencionado como fator etiológico para a queilite actínica (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004), ainda que faltem dados que esclareçam o seu papel na patogênese do câncer de lábio (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; MOORE et al., 2009; VISSCHER et al., 1998a). Em relação à informação sobre tabagismo disponível nas fichas de requisição de exames e prontuários, todos que apresentavam informação confirmaram o uso do cigarro.

Outras variáveis clínico-patológicas investigadas do grupo de casos de carcinoma epidermóide, como, por exemplo, o gênero, a cor/raça, a localização das lesões e até mesmo a

ocupação daqueles que possuíam informações nos prontuários estão de acordo com os achados da literatura (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010). A pele branca constitui um fator favorável ao desenvolvimento das lesões causadas pela radiação UV, devido a uma menor quantidade de melanina, esta que proporciona proteção ao material genético das células (VERMEER et al., 1991). Indivíduos de pele escura possuem lábios protegidos na mesma proporção da pele em relação à ação dos raios UVB, visto que a carcinogênese para pele e lábio são igualmente descritas (GOLDSON et al., 1981). Por outro lado, é curiosa a observação de que a energia da radiação solar UVB, através da produção de vitamina D, reduz o risco de desenvolvimento de câncer em órgãos internos e proporciona maiores chances de sobrevida (GRANT, 2014).

A UV tem efeitos importantes na saúde humana, mas tanto a radiação solar ou a radiação UV artificial, com destaque para UVB, podem provocar efeitos deletérios às células e à matriz extracelular, bem como disfunção imunológica, expondo o indivíduo a um risco maior para o desenvolvimento de diversas doenças (GALLAGHER; LEE, 2006; DUTHIE; KIMBER; NORVAL, 1999).

Microscopicamente, a displasia é a principal alteração epitelial evidente nas lesões de queilite actínica (VIEIRA et al., 2012; KAUGARS, 1999). As displasias leves foram as mais frequentes nas lesões avaliadas neste estudo, fato também evidenciado por outros trabalhos (ARAÚJO et al., 2012; NETO PIMENTEL et al., 2006; KAUGARS et al (1999). Entretanto, ainda é difícil afirmar o grau de atipia epitelial mais comum nestas lesões devido aos diferentes resultados apresentados em outras pesquisas (PIÑERA-MARQUES et al., 2010; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004).

Não há evidências que as lesões de queilite actínica passem por todos os graus de displasias até o desenvolvimento de um carcinoma (COSTA, 2011). A validade do sistema de gradação da OMS, que permite três classificações de displasia (leve, moderada e intensa), tem sido questionada, uma vez que a gravidade da displasia nem sempre se associa ao risco de transformação maligna (DOST et al., 2014). Outros critérios de classificação das displasias epiteliais foram propostos por Kujan et al. (2006) em que uma das vantagens é classificação das displasias moderadas em baixo ou alto risco de transformação maligna. A classificação Ljubljana possui validade de aplicação para lesões hiperplásicas do epitélio oral (ZERDONER, 2003). Apesar das reconhecidas classificações das displasias, a previsibilidade do grau de atipia em uma lesão é desafiador, uma vez que a displasia epitelial oral não está associada com uma aparência clínica específica e a biópsia se faz necessária (REIBEL, 2003).

Para além das alterações da diferenciação e da proliferação epiteliais, o fotoenvelhecimento da região labial é caracterizado por desarranjo do colágeno e também por falha na substituição do colágeno danificado (BILAÇ; ŞAHİN; ÖZTÜRKCAN, 2014), além do acúmulo de material basofílico rico em fibras elásticas (elastina), alteração conhecida como elastose solar (BILAÇ; ŞAHİN; ÖZTÜRKCAN, 2014; ARAÚJO et al., 2007). Essa transformação intersticial parece ser determinada por redução na solubilidade e aglutinação da elastina mediante exposição à radiação UV (YOSHINAGA et al., 2012).

Apesar da grande quantidade de elastina presente em casos de displasia severa, a quantidade desta molécula de matriz extracelular não se correlaciona com o grau de displasia em lesões de queilite actínica, portanto sua quantificação não possui validade clínica (ARAÚJO et al., 2012). Não obstante, a elastose solar é um achado essencial para caracterizar as lesões como queilite actínica.

A quantificação do processo inflamatório, não avaliado neste estudo, parece ser importante na evolução das lesões de queilite actínica. Inflamação significativa está mais comumente associada aos casos de displasia intensa ou ao desenvolvimento de carcinoma epidermóide de lábio adjacente às áreas de queilite actínica (JADOTTE et al., 2012; NETO PIMENTEL et al., 2006).

Os mecanismos genéticos no câncer bucal e em lesões potencialmente cancerizáveis são bem documentados, enquanto que o estudo das alterações epigenéticas é recente e escasso (GONZÁLEZ-RAMIREZ et al., 2014). Mecanismos epigenéticos podem alterar a expressão de vários genes importantes para o desenvolvimento do câncer, tais como os genes supressores tumorais, sem alterar a sequência de nucleotídeos na molécula de DNA (SHAW, 2006).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a existência de algumas modificações de histonas em amostras de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio. Estes dois grupos foram comparados entre si e a um grupo controle, composto por amostras de mucosa de lábio normal, em busca de informações potencialmente úteis ao conhecimento do mecanismo de desenvolvimento e evolução das doenças de interesse, bem como ao seu diagnóstico. Foram analisadas áreas que continham tecido epitelial de revestimento em lesões de queilite actínica e as células epiteliais neoplásicas em amostras de carcinoma epidermóide. Epitélio de revestimento adjacente à área tumoral (margem) dos carcinomas não foi analisado neste estudo, mas poderia revelar informações importantes.

Estudos com a avaliação das modificações de histonas em amostras de carcinoma epidermóide bucal são limitados e os trabalhos publicados na literatura apresentaram-se

similares a este estudo em relação ao uso da técnica de imunoistoquímica e proposta de análise comparativa a diversos parâmetros clínico-patológicos (SANT'ANA, 2014; CHEN et al. 2013a; CHEN et al., 2013b). Ressalta-se que apenas um estudo avaliou modificações de histonas em amostras de carcinoma epidermóide de lábio, entretanto limitado a oito casos dentre um número muito maior de neoplasias intrabuciais (CHEN et al., 2013a). Portanto, não há estudos referentes à avaliação das modificações globais de histonas em lesões específicas de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio, ou seja, ainda não está elucidado o papel desses fenômenos na carcinogênese e progressão tumoral das lesões de lábio induzidas por radiação UV.

A trimetilação da lisina 36 da histona H3 (H3K36me3) foi investigada neste estudo por seu divulgado envolvimento com a ativação da transcrição (TABY; ISSA, 2010), bem como por relatos anteriores que mostraram o envolvimento da metilação com o reparo do DNA. A trimetilação de H3K36, *in vivo*, é necessária para recrutamento de uma proteína de reconhecimento *mismatch* (hMutS α) na cromatina através de interação com um domínio específico; células com ausência da enzima trimetiltransferase SETD2, a qual é responsável pela ação catalítica de H3K36, exibiram instabilidade de microssatélite e elevada frequência de mutação espontânea (LI et al., 2013).

Nas amostras analisadas, foi detectada maior reatividade de H3K36me3 no tecido normal quando comparado ao epitélio da lesão potencialmente maligna (queilite actínica) e das células neoplásicas dos carcinomas. Questiona-se a possibilidade de que a frequência reduzida dessa metilação possa de alguma forma estar relacionada com redução seletiva da expressão gênica, de forma a inibir, por exemplo, a atuação de genes supressores de tumor.

Ainda, é possível supor que no tecido normal as condições de reparo do DNA são mais efetivas em comparação aos tecidos que apresentam displasia ou neoplasia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos queilite actínica e carcinoma epidermóide, entretanto à medida que as células tornam-se mais agressivas nota-se uma tendência de diminuição da reatividade para esta trimetilação, e provavelmente limitação da capacidade de reparo do DNA. É provável que os baixos índices de H3K36me3 colaborem para a fotocarcinogênese em lábio. A partir de estudos evidenciando o papel de enzimas relacionadas a fenômenos epigenéticos levanta-se a hipótese de aplicação terapêutica direcionada a estes eventos (SIMON et al., 2014).

Níveis de H3K36me3 não apresentaram associação significativa com parâmetros clínico-patológicos nos grupos avaliados. Este achado foi semelhante ao observado por Sant'Ana (2014) em que não foi possível correlacionar a imunoexpressão de H3K36me3 com

variáveis clínico-patológicas para pacientes portadores de tumores primários não metastáticos e primários metastáticos de carcinoma epidermóide bucal. Entretanto, uma correlação significativa já foi demonstrada entre a imunexpressão de H3K36me3 e metástases em linfonodos para pacientes portadores de câncer colorretal (TAMAGAWA et al., 2013).

Neste trabalho foram também avaliadas a acetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9ac) e da lisina 12 da histona H4 (H4K12ac). A escolha destas duas moléculas foi motivada pelos registros na literatura envolvendo a acetilação de histonas com o processo de transcrição (TABY; ISSA, 2010; KOUZARIDES, 2007), além de serem amplamente investigadas em vários tipos de cânceres (CHERVONA; COSTA, 2012).

Yu et al. (2005) observaram que a hiperacetilação de histonas H3 em cromatina repressiva do gene *MFA2* de *Saccharomyces cerevisiae* facilitou a reparação de danos ao DNA causados pela radiação UV e estes níveis reduziram à medida que se prosseguiu o reparo; sugeriram ainda que os fenômenos de acetilação das histonas e remodelação da cromatina ocorrem para garantir o reparo da cromatina repressiva.

Os dados apurados da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac foram de diminuição significativa nas amostras de queilite actínica em relação às amostras de tecido normal, e maior variação em amostras de carcinomas epidermóides. Sabendo-se que as células epiteliais das lesões de queilite actínica acumulam numerosos danos ao DNA em decorrência da exposição à radiação UV, esperava-se elevada reatividade imunoistoquímica para H3K9ac (hiperacetilação) nestas lesões (Yu et al. (2005), fato que não pôde ser evidenciado.

Não foi observada diferença significativa da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac entre tecido normal e neoplásico. Entretanto, alguns casos de carcinoma mostraram-se altamente reativos para H3K9ac, sugerindo aumento da expressão gênica e aparentemente da capacidade de reparo do DNA. Os resultados deste estudo para H3K9ac foram semelhantes à análise de Nakazawa et al. (2012), em que não houve diferença de imunexpressão de H3K9ac entre neoplasmas colorretais e o tecido normal. Esta reatividade do tecido neoplásico similar ao tecido normal sugere uma cromatina acessível e ativada, e alta taxa de proliferação celular.

A associação da imunorreatividade de H3K9ac com parâmetros clínico-patológicos exibiu associação estatisticamente significativa apenas com o gênero de portadores de carcinoma epidermóide de lábio. No estudo de Sant'Ana (2014) houve uma significância entre o índice de absorbância de H3K9ac e o gênero entre os dois grupos estudados, sendo ainda associado com prognóstico e distinção de tumores metastáticos e não metastáticos em

portadores de carcinoma epidermóide bucal. Em amostras de carcinoma de pulmão de células não pequenas a expressão imunoistoquímica de H3K9ac foi correlacionada inversamente com recorrência da doença e metástases à distância (SONG et al., 2012).

Resultados da reatividade imunoistoquímica de H4K12ac foram semelhantes aos observados para H3K9ac, com diferença estatisticamente significativa apenas entre amostras de lábio normal e de queilites actínicas. Considerando que a acetilação promove afrouxamento da cromatina e atividade transcricional (TABY; ISSA, 2010; KOUZARIDES, 2007), provavelmente este evento estaria reduzido nas células epiteliais das amostras de queilite actínica. Entretanto, a elevada acetilação de H4K12 observada nas células neoplásicas dos carcinomas sugere aumento da transcrição e da atividade mitótica. Ressalta-se que a avaliação imunoistoquímica de marcadores moleculares que avaliam a proliferação celular, a exemplo de Ki-67, pode ser associada com o estudo das modificações pós-traducionais de histonas, uma vez que estas modificações podem induzir transcrição e consequentemente estimular a proliferação celular (SAMARTZIS et al., 2011, TSUTA et al., 2011; KULKARNI et al., 2007).

Van Den Breck et al. (2008) mostraram redução da expressão de H4K12ac em células tumorais de carcinoma de pulmão de células não pequenas, enquanto que Puppin et al. (2011) observaram elevada expressão de H4K12ac em adenomas foliculares de tiróide, ambos estudos realizaram comparação entre tecido neoplásico benigno e o tecido normal. Estes achados indicam que existem diferenças do perfil de expressão das modificações de histonas nas mais diferentes neoplasias e tecidos humanos, porém os resultados deste estudo não mostraram diferenças significativas da reatividade imunoistoquímica entre o tecido normal e neoplásico para H4K12ac.

A expressão imunoistoquímica de H4K12ac pode ser preditiva de prognóstico para alguns tipos de cânceres (CHERVONA; COSTA, 2012). A elevada expressão imunoistoquímica de H4K12 foi associada à pior sobrevida em pacientes portadores de adenocarcinoma de pâncreas (JULIANO, 2012), e moderado a baixos níveis de H4K12ac foram observados em subtipos de carcinomas de mama com pior prognóstico (ELSHEIKH et al., 2009). Dos 27 casos de carcinoma epidermóide de lábio deste estudo há relato de apenas quatro mortes em decorrência da doença, e a avaliação da reatividade imunoistoquímica para as diferentes modificações pós-traducionais de histonas estudadas, em especial as que se relacionam à acetilação, exibiram enorme variação, não havendo, portanto ensaios de correlação com parâmetros clínico-patológicos.

O estudo da fosforilação da serina 10 da histona H3 justifica-se por esta fosforilação indicar atividade proliferativa (LADSTEIN et al., 2012; TSUTA et al., 2011; FUKUSHIMA et al., 2009; NASR; EL-ZAMMAR, 2008; IDIKIO, 2006). H3S10ph correlaciona-se com o afrouxamento da cromatina e atividade transcricional (interfase) e também com a condensação dos cromossomos (mitose) (PRIGENT; DIMITROV, 2003).

Elevada reatividade imunoistoquímica para H3S10ph foi observada em amostras de mucosa labial com aspectos histológicos de normalidade, e decréscimo significativo nas amostras de queilite actínica e carcinomas epidermóides de lábio. Foi observado menor frequência de reatividade no grupo das queilites actínicas em comparação ao grupo dos carcinomas, não havendo diferença entre estes grupos. A reatividade imunoistoquímica para H3S10ph não possui valor útil em segregar lesões com displasia leve em comparação ao grupo displasias moderada ou intensa; igualmente entre os grupos de carcinomas bem e moderadamente/pouco diferenciados. Este resultado foi observado também nas demais modificações de histonas investigados neste estudo. A ausência ou baixa reatividade para H3S10ph em amostras de queilite actínica pode ser explicado pela característica histopatológica de atrofia encontrada no epitélio das lesões.

A marcação imunoistoquímica para H3S10ph colabora na identificação de células em proliferação, uma vez que a fosforilação de H3S10 inicia-se antes da prófase, e nesta fase as mitoses não podem ser identificadas por HE (VERAS et al., 2009). A figura 7(D) deste estudo mostra uma célula neoplásica em anáfase, confirmando os achados de Veras et al. (2009). A contagem de mitoses por avaliação imunoistoquímica de H3S10ph apresentou-se confiável em carcinomas neuroendócrinos de pulmão (TSUTA et al., 2011).

Aurora quinase A e B atuam sobre H3S10, promovendo sua fosforilação, e a desregulação de Aurora quinase A, proteína reguladora na transição da fase G₂ para mitose, pareceu ser um evento precoce no desenvolvimento de carcinoma de ovário (KULKARNI et al., 2007). Em células epiteliais de camundongos, a fosforilação de H3S10ph após radiação UVB ocorreu através da ação das enzimas MAP quinases ERK e p38 (ZHONG; MA; DONG, 2000). A investigação de proteínas enzimáticas responsáveis pelas modificações pós-traducionais de histonas e seus substratos podem trazer esclarecimentos sobre o desenvolvimento de lesões induzidas por radiação UV.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

1. Há evidências de uma possível participação de H3K36me3 na carcinogênese das lesões em lábio causadas por radiação UV.
2. Elevada reatividade imunoistoquímica para H3K9ac em carcinoma epidermóide de lábio sugere fortemente tratar-se de pacientes do gênero masculino.
3. Os índices de H3K9ac e H4K12ac sugerem participação dessas modificações no início do processo de carcinogênese em lábio, mas não na progressão tumoral.
4. O decréscimo de H3S10ph nas amostras avaliadas indica provável participação desta modificação de histona no processo de carcinogênese e progressão tumoral.
5. Os achados imunoistoquímicos indicam variações do perfil de expressão das modificações de histonas entre tecidos normais e os que apresentam distúrbios do crescimento celular.
6. A reatividade imunoistoquímica para os anticorpos investigados neste estudo não possui valor útil em segregar lesões com displasia leve em comparação ao grupo displasias moderada ou intensa e igualmente entre os carcinomas bem diferenciados comparado aos moderadamente/pouco diferenciados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. A. M. M. et al. Squamous cell carcinoma of the lip: assessment of prognostic factors. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.70, n.6, p. 765-770, nov/dec 2004.
- ABREU, L.; KRUGER, E.; TENNANT, M. Lip cancer in Western Australia, 1982-2006: a 25-year retrospective epidemiological study. **Aust Dent J**, v. 54, n.2, p. 130-135, Jun 2009.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Tradução de Ana Letícia de Souza Vanz et al. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1.268 p.
- ANTONIADES, D. Z. et al. Squamous cell carcinoma of the lips in a northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate-I. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 31B, n. 5, p.333-339, Sep 1995.
- ARAÚJO, C. P. Queilite actínica: um estudo de 35 casos com destaque para os aspectos morfológicos. **RPG Rev Pós Grad**, v. 19, n. 1, p. 21-26, Jan-Mar 2012.
- BACHMAN, K. E. et al. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. **Cancer Cell**, v. 31, n. 1, p. 89-95, Jan 2003.
- BARNES, I. et al (Eds). **Pathology and genetics: Neck tumours** (World Health Organization Classification of Tumours) IARC Press: Lyon, 2005.370 p.
- BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. e74-79, Mar 2010.
- BILAÇ, C.; ŞAHİN, M. T.; ÖZTÜRKCAN, S. Chronic actinic damage of facial skin. **Clin Dermatol**, v. 32, n. 6, p. 752-762, Dec 2014.
- BISCHOFF, J. R. et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. **EMBO J**, v. 17, n. 1, p. 3052-3065, Jun 1998.
- CAO, W. et al. EZH2 promotes malignant phenotypes and is a predictor of oral cancer development in patients with oral leukoplakia. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 4, n. 11, p. 1816-1824, Nov 2011.
- CARDESA, A. et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes, L.; Eveson, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. World Health Organization Classification of Tumors. **Pathology and genetics: head and neck tumors**. Lyon: IARC Press; 2005.
- CARROZZA, M. J. et al. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. **Trends Genet**, v. 19, n. 6, p. 321-329, Jun 2003.
- CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 3, p. 498-503, Mar 2008.

CHEN, Y. K. et al. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. **Oral Oncol**, v. 35, n. 2, p. 173-179, Mar 1999.

CHEN, Y. W. et al. Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 119, n. 24, p. 4.259-4.267, Dec 2013a.

CHEN, J. H. et al. High expressions of histone methylation- and phosphorylation-related proteins are associated with prognosis of oral squamous cell carcinoma in male population of Taiwan. **Med Oncol**, n. 30, v. 2, p. 1-9, Jun 2013b.

CHONG, J. A. et al. Clinical Audit Teaching in Record-Keeping for Dental Undergraduates at International Medical University, Kuala Lumpur, Malaysia. **Journal of Dental Education**, v. 78, n. 2, Feb 2014.

CHERVONA, Y.; COSTA, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis?. **Am J Cancer Res**, v. 2, n. 5, p. 589-597, Aug 2012.

CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. **Annu Rev Biochem**, v. 78, p. 273-304, 2009.

CZERNINSKI, R.; ZINI, A.; SGAN-COHEN, H. D. Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. **Br J Dermatol**, v. 162, n. 5, p. 1.103-1.109, May 2010.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, Jul 2012.

DECKERT, J.; STRUHL, K. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 8, p. 2726-2735, Apr 2001.

DETRE, S.; JOTTI, G. S.; DOWSETT, M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **J Clin Pathol**, v. 48, p. 876-878, 1995.

DÍEZ-PÉREZ, R et al. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). **Oncol Rep**, v. 25, n. 5, p.1203-1209, May 2011.

DOST, F. et al. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: a real-world evaluation of histopathologic grading. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 117, n. 3, p. 343-352, Mar 2014.

DUTHIE, M. S.; KIMBER, I.; NORVAL, M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. **Br J Dermatol**, v. 140, n. 6, p. 995-1009, Jun 1999.

ELLINGER, J. et al. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 127, n. 10, p. 2.360-2.366, Nov 2010.

ELLIS, L.; PILI, R. Histone Deacetylase Inhibitors: Advancing Therapeutic Strategies in Hematological and Solid Malignancies. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 3, n. 8, p. 2.411-2.469, Aug 2010.

ELSHEIKH, S. E. et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. **Cancer Res**, v. 69, n. 9, p. 3802-3809, May 2009.

ESTELLER, M. et al. A Gene Hypermethylation Profile of Human Cancer. **Cancer Res**, v. 61, p. 3225-3229, Apr 2001.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med**, v. 358, n. 11, p. 1.148-1.159, Mar 2008.

FUKUSHIMA, S. et al. Sensitivity and usefulness of anti-phosphohistone-H3 antibody immunostaining for counting mitotic figures in meningioma cases. **Brain Tumor Pathol**, v. 26, n. 2, p. 51-57, 2009.

GALE, N. et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes, L.; Eveson, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. World Health Organization Classification of Tumors. **Pathology and genetics: head and neck tumors**. Lyon: IARC Press; 2005.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 92, n. 1, p. 119-131, Sep 2006.

GARCÍA-CAO, M. et al. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. **Nat Genet**, v. 36, n. 1, p. 94-99, Jan 2004.

GÉRAUD, C. et al. Lip cancer: retrospective analysis of 181 cases. **J Dtsch Dermatol Ges**, v. 10, n. 2, p. 121-127, Feb 2012.

GOLDSON, A. et al. Is there a genetic basis for the differences in cancer incidence between Afro-Americans and Euro-Americans? **J Natl Med Assoc**, v. 73, n. 8, p. 701-706, Aug 1981.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, I. et al. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms and clinical implications. **Oral Dis**, v. 17, n. 8, p. 771-778, Nov 2011.

GOORIS, P. J. et al. Radiotherapy for cancer of the lip. A long-term evaluation of 85 treated cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 86, n. 3, p. 325-330, Sep 1998.

GRANT, W. B. Solar ultraviolet irradiance and cancer incidence and mortality. **Adv Exp Med Biol**, v. 624, p. 16-30, 2014.

GREGORY, P. D. et al. Histone acetylation and chromatin remodeling. **Exp Cell Res**, v. 265, n. 2, p. 195-202, May 2001.

HAPPEL, N.; DOENECKE, D. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. **Gene**, v. 431, n. 1-2, p. 1-12, Feb 2009.

HIDESHIMA, T.; ANDERSON, K. C. Histone deacetylase inhibitors in the treatment for multiple myeloma. **Int J Hematol**, v. 97, n. 3, p. 324-332, Mar 2013.

HUIDOBRO, C.; FERNANDEZ, A. F.; FRAGA, M. F. Aging epigenetics: causes and consequences. **Mol Aspects Med**, v. 34, n. 4, p. 765-781, Jul-Aug 2013.

IDIKIO, H. A. Spindle checkpoint protein hMad2 and histone H3 phosphoserine 10 mitosis marker in pediatric solid tumors. **Anticancer Res**, v. 26, n. 6C, p. 4687-4694, Nov-Dec 2006.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2013.

ISSA, J. P. Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 1, n. 4, p. 219-222, Sep 2008.

JADOTTE, Y. T., SCHWARTZ, R. A. Solar cheilosis: an ominous precursor: part I. Diagnostic insights. **J Am Acad Dermatol**, v. 66, n. 2, p. 173-184, Feb 2012.

JITHESH, P. V. et al. The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, n. 108, v. 2, p.370-379, Feb 2013.

JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, I. et al (Eds). **Pathology and genetics: Neck tumours** (World Health Organization Classification of Tumours) IARC Press: Lyon, 2005. p. 168-175.

JOHNSTONE, R. W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 4, p.287-299, Apr 2002.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The epigenomics of cancer. **Cell**,v. 128, n. 4, p. 683-692, Feb 2007.

JULIANO, C. N. **Avaliação do padrão de acetilação das histonas por técnica imuno-histoquímica em adenocarcinoma de pâncreas: influência epigenética na carcinogênese**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

KANAI Y. Alterations of DNA methylation and clinicopathological diversity of human cancers. **Pathol Int**, v. 58, n. 9, p. 544-558, Sep 2008.

KAUGARS, G.E. et al. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**,v. 88, n. 2, p. 181-186, Aug 1999.

KIRSCHMANN, D. A. et al. Down-regulation of HP1Hsalph expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer. **Cancer Res**, v. 60, n. 13, p.3359-3363, jul 2000.

KONDO, Y. et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. **Nat Genet**,v. 40, n. 6, p. 741-750, Jun 2008.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**,v. 128, n. 4, p. 693-705, Feb 2007.

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

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral oncology**, v. 42, p. 987-993, 2006.

KULKARNI, A. A. et al. DNA replication licensing factors and aurora kinases are linked to aneuploidy and clinical outcome in epithelial ovarian carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 20, p. 6153-6161, Oct 2007.

LENNARTSSON, A.; EKWALL, K. Histone modification patterns and epigenetic codes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1790, n. 9, p. 863-868, Sep 2009.

LI, F et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α . **Cell**, v. 153, n. 3, p. 590-600, Apr 2013.

LÓPEZ, E. PM. et al. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. **Br J Cancer**, v. 88, n. 11, p. 1702-1707, Jun 2003.

MARCINKIEWICZ, K. M.; GUDAS, L. J. Altered histone mark deposition and DNA methylation at homeobox genes in human oral squamous cell carcinoma. **J Cell Physiol**, v. 229, n. 10, p. 1405-1416, Oct 2014.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis**, v. 10, n. 4, p. 212-216, Jul 2004.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 838-849, Nov 2005.

MARTINEZ, D. R. et al. H3K79me3T80ph is a Novel Histone Dual Modification and a Mitotic Indicator in Melanoma. **J Skin Cancer**, v. 2012, Nov 2012.

MARTINS-FILHO, P. R.; SILVA, L. C.; PIVA, M. R. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. **Int J Dermatol**, v. 50, n. 9, p. 1109-1114, Sep 2011.

MASCOLO, M. et al. Tissue Microarray-Based Evaluation of Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1)/p60 as Tumour Prognostic Marker. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 9, p. 11044-11062, 2012.

MINARDI, D. et al. Prognostic role of global DNA-methylation and histone acetylation in pT1a clear cell renal carcinoma in partial nephrectomy specimens. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 8B, p. 2115-2121, Aug 2009.

MOORE, S. et al. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. **Oral Dis**, v. 5, n. 3, p. 185-195, Jul 1999.

NAKAZAWA, T. et al. Global histone modification of histone H3 in colorectal cancer and its precursor lesions. **Hum Pathol**, v. 43, n. 6, p. 834-842, Jun 2012.

- NASR, M. R.; EL-ZAMMAR, O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. **Am J Dermatopathol**, v. 30, n. 2, p. 117-122, Apr 2008.
- NETO PIMENTEL, D. R. et al. Actinic cheilitis: histopathology and p53. **J Cutan Pathol**, v. 33, n. 8, p. 539-544, Aug 2006.
- NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral & maxilofacial**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- NICO, M. M. S.; RIVITTI, E. A.; LOURENÇO, S. V. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. **J Cutan Pathol**, v. 34, n. 4, p. 309-314, Apr 2007.
- NICOLAU, S. G.; BAELUS, L. chronic actinic cheilitis and cancer of the lower lip. **Br J Dermatol**, v. 76, p. 278-289, Jun 1964.
- NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 1, p. 21-32, Jan 2001.
- ONOFRE, M. A. et al. Potentially malignant epithelial oral lesions: discrepancies between clinical and histological diagnosis. **Oral Dis**, v. 3, n. 3, p. 148-152, Sep 1997.
- OSTERLIND, A. Cancer and UV-radiation. **Pharmacol Toxicol**, v. 72, Suppl 1, p. 67-68, 1993.
- OSTERNE, R. L. et al. Lip lesions in a Brazilian population. **J Craniofac Surg**, v. 22, n. 6, p. 2.421-2.425, Nov 2011.
- PEREIRA, C. M. **Avaliação do nível de expressão *MAGE A1* e *BORIS* e do perfil de metilação em carcinoma de células escamosas bucal**. 2011. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas. Área de concentração: Farmacologia, Bioquímica e Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- PESSIAN, F.; BECKETT, H. A. Record keeping by undergraduate dental students: A clinical audit. **British Dental Journal**, v. 197, n. 11, p. 703-705, Dec 2004.
- PIÑERA-MARQUES, K. et al. Actinic lesions in fishermen's lower lip: clinical, cytopathological and histopathologic analysis. **Clinics**, v. 65, n. 4, p. 363-367, Apr 2010.
- PREMI, S. et al. Chemiexcitation of melanin derivatives induces DNA photoproducts long after UV exposure. **Science**, v. 327, n. 6224, p. 842-847, Feb 2015.
- PRIGENT, C.; DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? **J Cell Sci**, v. 116, n. 18, p. 3677-3685, Sep 2003.
- PUPPIN, C. et al. Levels of histone acetylation in thyroid tumors. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 411, n. 4, p. 679-683, Aug 2011.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia oral: correlações clínico-patológicas**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

RICARDO, P. L. G. A. **Proteínas e polimorfismos de genes de reparo de DNA na fotocarcinogênese em lábio**. 2009. 85 f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ROACH, H. I.; BRONNER, F.; OREFFO, R. O. C. **Epigenetic Aspects of Chronic Diseases**. 1 ed. Londres: Springer-Verlag London Limited, 2011. p.1-20.

ROGENHOFER, S. et al. Decreased levels of histone H3K9me1 indicate poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. **Anticancer Res**, v. 32, n. 3, p. 879-886, Mar 2012a.

ROGENHOFER, S. et al. Global histone H3 lysine 27 (H3K27) methylation levels and their prognostic relevance in renal cell carcinoma. **BJU Int**, v. 109, n. 3, p.459-465, Feb 2012b.

ROGERS III, R. S.; BEKIC, M. Diseases of the lips. **Semin Cutan Med Surg**, v. 16, n. 4, p. 328-336, Dec 1997.

SAKUMA, T. et al. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 29, n. 1, p. 117-124, Jul 2006.

SAMARTZIS, N. et al. Expression pattern of class I histone deacetylases in vulvar intraepithelial neoplasia and vulvar cancer: a tissue microarray study. **BMC Cancer**, v. 26, n. 11, p. 463-470, Oct 2011.

SANT'ANA, J. M. A. **Expressão global de histonas ativadoras e repressoras da atividade transcricional de genes em uma amostra de carcinoma epidermóide da cavidade bucal metastático e não metastático e a associação delas com variáveis clínico-patológicas de importância prognóstica**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SANTOS, H. B. et al. Histopathological grading systems and their relationship with clinical parameters in lower lip squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 5, p. 539-545, May 2014..

SARGERAN, K. et al. Survival after lip cancer diagnosis. **J Craniofac Surg**, v. 20, n. 1, p. 248-252, Jan 2009.

SCHWARTZ, R. A. et al. Actinic keratosis: an occupational and environmental disorder. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 22, n. 5, p. 606-615, May 2008.

SHAW, R. The epigenetics of oral cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 35, n. 2, p. 101-108, Feb 2006.

- SHIOTA, M. et al. Human heterochromatin protein 1 isoform HP1beta enhances androgen receptor activity and is implicated in prostate cancer growth. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 2, p. 455-467, May 2010.
- SILVEIRA, E. J. D. et al. Lesões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, n. 3, p. 233-238, Jun 2009.
- SIMON, J. M. et al. Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects. **Genome Res**, v. 24, n. 2, p. 241-250, Feb 2014.
- SMITH, M. M. Histone structure and function. **Curr Opin Cell Biol**, v. 3, n. 3, p. 429-437, Jun 1991.
- SONG, J. S. et al. Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients. **Pathol Int**, v. 62, n. 3, p. 182-190, Mar 2012.
- SOUZA, R. L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 6, p. 757-762, Sep 2011.
- SOUZA LUCENA, E. E. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis**, v. 18, n. 6, p. 575-579, Sep 2012.
- TABY, R.; ISSA, J. P. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin**, v. 60, n. 6, p. 376-392, Nov-Dec 2010.
- TAMAGAWA, H. et al. Global histone modification of H3K27 correlates with the outcomes in patients with metachronous liver metastasis of colorectal cancer. **Eur J Surg Oncol**, v. 39, n. 6, p. 655-661, Jun 2013.
- TSUTA, K. et al. Using the mitosis-specific marker anti-phosphohistone H3 to assess mitosis in pulmonary neuroendocrine carcinomas. **Am J Clin Pathol**, v. 136, n. 2, p. 252-259, Aug 2011.
- VAN DEN BROECK, A. et al. Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 22, p. 7237-7245, Nov 2008.
- VERAS, E. et al. Mitosis-specific marker phospho-histone H3 in the assessment of mitotic index in uterine smooth muscle tumors: a pilot study. **Int J Gynecol Pathol**, v. 28, n. 4, p. 316-321, Jul 2009.
- VERMEER, M. et al. Effects of ultraviolet B light on cutaneous immune responses of humans with deeply pigmented skin. **J Invest Dermatol**, v. 97, p. 729-734, 1991.
- VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, n. 1, p. 105-114, Jan-Feb 2012.

- VIRANI, S. et al. Cancer epigenetics: a brief review. **ILAR J**, v. 53, n. 3-4, p. 359-369, 2012.
- VISSCHER, J. G. et al. Surgical margins for resection of squamous cell carcinoma of the lower lip. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 31, n. 2, p. 154-157, Apr 2002.
- VISSCHER, J. G.; WAAL, I van der. Etiology of cancer of the lip. A review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 27, n. 3, p. 199-203, Jun 1998a.
- VISSCHER, J. G. et al. Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the lower lip: evaluation of long-term results and prognostic factors--a retrospective analysis of 184 patients. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 56, n. 7, p. 814-820, Jul 1998b.
- WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, Apr-May 2009.
- WIDOM, J. Chromatin structure: linking structure to function with histone H1. **Curr Biol**, v. 8, n. 22, p. R788-791, Nov 1998.
- WOLFFE, A. **Cromatin: Structure & Function**. 3 ed. Bethesda: Academic Press, 1998.
- WOOD, N. H. et al. Actinic cheilitis: a case report and a review of the literature. **Eur J Dent**, v. 5, n. 1, p. 101-106, Jan 2011.
- YANG, X. J. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. **Nucleic Acids Res**, v. 32, n. 3, p. 959-976, Feb 2004.
- YOSHINAGA, E. et al. N(ε)-(carboxymethyl)lysine modification of elastin alters its biological properties: implications for the accumulation of abnormal elastic fibers in actinic elastosis. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 2, p. 315-323, Feb 2012.
- YOUNGSON, R. M. Collins Dictionary of Human Biology. Glasgow: **Harper Collins**, 2006.
- YU, Y. et al. UV irradiation stimulates histone acetylation and chromatin remodeling at a repressed yeast locus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 24, p. 8650-8655, Jun 2005.
- ZERDONER, D. The Ljubljana classification - its application to grading oral epithelial hyperplasia. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 31, n. 2, p. 75-79, Apr 2003.
- ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, H. D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n. 4, p. 299-305, Apr 2010.
- ZHONG, S. P.; MA, W. Y.; DONG, Z. ERKs and p38 kinases mediate ultraviolet B-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10. **J Biol Chem**, v. 275, n. 28, p. 20980-20984, Jul 2000.

Anexo A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MODIFICAÇÕES GLOBAIS DE HISTONAS EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

Pesquisador: SÉRGIO VITORINO CARDOSO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 33410014.4.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 844.944

Data da Relatoria: 10/10/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo:

A queilite actínica (QA) é uma doença inflamatória crônica dos lábios, principalmente do lábio inferior, causada pela exposição à radiação solar, com elevado potencial de cancerização (AYRES, 1923). Na grande maioria dos casos, a doença se desenvolve em homens, trabalhadores rurais ou em indivíduos que exercem alguma atividade exposta ao sol, acima dos 40 anos de idade, de pele clara e que não fazem uso de proteção labial (MARTINS-FILHO; SILV A; PIV A, 2011; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; ROGERS; BEKIC, 1997). O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a evolução maligna mais comum para a QA (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012).

O aparecimento de CEB em lábio está diretamente associado à exposição à luz solar, é usualmente precedido por QA, e surge mais frequentemente entre homens acima de 50 anos (SOUZA LUCENA et al., 2012; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; ABREU; KRUGER; TENNANT, 2009). O carcinoma epidermóide de lábio é que o apresenta melhor prognóstico em relação aos demais sítios intraorais (língua, assoalho bucal e outros), fato justificado pela localização anatômica e detecção precoce, embora haja escassez quanto aos programas de prevenção da doença (SOUZA et al., 2011; BATISTA et al., 2010; SARGERAN et al., 2009). As modificações epigenéticas em tumores humanos têm ganhado atenção no estudo da

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 844.944

carcinogênese juntamente com as alterações genéticas, e evidências recentes sugerem um componente epigenético em lesões precoces (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; JONES; BAYLIN, 2007; TABY; ISSA, 2010; ISSA, 2008; ESTELLER, 2008). A epigenética se refere às alterações herdadas durante a divisão celular, sem modificação na sequência da molécula de DNA (TABY; ISSA, 2010). Tais alterações são necessárias durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, diferenciação celular, envelhecimento e demais processos fisiológicos (JONES; BAYLIN, 2007; LENNARTSSON, EKWALL, 2009), além de estarem relacionadas no processo de carcinogênese (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; ELLINGER et al., 2010; JONES; BAYLIN, 2007; TABY; ISSA, 2010; LENNARTSSON, EKWALL, 2009; ISSA, 2008; ESTELLER, 2008). No câncer as possíveis alterações epigenéticas são: metilação do DNA; modificações globais de histonas - principalmente acetilação e metilação, além da 3 fosforilação, sumoilação, ribosilação-ADP e carbonilação; presença de RNAs não codificantes; e, alterações físicas de posicionamento de nucleossomos (TABY; ISSA, 2010; JONES; BAYLIN, 2007). Pouco se sabe sobre a influência dos fatores epigenéticos no câncer e condições cancerizáveis da cavidade oral, sendo importante explorar marcadores moleculares relacionados às modificações globais de histonas (CHEN et al., 2013; GONZÁLEZ-RAMÍREZ; GARCIA-CUELLAR; GRANADOS-GARCÍA, 2011), e tal conhecimento se restringe às lesões intraorais. O reconhecimento dos fatores epigenéticos envolvidos na queratite actínica e carcinoma epidermóide de lábio é necessário para melhor compreender o processo de carcinogênese labial, visto que marcadores moleculares podem ser úteis na identificação de características para o diagnóstico precoce, definir casos agressivos e, fornecer melhores definições sobre o tratamento aos pacientes.

O presente estudo será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), para avaliação e/ou aperfeiçoamento de seu conteúdo.

Este é um estudo retrospectivo que inclui a avaliação de requisição de exames histopatológicos e prontuários de pacientes portadores de QA e CEL, diagnosticados com uma (ou mais) lesão (ou lesões) de interesse pelo Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFU.

Inicialmente, será realizada uma consulta ao banco de dados dos laboratórios para localização dos casos de interesse. Logo, as informações clínicas e demográficas serão obtidas dos formulários de solicitação de exame anatomopatológico e/ou dos prontuários dos referidos pacientes. O número de indivíduos que serão localizados para participar desse estudo são 68 (sessenta e oito), sendo 30 (trinta) no grupo de queratite actínica e 38 (trinta e oito) no grupo de carcinoma epidermóide de lábio.

Os blocos parafinados serão localizados para confecção de novas lâminas para coloração de rotina

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
 Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
 UF: MG Município: UBERLÂNDIA
 Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 844.944

(hematoxilina e eosina - HE) com objetivo de confirmação do diagnóstico histopatológico, segundo os critérios atuais de diagnóstico.

Os critérios de inclusão são: pacientes com diagnóstico de QA e/ou CEL localizado(s) em lábio, independente da idade ou raça, compreendendo o período entre 1978 a 2013; e com material embocado e disponível para realização dos ensaios Imunoistoquímicos.

Os critérios de exclusão são: casos que não tenham concomitantemente QA e CEL, casos em que o paciente negar a participação no estudo, e casos com material em bloco parafinado insuficiente ou inadequado para análise Imunoistoquímica.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o projeto:

Geral: Analisar a expressão de antígenos relacionados aos mecanismos epigenéticos em queratite actínica e carcinoma epidermóide de lábio, comparando a imunomarcagem entre as lesões e entre casos com diferentes características clínico-patológicas.

Específicos:

Descrever e comparar o padrão de expressão Imunoistoquímico nas lesões de QA e CEL para os diferentes marcadores moleculares;

Comparar os padrões de expressão Imunoistoquímico com os dados clínico- patológicos nas diferentes lesões.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Por se tratar de uma pesquisa em que o material encontra-se arquivado, este projeto não apresenta riscos adicionais aos sujeitos de pesquisa, a não ser a possível identificação dos mesmos no momento da coleta das informações. Para minimizar ao máximo tal possibilidade, as informações coletadas dos formulários de solicitação de exame e dos prontuários não serão associadas ao nome e/ou ao número de prontuário do paciente a que correspondem, mas sim a uma escala numérica sequencial que será atribuída aos casos incluídos no estudo. O acesso aos nomes e/ou número de prontuário dos pacientes só será permitido ao pesquisador responsável pelo projeto, que se compromete em manter sigilo absoluto sobre tais informações para que não haja exposição indevida dos sujeitos de pesquisa a sociedade.

Os benefícios esperados concernem à sociedade como um todo, visto que o projeto pretende ampliar o conhecimento em relação às lesões malignas e com potencial de transformação que

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 844.944

acometem mucosa labial, visto a elevada incidência em brasileiros. O estudo epigenético em lesões labiais pode trazer informações importantes para a compreensão da biologia e da progressão tumoral, com perspectivas de melhorias nos procedimentos atuais de diagnóstico, prognóstico e tratamento. Para garantir o retorno do conhecimento gerado por esta pesquisa a sociedade em geral, os resultados e conclusões deste estudo será posteriormente publicada em periódico vinculado a área do conhecimento na qual se enquadra o presente projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O CEP UFU considera que este protocolo é ético e segue as resoluções da normativa 466/12

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no 818.167 foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: novembro de 2015.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 844.944

e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA/MG



Continuação do Parecer: 844.944

UBERLÂNDIA, 24 de Outubro de 2014

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Apêndice A

Dados individuais dos casos avaliados

Tabela 4 – Dados individuais dos casos de queilite actínica.

Caso	Idade	Gênero	Cor	Tabagismo	Etilismo	Ocupação	Local da lesão	Grau de displasia
1	40	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
2	40	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
3	57	M	NI	Sim	Sim	NI	Lábio*	DL
4	56	M	Branca	Sim	Não	Agricultor	Lábio inferior	DL
5	61	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
6	70	F	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
7	82	M	Branca	Sim	NI	Serviços gerais	Lábio inferior	DL
8	45	M	Branca	NI	NI	Motorista	Lábio inferior	DL
9	46	M	NI	NI	NI	NI	Lábio inferior	DM focal
10	34	F	Branca	NI	NI	Dona de casa	Lábio inferior	DM
11	76	M	Branca	NI	NI	Aposentado	Lábio*	DL
12	40	F	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DM
13	23	M	Branca	NI	NI	Estudante	Lábio inferior	DL
14	44	M	Branca	NI	NI	Comerciante	Lábio inferior	DI
15	43	M	Parda	NI	NI	NI	Lábio*	DL
16	50	M	Parda	Sim	NI	Lavrador	Lábio inferior	DI
17	47	M	Parda	NI	Sim	Lavrador	Lábio inferior	DL focal
18	42	M	Parda	NI	NI	Músico	Lábio inferior	DL
19	60	M	Parda	Sim	NI	NI	Lábio inferior	DM
20	56	F	NI	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
21	73	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
22	61	M	NI	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
23	80	F	NI	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
24	37	F	NI	NI	NI	NI	Lábio*	DL
25	46	M	Branca	NI	NI	Agricultor	Lábio inferior	DL
26	56	M	Branca	Sim	Sim	Serviços gerais	Lábio inferior	DM focal
27	40	M	Branca	NI	NI	Técnico em informática	Lábio inferior	DL
28	58	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL
29	58	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	DL focal
30	50	M	Parda	Sim	Não	Agricultor	Lábio inferior	DL
31	70	M	Branca	NI	NI	Aposentado	Lábio inferior	DL
32	57	M	NI	NI	NI	NI	Lábio inferior	DI focal
33	59	F	Branca	NI	NI	Dona de casa	Lábio inferior	DL

M: Masculino; F: Feminino; NI: Não informado; * não especificado; DL: displasia leve; DM: displasia moderada; DI: displasia intensa.

Tabela 5 – Dados individuais dos casos de carcinoma epidermóide de lábio.

Caso	Idade	Gênero	Cor	Tabagismo	Etilismo	Ocupação	Local da lesão	Grau de diferenciação	TNM
1	40	M	Branca	NI	NI	Lavrador	Lábio superior	BD	NI
2 ¹	65	F	Branca	Sim	Sim	NI	Lábio superior	MD	NI
3	81	F	NI	Sim	Não	NI	Lábio inferior	MD	T2NxMx
4	76	M	NI	Sim	Sim	NI	Lábio inferior	BD	NI
5	63	M	NI	NI	NI	NI	Lábio*	BD	NI
6 ¹	NI	M	Branca	Sim	Sim	NI	Lábio inferior	MD	T2/3NxMx
7	NI	MD	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	BD	NI
8	38	M	NI	Não	Não	NI	Lábio inferior	BD	NI
9	52	F	Branca	NI	NI	Lavrador	Lábio inferior	BD	NI
10	NI	M	NI	Sim	Sim	Trabalhador rural	Lábio*	BD	NI
11	58	M	Parda	Sim	Sim	Agricultor	Lábio inferior	BD	NI
12	38	M	Branca	Sim	Não	NI	Lábio*	BD	NI
13	56	M	Branca	Sim	Sim	Pescador	Lábio inferior	MD	NI
14	66	M	Branca	Sim	Sim	Pedreiro	Lábio inferior	MD	NI
15	NI	M	NI	NI	NI	Protético	Lábio inferior	MD	NI
16	47	M	NI	Sim	Sim	NI	Lábio inferior	BD	NI
17	61	M	Branca	NI	NI	Trabalhador rural	Lábio inferior	BD	NI
18	79	M	Branca	Sim	Não	NI	Lábio superior	MD	NI
19	100	F	Indígena	NI	NI	Aposentada	Lábio inferior	BD	NI
20	53	M	Branca	NI	NI	NI	Lábio inferior	BD	NI
21	56	M	Branca	NI	NI	Pedreiro	Lábio inferior	MD	NI
22	56	M	Branca	Sim	NI	Lavrador	Lábio inferior	BD	NI
23	87	M	Branca	Sim	Sim	Aposentado	Lábio inferior	PD	T2N0M0
24	57	M	Branca	Sim	Sim	Agricultor	Lábio inferior	MD	NI
25 ¹	48	M	Branca	NI	NI	Produtor rural	Lábio inferior	BD	T2N0M0
26	53	M	Branca	Sim	Sim	Lavrador	Lábio inferior	BD	NI
27 ¹	43	M	Parda	Sim	Sim	Motorista	Lábio*	PD	T3N0M0

M: Masculino; F: Feminino; NI: Não informado; * não especificado; ¹: óbito em decorrência da doença; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: Pouco diferenciado; TNM: estadiamento (T: tumor; N: gânglios linfáticos; M: metástase).

Tabela 6 – Dados individuais dos casos de mucosa de lábio normal.

Caso	Idade	Gênero	Cor	Local da lesão	Diagnóstico final
1	59	F	Branca	Lábio inferior	Fragmento de mucosa labial apresentando fibrose e hipotrofia leve de epitélio de revestimento
2	30	M	Branca	Lábio inferior	Mucocele
3	NI	F	NI	Lábio inferior	Varicosidade labial
4	35	F	Branca	Lábio inferior	Mucocele
5	69	F	Branca	Lábio inferior	Mucosa labial apresentando aspectos usuais de normalidade
6	40	F	NI	Lábio superior	Os fragmentos de mucosa labial mostram um padrão morfológico usual de normalidade
7	28	M	Branca	Lábio inferior	Mucosa labial apresentando paraqueratose
8	50	F	NI	Lábio inferior	Mucosa labial apresentando hematoma, fibrose e glândulas sebáceas
9	23	M	NI	Lábio superior	Fragmento de mucosa labial com aspectos usuais de normalidade

M: Masculino; F: Feminino; NI: Não informado

Apêndice B

Dados numéricos dos casos e grupos avaliados

Tabela 7 – Dados individuais da reatividade imunoistoquímica dos casos de queilite actínica

Caso	H3K36me3	H3K9ac	H4K12ac	H3S10ph
1	13,5	6,5	17,1	4,6
2	18	16,3	18	1,6
3	11,6	10,6	14,8	6,6
4	17,6	9,1	12,3	2,6
5	13,6	11,7	14,5	7,6
6	12	18	15,6	5
7	14,2	6,1	17	1,4
8	6,3	12,3	14	10,2
9	7,3	6,8	15,5	4
10	10,5	12,1	18	7,6
11	6,4	17,2	16,4	10,4
12	7,3	6,8	10,2	4
13	18	17,4	18	7,2
14	18	14,4	18	7,2
15	14	12,4	16,8	10,4
16	17,8	5	14,4	3,2
17	5,3	0,4	8,9	1
18	3,5	1,5	9,8	0
19	4,3	0	8,2	3,2
20	11	3,4	18	10
21	4,9	9,9	18	4,8
22	5	1	18	14,4
23	8,8	16,3	18	10,4
24	7,9	15,6	15	4
25	7,9	0	5,2	1
26	10,9	5,3	13,7	0,6
27	12,3	3,3	15,6	0,8
28	5,1	6,1	18	3,8
29	11,9	4,9	18	18
30	18	14,7	18	8
31	4,9	12,9	17,4	6,8
32	8,1	13,2	18	15,6
33	17,2	12	18	9

Tabela 8 – Dados individuais da reatividade imunoistoquímica dos casos de carcinoma epidermóide de lábio

Caso	H3K36me3	H3K9ac	H4K12ac	H3S10ph
1	6,7	12,7	18	10,6
2	5	9,5	18	13,6
3	5,9	9,7	14,4	5,2
4	5,4	15,1	18	3
5	7,8	10,7	16,8	7,6
6	1,7	10	15,2	11
7	10	6,3	18	3,8
8	10,1	14,5	18	8,2
9	0,8	3,6	12	5,6
10	4,4	11,6	17,2	3,2
11	13,5	3,9	18	2,8
12	14	12	18	9
13	7,7	17,6	18	7,2
14	2,4	7	15,1	14
15	17,6	18	18	8,6
16	0	1,9	5	6,4
17	2,8	3,8	17,3	3,4
18	18	16	18	5,8
19	18	7,1	14,8	5
20	12	12	18	11,2
21	17,8	16	18	10
22	0,2	0	15,4	4,8
23	9	16	17,5	13,6
24	6,3	13,2	17,6	5,8
25	16,8	18	18	7,6
26	9,3	17	18	12
27	3	8	14,8	5,4

Tabela 9 – Dados individuais da reatividade imunoistoquímica dos casos de mucosa de lábio normal

Caso	H3K36me3	H3K9ac	H4K12ac	H3S10ph
1	12	18	17,2	18
2	12,8	18	18	5,4
3	18	12,8	18	15,6
4	14,8	14	18	15
5	18	18	18	18
6	14,7	16	18	13,5
7	17,8	17,6	18	13,8
8	17,8	10	18	8,4
9	14	9,1	18	13,8

Tabela 10 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K36me3

Variável	H3K36me3		
	TN	QA	CEL
Mínimo	12	3,5	0,0
Mediana	14,7	10,9	7,7
Máximo	18,0	18,0	18,0
Média	15,5	10,7	8,4
Desvio padrão	2,4	4,8	5,8

Tabela 11 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K36me3 com estratificação dos grupos

Variável	H3K36me3			
	QA – DL	QA – DMI	CEL – BD	CEL - MPD
Mínimo	3,5	4,3	0,0	1,7
Mediana	11,6	9,3	8,5	6,3
Máximo	18,0	18,0	18,0	18,0
Média	10,7	10,5	8,2	8,6
Desvio padrão	4,8	4,9	5,7	6,3

Tabela 12 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac

Variável	H3K9ac		
	TN	QA	CEL
Mínimo	9,1	0,0	0,0
Mediana	16,0	9,9	11,6
Máximo	18,0	18,0	18,0
Média	14,8	9,2	10,8
Desvio padrão	3,5	5,6	5,2

Tabela 13 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H3K9ac com estratificação dos grupos

Variável	H3K9ac			
	QA – DL	QA – DMI	CEL – BD	CEL - MPD
Mínimo	0,0	0,0	0,0	7,0
Mediana	10,6	6,8	11,1	13,2
Máximo	18,0	14,4	18,0	18,0
Média	9,6	7,9	9,3	12,8
Desvio padrão	5,9	4,9	5,6	4,1

Tabela 14 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H4K12ac

Variável	H4K12ac		
	TN	QA	CEL
Mínimo	17,2	5,2	5,0
Mediana	18,0	16,8	18,0
Máximo	18,0	18,0	18,0
Média	17,9	15,3	16,5
Desvio padrão	0,3	3,4	2,8

Tabela 15 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H4K12ac com estratificação dos grupos

Variável	H4K12ac			
	QA – DL	QA – DMI	CEL – BD	CEL - MPD
Mínimo	5,2	8,2	5,0	14,4
Mediana	17,0	14,9	18,0	17,6
Máximo	18,0	18,0	18,0	18,0
Média	15,6	14,5	16,3	16,8
Desvio padrão	3,3	3,7	3,4	1,5

Tabela 16 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H3S10ph

Variável	H3S10ph		
	TN	QA	CEL
Mínimo	5,4	0	2,8
Mediana	13,8	5,0	7,2
Máximo	18,0	18,0	14,0
Média	13,50	6,2	7,6
Desvio padrão	4,7	4,5	3,4

Tabela 17 – Dados da reatividade imunoistoquímica para H3S10ph com estratificação dos grupos

Variável	H3S10ph			
	QA – DL	QA – DMI	CEL – BD	CEL - MPD
Mínimo	0	0,6	2,8	5,2
Mediana	6,6	4,0	6,0	8,6
Máximo	18,0	15,60	12,0	14,0
Média	6,4	5,7	6,5	9,1
Desvio padrão	4,5	4,6	3,1	3,5