

Roberta Cristina Gomes Espinosa

**Modificações pós- traducionais das histonas H3K9ac e H4K12ac
podem estar associadas com a patogênese das proliferações celulares
na leucoplasia bucal.**

*Post-translational histone modifications H3K9ac and H4K12ac appear to be
associated with pathogenesis of cell proliferations in oral leukoplakia.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade de Uberlândia, para
obtenção do Título de Mestre em
Odontologia na Área de
Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2018

Roberta Cristina Gomes Espinosa

**Modificações pós- traducionais das histonas H3K9ac e H4K12ac
podem estar associadas com a patogênese das proliferações celulares
na leucoplasia bucal.**

*Post-translational histone modifications H3K9ac and H4K12ac appear to be
associated with pathogenesis of cell proliferations in oral leukoplakia.*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de Uberlândia, para
obtenção do Título de Mestre em
Odontologia na Área de Clínica
Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Prof. Dra. Roberta Rezende Rosa

Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria

Prof. Dr. João Paulo Silva Servato

Uberlândia, 2018

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

- E77m
2018 Espinosa, Roberta Cristina Gomes, 1993
 Modificações pós- traducionais das histonas H3K9ac e H4K12ac
 podem estar associadas com a patogênese das proliferações celulares na
 leucoplasia bucal [recurso eletrônico] / Roberta Cristina Gomes
 Espinosa. - 2018.
- Orientador: Adriano Mota Loyola.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.827>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.
1. Odontologia. 2. Boca - Câncer. 3. Imunohistoquímica. 4. Boca -
 Doenças. I. Loyola, Adriano Mota, (Orient.) II. Universidade Federal de
 Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
 Av. Pará, 1720, Bloco 41, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.pgoufu.com - copod@unuiara.ufu.br



ATA

Ato de defesa de DISSERTAÇÃO MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Mestrado nº 341 - CPOPD

Data: 29/08/2018

Discente: **Roberta Cristina Gomes Espinosa (116120D0022)**

Título do Trabalho: **Modificações pós-transcricionais das histonas H3K9ac e H4K12ac podem estar associadas com a patogênese das proliferações celulares na leucoplasia bucal.**

Área de concentração: **Clinica Odontológica Integrada.**

Linha de pesquisa: **Patologia e Diagnóstico Bucal**

Projeto de Pesquisa de vinculação: **Patologia e Diagnóstico Bucal**

As **quatorze horas** do dia **vinte e nove de agosto de 2018** no Auditório Bloco 41, Anexo A, sala 33 Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em julho de 2018, assim composta: Professores Doutores: **Sérgio Vitorino Cardoso (UFU)**; **Roberta Rezende Rosa (UNITRI)** e o orientador da candidata **Adriano Mota Loyola**.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa Dr. Adriano Mota Loyola apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente o pulvêre para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu o pulvêre, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir a candidata. Finalizada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Aprovada**.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado 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, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada eletronicamente pela Banca Examinadora.

Documento assinado eletronicamente por **Adriano Mota Loyola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/09/2018, às 11:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º,

file:///C:/Users/Jo%CC%AC%20Rosa/Downloads/Ata_0686993.html

1/2

11/09/2018

SEU/FU - 0686993 - PAg



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Vitorino Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/09/2018, às 11:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Rezende Rosa, Usuário Externo**, em 10/09/2018, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade desta documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0686993** e o código CRC **7A763784**.

AGRADECIMENTOS

A minha família, (pai, mãe e irmã) que de longe tornaram a realização desta conquista possível. Oferecendo-me condições de seguir por passos nunca trilhados por eles. A minha avó, que com todo amor e carinho me escutou e ajudou. Apesar de todas as dificuldades me deu forças pra seguir em frente, em busca de um futuro melhor.

Ao meu padrinho Eduardo, dindinha Cleidemar e primos Dudu e Larissa, que não mediram esforços para tornar tudo isso possível. Sempre se preocupando e se mostrando presentes em qualquer coisa que eu precisasse.

Ao meu namorado João, que principalmente nessa fase final estive ao meu lado de formas incontáveis, resolvendo questões de informática que eram um mistério para mim. Além da paciência e carinho nos momentos difíceis de indecisão.

Agradeço aos meus colegas de mestrado Aline, Cássio e Vinícius. Que me ajudaram e ensinaram muito durante essa fase da minha vida. A Anaíra, Rafael e Marcelo que em muitos momentos de correria estavam lá para me amparar e tornar a conclusão deste trabalho possível. Ao Luiz Fernando, que sempre se mostrou solícito.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Adalci e Lúbia, que nunca mediram esforços para me ajudar e escutar quando precisei.

Ao Profº Adriano Loyola pela oportunidade e paciência no decorrer destes anos para a construção deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo/ Palavras-chave.....	07
Abstract/Keywords.....	08
1. Introdução e Referencial teórico.....	09
1.1 Leucoplasia bucal.....	10
1.2 Epigenética.....	17
1.3 As histonas e suas modificações globais.....	17
1.4 Acetilação de Histonas.....	19
1.5 Ki67.....	21
2. Proposição.....	24
2.1 Objetivos.....	25
2.1.1 Geral.....	25
2.1.2 Específico.....	25
3. Capítulo 1.....	26
3.1 Abstract.....	28
3.2 Introduction.....	29
3.3 Materials and methods.....	30
3.3.1 Tissues.....	30
3.3.2 Immunohistochemistry.....	31
3.3.3 Immunohistochemical analysis.....	32
3.3.4 Data analyzes.....	32
3.4 Results.....	33
3.5 Discussion.....	34
3.6 Acknowledgements.....	37
3.7 Conflicts of interest.....	38
3.8 References.....	41
3.9 Figures.....	42
3.10 Figure legends.....	43
4. Conclusão.....	44

5. Referências.....	46
6. Anexos.....	51
6.1 Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	52
6.2 Materiais e Métodos.....	58
6.2.1 Casuística.....	58
6.2.2 Ensaio imunohistoquímico.....	58
6.2.3 Análise da reatividade imunohistoquímica.....	60
6.2.4 Calibração do ImageJ para análise morfométrica.....	61
6.2.5 Calibração da distância.....	61
6.2.6 Calibração da escala de cinza.....	63
6.2.7 Análise das imagens.....	64
6.2.8 Estatística.....	66
6.2.9 Análise dos dados.....	67
6.3 Resultados.....	68
6.3.1 Dados sociodemográficos e clinicopatológicos.....	68
6.3.2 Análise e avaliação imunohistoquímica.....	68
6.3.3 Histona H3K9ac.....	68
6.3.4 Histona H4K12ac.....	73
6.3.5 Correlação entre MPTH e Ki67.....	76
6.3.6 Ki67.....	76

RESUMO

Introdução: A leucoplasia oral é o distúrbio potencialmente maligno mais comum da mucosa de boca e o reconhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos em seu desenvolvimento e progressão para o carcinoma de células escamosas oral pode fornecer novos biomarcadores para determinar o prognóstico e monitorar a progressão da doença. Alterações epigenéticas, como modificações pós-traducionais de histonas, têm sido alvo de investigação considerando seus papéis na transcrição gênica, condensação e descondensação da cromatina, replicação e reparo do DNA, nos quais H3K9ac e H4K12ac desempenham papéis significantes. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão de H3K9ac e H4K12ac na leucoplasia oral e sua associação com o marcador de proliferação celular Ki-67 e dados clínico-patológicos.

Métodos: Amostras de 50 casos de leucoplasia oral e 15 fragmentos de mucosa normal foram submetidas a ensaio imunohistoquímico para expressão de H3K9ac, H4K12ac e Ki-67. A análise quantitativa foi realizada medindo densidade óptica integrada e porcentagem de núcleos positivos.

Resultados: A expressão de H4K12ac na leucoplasia oral foi significativamente diferente da mucosa normal tanto para valores de densidade óptica integrada média ($p = 0,007$) quanto para porcentagem de núcleos positivos ($p = 0,02$) em comparação ao grupo controle. Nenhuma associação foi encontrada entre os dados sociodemográficos e clínico-patológicos. A expressão de Ki-67 correlacionou positivamente com a porcentagem de núcleos positivos para H3K9ac ($p < 0,0001$) e com densidade óptica integrada para ambas as modificações histonas (H3K9ac, $p = 0,0007$; H4K12ac, $p = 0,002$).

Conclusão: Nossos achados sugerem que o H3K9ac e o H4K12ac contribuem para o desenvolvimento da leucoplasia oral por meio da regulação dos mecanismos de proliferação de células epiteliais.

Palavras-chave: Modificações de histona; leucoplasia oral; imuno-histoquímica; câncer bucal; prognóstico.

ABSTRACT

Background: Oral leukoplakia is the most prevalent potentially malignant disorder and the acknowledgement of molecular mechanisms involved in its development and progression to oral squamous cell carcinoma can provide novel biomarkers for determining prognosis and monitoring disease progression. . Among these, epigenetic alterations such as histone post-translational modifications have been targeted for investigation considering their roles in gene transcription, chromatin condensation and decondensation, DNA replication and repair, in which H3K9ac and H4K12ac play significant roles. The aim of this study was to analyze the expression of H3K9ac and H4K12ac in oral leukoplakia and its association with cell proliferation marker Ki-67 and clinical-pathological data.

Methods: Samples of 50 cases of oral leukoplakia and 15 fragments of normal mucosa were submitted to immunohistochemical assay for H3K9ac, H4K12ac and Ki-67 expression. Quantitative analysis was performed measuring integrated optical density and percentage of positive nuclei.

Results: Expression of H4K12ac in oral leukoplakia was significantly different from normal mucosa for both mean integrated optical density values ($p=0.007$) and percentage of positive nuclei ($p=0.02$) in comparison to control group. No association could be found among sociodemographic and clinical-pathological data. Ki-67 expression correlated positively with percentage of positive nuclei for H3K9ac ($p<0.0001$) and with integrated optical density for both histone modifications (H3K9ac, $p=0.0007$; H4K12ac, $p=0.002$).

Conclusion: The present findings suggest that H3K9ac and H4K12ac contribute to the development of oral leukoplakia by regulating epithelial cell proliferation mechanisms.

Keywords: Histone modifications; oral leukoplakia; immunohistochemistry; oral cancer; prognosis.

1.INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Leucoplasia Bucal

Os cânceres de boca e orofaringe estão entre os mais comuns do mundo perfazendo no ano de 2008 cerca de 400.000 casos incidentes, com 223 mil casos de óbito relacionado à doença (Chaturvedi *et al.*, 2013). Sendo o câncer de boca a sexta principal causa de morte por câncer no mundo (Ganly *et al.*, 2012). Para o Brasil o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima para o biênio de 2018-2019 a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer por ano, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Excluindo o câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homens serão próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,35%) e cavidade oral (5,2%). Já nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo de útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4%). Para o câncer de cavidade oral estima-se 11200 novos casos em homens e 3500 em mulheres para este biênio. O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) está situado entre os 10 tipos mais comuns encontrados no ser humano, chegando a perfazer 90% dos cânceres incidentes na boca (INCA, 2018). Parte destas lesões surge como lesão nova (*de novo*), e parte como lesões potencialmente malignas, principalmente a leucoplasia bucal (LB) (Warnakulasuriya *et al.*, 2007).

Em 1978, a Organização Mundial de Saúde (OMS), em documento próprio, dá o primeiro passo na definição consensual da LB. Neste documento, a LB é definida como uma mancha ou placa branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como nenhuma outra lesão. A partir de então, outras propostas foram feitas tanto pela OMS, por documento próprio, como por grupos de estudo sob sua coordenação, culminando no trabalho referencial de Warnakulasuriya *et al.* (2007), no qual os autores reconhecem a LB como placa branca com risco questionável para transformação maligna, cujo diagnóstico pressupõe a exclusão de todas as doenças ou desordens semelhantes que não comportem risco aumentado para transformação em câncer. Outras discussões conceituais foram propostas, não alterando significativamente as formulações anteriores, convergindo para o trabalho da OMS, publicado em 2017, que traz a LB dentro das lesões ou desordens potencialmente

malignas (El-Naggaret *et al.*, 2017). Neste documento, as desordens (doenças) potencialmente malignas são conceituadas como “apresentações clínicas que carregam um risco de desenvolvimento de câncer, seja em uma lesão precursora definível, ou em mucosa clinicamente normal”. Neste documento, a LB é admitida como termo clínico para descrever placas brancas de risco questionável para transformação maligna, uma vez que outras condições específicas e outras desordens potencialmente malignas sejam descartadas.

O consumo de tabaco é o fator de risco que contribui no desenvolvimento da LB e na progressão para o CCEB (Leemans *et al.*, 2011; Tanaka, Ishigamori; 2011), sendo que entre fumantes a LB é seis vezes mais comum do que entre não- fumantes (Warnakulasuryia *et al.*, 2007). Em países asiáticos, em especial no sudeste do continente, o uso de nós de areca é uma prática muito comum, sendo identificado como outra causa da LB (Lee *et al.*, 2006; Warnakulasuryia *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Além disso, pacientes que não foram expostos a fatores de risco conhecidos também podem desenvolver LB e CCEB; outros estudos ressaltam ainda o papel não definido do álcool e do HPV na patogenia das LB (Maserejian *et al.*, 2006; van der Waal *et al.*, 2010; El-Naggar *et al.*, 2017).

No contexto do diagnóstico da LB, seguiria o seguinte protocolo: 1. Identificação de uma mancha ou placa branca ou predominantemente branca; 2. Descarte de qualquer fator etiológico que possa ter repercussão sobre o comportamento da lesão, à exceção daquelas envolvidas com desordens potencialmente malignas: fumo, álcool, HPV, nóz de areca, por exemplo; 3. Exame histopatológico para confirmação de alterações intrínsecas do epitélio. Apesar de não apresentar características histológicas patognomônicas, a biopsia é um procedimento obrigatório para o diagnóstico. Com ela, é possível descartar outras alterações da mucosa com expressão clínica semelhante, e avaliar o grau de displasia presente, que tem sido considerado um marcador de probabilidade de transformação maligna (Warnakulasuriya *et al.*, 2007; Warnakulasuriya *et al.*, 2008; van der Waal *et al.*, 2010).

Entre os métodos auxiliares clássicos na avaliação das LB, a utilização do azul de toluidina como complemento ao exame clínico tem sido bastante relatado nos últimos 30 anos. O azul de toluidina é um corante catiônico metacromático, que se liga de forma seletiva aos componentes ácidos, resultando em um tecido de coloração azul que contrasta com a mucosa normal. Como as células cancerosas e displásicas apresentam maior quantidade de DNA e RNA quando comparado as células normais, o corante delinea áreas de atividade proliferativa, sugestivas de displasia (ou já de malignidade). É uma técnica de baixo custo, execução simples e rápida, com sensibilidade crítica para seu objetivo (Ram, Siar;2005; Missmann *et al.*, 2006).

A LB pode aparecer em qualquer região da boca e orofaringe (van der Waal, 2009). Clinicamente podem ser agrupadas em dois grupos aparentemente distintos: homogêneas (LH) e não homogêneas (LNH). A primeira manifesta-se como uma placa uniforme, plana, esbranquiçada e com bordas bem definidas cuja consistência é, em geral, uniforme em toda a lesão, próxima àquela encontrada na mucosa (Warnakulasuriya *et al.*, 2007). As do tipo não homogêneo mostram-se permeadas por áreas eritroplásicas, ou também com padrão de alterações superficiais do tipo nodular ou verrucoso, podendo, eventualmente, apresentarem-se com padrões morfológicos mistos. Aquelas permeadas de áreas eritroplásicas são designadas de eritroleucoplasias (Warnakulasuriya *et al.*, 2007; van der Waal, 2009).

As alterações histopatológicas mais significativas são observadas no epitélio de revestimento, admitidas como alterações intrínsecas, compreendendo: hiperqueratose, paraqueratose, hiperplasia (acantose), hipotrofia, e com o quadro de displasia epitelial, em diferentes graus, acompanhadas ou não de alterações na arquitetura epitelial, cujos aspectos podem incluir: perda de polaridade celular basal, cones epiteliais “em forma de gota”; presença de acantólise, estratificação irregular, disqueratose (queratose intraepitelial). Assim, qualquer destas alterações isoladamente ou em conjunto (mais usual) podem ser observadas nas LB (Barnes *et al.*, 2005; El-Naggar *et al.*, 2017).

Classicamente, a identificação de displasia está relacionada à percepção de alterações celulares (citológicas) e teciduais, considerando, neste último caso, a sua

arquitetura. Em suas publicações de referência mais recentes, a OMS (Barnes *et al.*, 2005; El-Naggar *et al.*, 2017) reproduz as características citológicas e arquiteturais importantes na composição de um diagnóstico de displasia epitelial e como as agregaram para categorizar as displasias segundo sua intensidade em leve, moderada e severa (Quadros 1 e 2). Além disto, aos critérios citológicos e arquiteturais, acresce-se a observação do nível de acometimento do epitélio: a displasia leve apresenta alteração arquitetural restrita ao terço inferior do epitélio e atipia citológica; a moderada estende-se ao terço médio epitelial apresentando maior grau de atipia citológica; a displasia intensa afeta dois terços do epitélio de revestimento, relacionada à grande atipia citológica. Na sua versão mais recente (El-Naggar *et al.*, 2017) a OMS equivale o diagnóstico de displasia intensa com o de carcinoma *in situ*. Embora seja a referência universal, este método apresenta como desvantagem uma grande variabilidade de interpretação intra e inter observadores (Brothwell *et al.*, 2003). Isso ocorre devido à subjetividade na avaliação realizada pelo patologista quando se diz respeito à displasia (Warnakulasuriya *et al.*, 2008).

Com vistas a superar esta limitação, um sistema binário de gradação histológica foi proposto com o objetivo de atenuar a subjetividade contida na apreciação das alterações citológicas quando da utilização da classificação de gradação histológica de malignidade para lesões potencialmente malignas baseadas em vários níveis (Barnes *et al.*, 2005). Em dois trabalhos subsequentes Kujan *et al.* (2006 e 2007) propuseram e testaram um sistema binário, a partir da identificação de aspectos citológicos e arquiteturais associadas às lesões potencialmente malignas identificadas com maior ou menor risco de transformação maligna. Assim, os autores categorizaram as lesões de “BAIXO RISCO” (LBR) como aquelas que, na biopsia, apresentavam menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas; as de “ALTO RISCO” (LAR) seriam aquelas nas quais se observasse um mínimo de quatro alterações arquiteturais e cinco citológicas. De acordo com os autores, o sistema binário permitiu prever a transformação maligna da lesão. Identificaram que das 33 lesões classificadas como LBR, apenas cinco casos apresentaram transformação (15,2%), enquanto dos 35 casos designados como LAR, 28 progrediram para carcinoma

(80,0%), demonstrando a eficácia desse sistema. É importante a caracterização da displasia no diagnóstico, pois a presença de displasia aumenta o risco de desenvolvimento de carcinoma quando se compara ao tecido normal (Warnakulasuriya *et al.*, 2008).

Quadro 1: Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia bucal em desordens cancerizáveis.

Alterações de Arquitetura	Alterações Citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação do tamanho e forma nuclear
Perda de polaridade da camada basal	Variação do tamanho e forma da célula
Projeções epiteliais em forma de gota	Aumento da proporção núcleo/ citoplasma
Aumento do número de mitoses	Núcleos aumentados de tamanho
Mitoses superficiais anormais	Figuras de mitoses atípicas
Queratinização prematura em células individuais (disqueratose)	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Perda de coesão celular (acantólise)	Hipercromatismo
Pérolas de queratina dentro das cristas epiteliais	

Adaptação de Barnes *et al.*, 2005; van der Waal, 2009 e El-Naggaret *al.*, 2017.

Quadro 2- Estágios histopatológicos em lesões precursoras epiteliais¹.

Hiperplasia Escamosa	Este pode estar na camada espinhosa (acantose) e / ou nas camadas celulares basais / parabasais (hiperplasia de células basais); a arquitetura mostra a estratificação regular sem atípia celular
Displasia Leve	A perturbação de arquitetura é limitada ao terço inferior do epitélio acompanhada por atípia citológica
Displasia Moderada	A perturbação de arquitetura estende-se para o terço médio do epitélio; consideração do grau de atípia citológica pode exigir atualização
Displasia Intensa	Alteração de arquitetura envolve mais do que dois terços do epitélio; alteração de arquitetura para o terço médio do epitélio com atípia citológica suficiente é atualizado a partir de moderada a displasia grave
Carcinoma in situ (também considerado displasia intensa)*	Alteração de espessura total ou quase total de arquitetura nas camadas de células viáveis acompanhado por atípia citológica pronunciada

1. Adaptado de Barnes *et al.*, 2005; van der Waal, 2009; El-Naggar *et al.*, 2017.

Um dos grandes temas relacionados ao estudo das doenças cancerizáveis diz respeito ao seu potencial de transformação maligna. A frequência de transformação maligna documentada para as LB tem sido estimada entre 0,1% a 39%. Estudos de metanálise mostram índices de transformação maligna para displasias bucais em torno de 12%. Todavia, quanto maior a presença de displasia acentuada, maior é a probabilidade de transformação maligna (El-Naggar *et al.*, 2017). Quando analisamos estudos concentrados em lesões mostrando displasias intensas e carcinomas *in situ*, estes índices se alteram, elevando-se para 3,2% a 50,0% (Liu *et al.*, 2012).

Alguns fatores são mencionados pela literatura por apresentarem relação com o risco aumentado de transformação maligna nas LB, sendo eles: sexo feminino, lesões de longa duração, pacientes não fumantes, lesões em língua e soalho bucal, subtipo não homogêneo, maiores que 200 mm², presença de *C. albicans* e displasia epitelial (Gupta *et al.*, 1980; Liu *et al.*, 2012).

No estudo de Kil *et al.*, (2016) foi observada a presença de anormalidades cromossômicas, através da variação estrutural no número de cópias, englobando as regiões 3p e 9p em LB. Recentemente, com o advento dos estudos de eventos genéticos e epigenéticos nestas doenças, tem traduzido possibilidades de se encontrar biomarcadores da transformação maligna nestas lesões. Esse tipo de estudo é de suma importância, possibilitando complementar a previsão do prognóstico da lesão àqueles marcadores clinicopatológicos.

1.2 Epigenética

A epigenética refere-se às alterações hereditárias na expressão gênica que não estão associadas às modificações na sequência de bases do DNA (Shaw, 2006). Diversos mecanismos estão ligados aos eventos epigenéticos, sendo os mais estudados a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas (MPTH) e os micro RNAs (miRNA) (Taby, Issa; 2010).

Inúmeros fatores podem gerar tais modificações, entre elas a exposição á radiação, uso do fumo, estresse, hormônios (como o estradiol), cádmio, arsênio, níquel, as espécies reativas de oxigênio dentre outros químicos (Verma, Srivastava; 2002).

Existem algumas particularidades usuais nas modificações epigenéticas, que são: (1) potencial de reversibilidade, o que difere das mutações genéticas convencionais; (2) efeitos de sua posição, ou seja, efeitos sobre genes a alguma distância, que podem diminuir com a distância do gene afetado em relação a alteração epigenética, ou terminar abruptamente; (3) efeitos em grupos gênicos que estão próximos uns dos outros no genoma; (4) frequência surpreendentemente alta, numa taxa mais alta que para as mutações; (5) podendo estar associadas a causas ambientais e ser modificada por elas (Feinberg, 2004).

1.3 As histonas e suas modificações

As histonas são proteínas básicas presentes no núcleo de células eucariontes. Inicialmente acreditava-se que estas proteínas estavam envolvidas apenas com o empacotamento da fita de DNA formando a unidade fundamental da cromatina, o nucleossomo (Kornberg, Lorch; 1999; Grunstein, 1992). O nucleossomo é formado pelo conjunto de oito histonas, sendo duas moléculas de cada histona (H2A, H2B, H3 e H4), formando o octâmero de histonas, onde a fita de DNA se enrola por volta de 1,75 vezes com aproximadamente 147 pares de base do DNA (Luger, 2003).

Entre dois nucleossomos se tem o DNA de ligação de 11nm, que é empacotado numa fibra de 30nm com a associação da histona H1, que é conhecida

como histona de ligação (Wolffe, 1999). Alguns estudos indicam que a histona H1 pode apresentar ação estrutural/ funcional na cromatina, assim como pode participar da regulação epigenética, contribuindo para a manutenção ou estabelecimento de padrões de metilação específicos do DNA. (Fan *et al.*, 2005).

As histonas apresentam uma região globular, responsável pela formação do nucleossomo e uma cauda N-terminal que se projeta do nucleossomo. Tais estruturas estão suscetíveis à ação de enzimas causando modificações que podem ser de acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação (Wolffe, Hayes; 1999; Peterson, Laniel; 2004).

Diversas modificações podem ocorrer na cauda das histonas formando um código, que foi proposto por Jenuwein & Allis, (2001) chamado “código de histonas”. Diferentes modificações podem ocorrer em vários aminoácidos, colaborando com os mecanismos que alteram a estrutura da cromatina. Tais modificações estão relacionadas com diferentes mecanismos fisiológicos do organismo, dessa forma, sua desregulação estará relacionada com o desenvolvimento de doenças, como o câncer (Jenuwein, Allis; 2001).

Aqui Feinberg *et al.*, (2006) sugerem que os tumores se desenvolvem em três estágios; (1) Alteração epigenética de células progenitoras/ tronco, através da regulação aberrante de genes progenitores de tumor, tais genes medeiam o aumento epigenético de células progenitoras, elevando sua propensão para o desenvolvimento de câncer; (2) Mutações genéticas em genes supressores de tumor e oncogenes; (3) Variabilidade genética e epigenética, acarretando em aumento da evolução tumoral. Esses acontecimentos ainda precisam ser mais estudados, porém é evidente que a epigenética tem uma função indispensável no desenvolvimento tumoral.

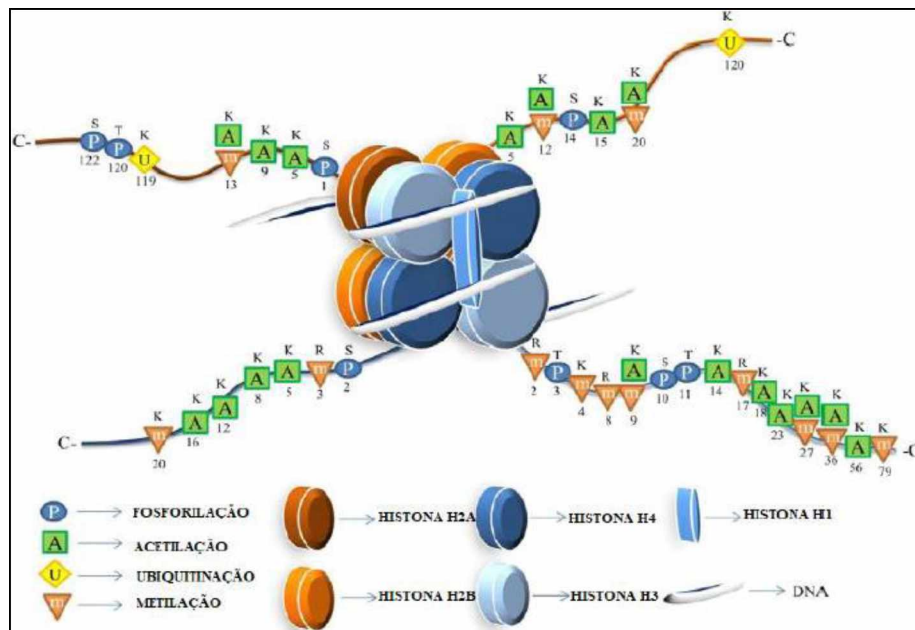


Figura 1 – Modificações de histonas. Nucleossomo, formado pela união de dois dímeros H2A e H2B e um tetrâmero formado pela união de duas moléculas de H3 e duas de H4. A histona H1 mantém o DNA enrolado em torno do octâmero de histona. As caudas amino-terminais desempenham papel crucial na estrutura e na função dos nucleossomos. Diversas modificações nos diferentes resíduos da cauda das histonas estão sendo mostradas, onde S, T, K e R representam serina, treonina, lisina e arginina, respectivamente. Outras possíveis modificações existem, mas não estão representadas. (Fonte: BISWAS; RAO, 2017. Adaptado pela autora).

1.4 Acetilação de histonas

O processo de acetilação dos domínios N- terminais das histonas é controlado por duas classes de enzimas: a acetiltransferase de histona (HAT) que catalisa acetilação, e a desacetilase de histona (HDAC) é responsável pela reação de desacetilação (Verma, Srivastava; 2002).

A acetilação das histonas é responsável por regular alguns processos celulares, entre eles a montagem do nucleossomo no DNA. As histonas são carregadas positivamente, enquanto o DNA é carregado negativamente, o que gera interação eletrostática. Para organizar a cromatina, proteínas conhecidas como chaperonas de histonas irão controlar a montagem das histonas no DNA, possivelmente por reconhecerem o padrão de acetilação nessas histonas. Isso porque as histonas logo após sua síntese na fase (S) do ciclo celular são modificadas pelas HATs que transferem

uma porção acetil da acetil coenzima A para o grupo ϵ -amino de resíduos de lisina. Logo após que as histonas são depositadas no DNA, elas são desacetiladas e mais tarde reativadas com novos padrões para possibilitar outras funções. Outro papel importante da acetilação está no estado de conformação da cromatina. Isso porque a cromatina pode estar em um estado aberto ou compacto, dependendo do estágio do ciclo celular. Sendo que a acetilação de histonas tem função na transição e na manutenção desses estados (Shahbazian, Grunstein; 2007)

A adição de um grupo acetil as caudas N-terminais das histonas H3 e H4 gera afrouxamento da cromatina, dado que na forma desacetilada tais histonas se encontram carregadas positivamente, portanto em íntima associação com o DNA de carga negativa. Ou seja, a acetilação torna a cromatina acessível ao processo de transcrição (Taby, Issa; 2010). A desregulação desse processo pode gerar atividade transcricional desorganizada, colaborando com eventos que podem levar a transformação maligna. Estudo recente mostrou que modificações na histona H3K9ac realizam função na agressividade e resistência ao tratamento quimioterápico de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço por meio da regulação positiva do fator nuclear kappa de células B ativadas (Almeida *et al.*, 2013).

Existem dois tipos de HATs de acordo com sua localização celular, sendo uma de localização nuclear (HAT tipo A) e a de localização citoplasmática (HAT tipo B). Presume-se que as de localização nuclear apresentam maior influência sobre a transcrição gênica, enquanto as citoplasmáticas podem acetilar proteínas não histonas. (Taby, Issa; 2010).

Ainda se tem poucos estudos sendo desenvolvidos para avaliar o papel da acetilação das histonas no CCEB. Com isso, a função da acetilação na carcinogênese e no modo de desenvolvimento de lesões é pouco conhecido. Estudo comparou as alterações da histona H3K9ac em todas as camadas celulares de amostras de tecido normal (TN), LB e CCEB. Todos os casos se mostraram positivos para tal histona. As amostras de TN apresentaram em média 82,1%, os casos de LB 94,4% e 78,2% nos casos de CCEB. Comparando os grupos, os casos de CCEB foram hipoacetilados quando

comparados aos casos de LB. Entre os casos de TN e LB nenhuma diferença estatística foi encontrada. No mesmo estudo foi realizada análise de proliferação comparando a expressão de Ki67. Houve aumento gradual de sua expressão durante a carcinogênese, apresentando os valores maiores no CCEB. O que sugere que a progressão maligna requer um aumento de células habilitadas para progressão (Webber *et al.*, 2017).

1.5 Ki67

Ki67 foi descrita como uma proteína nuclear em 1983, em linhagem celular de linfoma de Hodgkin. Experimentos revelaram a presença de Ki67 em todas as células normais que proliferam, mas ausente nas células diferenciadas, em repouso. Quando células diferenciadas em repouso são estimuladas à proliferação, se tem a indução de expressão de Ki67, enquanto que sua expressão desaparece nas células que proliferam e se diferenciam em células maduras em fase de repouso (Juríková *et al.*, 2016). Este antígeno encontra-se ausente na fase G0 do ciclo celular e expressa de forma variada nas fases G1, S e G2. Portanto, sua expressão está relacionada com o processo de proliferação. Podendo então sua expressão nuclear ser utilizada para avaliar a proliferação celular em tipos diferentes de lesão, incluindo tumores e lesões cancerizáveis (Denkert *et al.*, 2015).

Quando se fala de câncer, a avaliação dos fatores prognósticos e preditivos é essencial para identificar pacientes com risco aumentado de recidiva e optar por tratamento mais adequado para cada caso de forma individual. Entretanto, os fatores tradicionais como o tamanho do tumor, o grau histológico e o acometimento dos linfonodos não são suficientes para avaliar prognóstico do paciente. Com isso, existe a necessidade de utilizar de marcadores mais poderosos para fazer esta diferenciação entre os pacientes com bom prognóstico e aqueles com prognóstico ruim que necessitam de tratamento mais agressivo (Juríková *et al.*, 2016). Nos últimos 32 anos Ki67 vem sendo pesquisada quanto a sua utilização como biomarcador prognóstico e até mesmo preditivo para o câncer de mama e outros. Porém o biomarcador não está ainda sendo utilizado para as tomadas de decisão

clínica do paciente, pois não se tem ainda uma padronização que possa orientar o profissional na prática clínica (Denkert *et al.*, 2015).

Estudos analisaram a expressão de Ki67 em pacientes com CCEB, sendo a área distante do tumor original examinada, ou seja, a mucosa clinicamente e histologicamente normal oposta ao tumor primário de CCEB. Foi observado que esses pacientes apresentavam um valor médio de Ki67 maior do que o controle e que cerca de 20% dos pacientes com CCEB apresentavam um volume de células elevado na mucosa oral clinicamente e histologicamente normal (Montebugnoli *et al.*, 2009).

Análises da capacidade de proliferação da LB confirmam nível de expressão elevado de Ki67 nessas lesões, sendo proposto que Ki67 pode ser um marcador para a ocorrência e a gravidade de displasias. Essa associação da gravidade da lesão com a expressão de Ki67 pode representar-se como fator prognóstico da lesão. Estudo utilizando amostras de CCEB, LB com e sem a presença de displasia mostrou que a expressão de Ki67 é mais alta no CCEB seguida das lesões LB displásicas e as não displásicas. Mostrando que Ki67 pode ser um marcador de malignidade progressiva (Sinanoglu *et al.*, 2015).

A expressão de p16 também vem sendo estudada nestas lesões. A p16 tem sido envolvida com a carcinogênese, sendo uma proteína supressora de tumor. Estudo demonstrou que a sua expressão aumentada em LVP pode apontar para transformação maligna precoce (Kresty *et al.*, 2008).

O gene supressor tumoral p53 é bastante estudado, devido sua função importante na carcinogênese. Foi verificada alta prevalência na expressão de p53 em pacientes que faziam uso de tabaco e nódulo de areca, e que apresentavam lesões displásicas em boca (Kaure *et al.*, 1998). Em estudo realizado com pacientes de Taiwan com LVP observou-se comumente a expressão alterada de p53 e p21^{WAF1} (proteína que regula o ciclo celular), sugerindo que ambas podem apresentar importante valor para o prognóstico dos pacientes. Neste mesmo trabalho observou-se que 75% das amostras de LVP apresentavam imunorreatividade aberrante, sendo que as que

apresentavam para p21^{WAF1} manifestavam frequência maior para a progressão/recidiva de CCEB do que as amostras negativas (Chang *et al.*, 2000).

2.PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivos

2.1.1 Geral

Analisar a expressão de antígenos associados aos mecanismos epigenéticos, especificamente as modificações das proteínas histonas, e o marcador de proliferação Ki67 em amostras de LB, comparando a reatividade imunohistoquímica aos diferentes parâmetros clínicopatológicos.

2.1.2 Específicos

- Avaliar a presença do antígeno relacionado a modificação de histona H3K9ac e H4K12ac na LB.
- Avaliar a percentagem de núcleos imunorreativos das histonas H3K9ac e H4K12ac
- Avaliar a intensidade imunorreativa das histonas H3K9ac e H4K12ac
- Comparar os padrões de reatividade imunohistoquímica com os dados clínicopatológicos.
- Comparar os padrões de reatividade do Ki67 e as modificações de histona.

3.CAPÍTULO 1

TITLE PAGE

Post-translational histone modifications H3K9ac and H4K12ac appear to be associated
with pathogenesis of cell proliferation in oral leukoplakia

Roberta Cristina Gomes Espinosa¹, Anaíra Ribeiro Guedes Fonseca Costa¹, Marcelo Augusto Garcia Júnior¹, Sérgio Vitorino Cardoso¹, Paulo Rogério de Faria², Adriano Mota Loyola^{1*}

1 Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Federal University of
Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

2 Department of Morphology, Institute of Biomedical Sciences, Federal
University of Uberlandia, Uberlândia, MG, Brazil

***CORRESPONDING AUTHOR:**

Adriano Mota Loyola

Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Federal University of Uberlândia, Rua
Pará, 1720, Umuarama, Uberlândia, Brazil – 38405-302
Phone: +55-34-3225-8118; Fax: +55 34 3225 8116
e-mail: loyolaam@gmail.com

Keywords: Histone modifications; oral leukoplakia; immunohistochemistry; oral
cancer; prognosis.

3.1 ABSTRACT

Background: Oral leukoplakia is the most prevalent potentially malignant disorder and the acknowledgement of molecular mechanisms involved in its development and progression to oral squamous cell carcinoma can provide novel biomarkers for determining prognosis and monitoring disease progression. Among these, epigenetic alterations such as histone post-translational modifications have been targeted for investigation considering their roles in gene transcription, chromatin condensation and decondensation, DNA replication and repair, in which H3K9ac and H4K12ac play significant roles. The aim of this study was to analyze the expression of H3K9ac and H4K12ac in oral leukoplakia and its association with cell proliferation marker Ki-67 and clinical-pathological data.

Methods: Samples of 50 cases of oral leukoplakia and 15 fragments of normal mucosa were submitted to immunohistochemical assay for H3K9ac, H4K12ac and Ki-67 expression. Quantitative analysis was performed measuring integrated optical density and percentage of positive nuclei.

Results: Expression of H4K12ac in oral leukoplakia was significantly different from normal mucosa for both mean integrated optical density values ($p=0.007$) and percentage of positive nuclei ($p=0.02$) in comparison to control group. No association could be found among sociodemographic and clinical-pathological data. However, Ki-67 expression correlated positively with percentage of positive nuclei for H3K9ac ($p<0.0001$) and with integrated optical density for both histone modifications (H3K9ac, $p=0.0007$; H4K12ac, $p=0.002$).

Conclusion: The present findings suggest that H3K9ac and H4K12ac contribute to the development of oral leukoplakia by regulating epithelial cell proliferation mechanisms.

3.2 INTRODUCTION

Tumorigenesis is a multistep event in which normal cells evolve progressively to a neoplastic state after acquiring advantageous phenotypes through a succession of changes in their genome and epigenome¹⁻³. During the transformation of these cells into malignant derivatives, intermediate stages of this process can be detected as oral potentially malignant disorders (OPMD) (or potentially premalignant oral epithelial lesions) in several organ sites^{1,4}. Oral leukoplakia (OL) is the most prevalent OPDM, defined as white plaques of questionable risk that cannot be identified as any other condition^{4,5}.

Epigenetics has emerged as an important mechanism in the development of several human diseases⁶, including cancers and their precursor lesions^{7,8}. Heritable changes in gene function that do not comprise alterations of the DNA sequence characterize the epigenetic phenomenon, including DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs, which have been targeted for antineoplastic therapy due to their reversibility⁹. Alterations such as DNA methylation¹⁰ and microRNAs¹¹ have been thoroughly investigated over histone modifications in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and OL^{12,13}.

Post-translational histone modifications (PTHM) regulate several DNA-templated processes, including activation and inactivation of gene transcription, chromatin condensation and decondensation, DNA replication and repair^{14,15}. These effects are promoted by a variety of covalent modifications of histone N-terminal tails that change the accessibility of chromatin or that regulate its interaction with non-histone effector proteins¹⁶. All core histones (H2A, H2B, H3 and H4) can suffer methylation, acetylation, ubiquitylation, sumoylation and phosphorylation on specific amino acid residues in various combinations that form the so-called “histone code”¹⁷.

Histone modifications result in altered expression patterns of key genes (oncogenes and, tumor suppressor genes) contributing to the multistep process toward malignant transformation⁶. In this context, enzymatic acetylation of lysine residues in histone tails decreases their overall positive charge and their affinity for

negatively charged DNA, facilitating the binding of proteins that regulate transcription. Alterations in the balance between histone acetylation and deacetylation is associated to cancer initiation and progression, as the acetylation status of different histones is responsible for chromatin assembly, transcription and gene expression¹⁸.

In the literature, histone methylation patterns have been investigated in OSCC and OPMD, but few studies have evaluated the expression of acetylation markers in oral carcinogenesis, correlating histone acetylation with tumor progression and prognosis^{12,19}. The aim of this study was to evaluate the expression of H3K9ac and H4K12ac in OL, analyzing the association between these histone markers with clinical-pathological data and malignant transformation.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Tissues

The present research was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Federal University of Uberlândia (CAAE: 60858016.1.0000.5152, CEP-UFU #1.516.159). Samples analyzed consisted of 50 OL retrieved from the Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Brazil, from 1994 to 2016. Each case had its diagnosis confirmed through the analysis of tissue sections stained with hematoxylin and eosin in light microscopy, according to WHO criteria⁶. Sociodemographic (age, gender and exposition to tobacco products) and clinicopathological data (location, dimension, clinical type, presence of dysplasia, malignant transformation) were retrieved from medical records. All cases included were required not to present in their natural history any record of specific causative agent besides tobacco, and should not meet any of the following exclusion criteria: remission after removal of possible causative agent, with exception of tobacco; incomplete data on socio-demographic and clinic-pathological aspects; insufficient biological material obtained from incisional or excisional biopsy. Multiple specimens were removed in incisional biopsies of patients presenting heterogeneous lesions, in order to obtain more representative samples. All cases were followed for at least two years. Besides of the OL samples, fifteen fragments of normal mucosa obtained from

non-smoking patients were also submitted to the assay and used as parameter for constitutive expression of the histone modification markers. They consisted of normal tissue from the periphery of other lesions located in the cheek, lip, floor, palate and alveolar ridge.

3.3.2 Immunohistochemistry

Immunohistochemical assay was performed using the streptavidin-biotin-peroxidase method. The sections obtained were prepared on organosilane-coated glass slides and submitted to deparaffinization and rehydration. The slides were immersed in 10% ammonium hydroxide with ethanol 95% during 10 minutes for formalin pigment removal. The antigen retrieval was performed with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1mM) buffered with sodium hydroxide (pH 8.0) in a steamer for 15 minutes at 110°C. Intrinsic enzymatic activity of avidin and biotin was blocked using solution containing egg and milk, as proposed by Miller et al. Endogenous peroxidase was blocked with 3% hydrogen peroxide in three staining baths of 10 minutes. The slides were rinsed with buffer solution TRIS-HCl (pH 7.4) in three baths of 5 minutes and incubated with Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, USA) for 15 minutes. Immunostaining was performed by incubating the following primary antibody diluted in TRIS-HCl at room temperature for 2 hours: anti-H3K9ac (Abcam, ab 10818, 1:1000), anti-H4K12ac (Abcam, ab61238, 1:20000) and anti-Ki67 (Abcam, ab16667, 1:500). Reaction was amplified with the streptavidin-biotin-peroxidase system (LSAB+®, Dako, Carpinteria, CA, EUA). Slides were incubated with the secondary biotinylated antibody for 20 minutes, followed by the streptavidin-biotin-peroxidase for 10 minutes, both in humid chamber. The reaction was developed using chromogen 3,3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, USA) and hydrogen peroxide for 5 minutes. The sections were counterstained with Harris' hematoxylin, dehydrated in increasing concentrations of alcohol (70%, 80%, 90% and 100%) and diaphanized in two xylene baths. Positive controls consisted of immunoreactive tissue of cervical and breast cancer as suggested by the manufacturer, and negative controls were obtained by omitting primary antibodies.

3.3.3 Immunohistochemical analysis

Slides were scanned with Aperio AT2 (Leica Biosystems Imaging, Inc., Nussloch, Germany) and immunohistochemical analysis was performed using ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, version 1.38e/Java 1.5.0_09). For quantification of immunostaining, number of positive nuclei and mean values of integrated optical density (IOD) were obtained, the latter considering intensity and the percentage of stained areas. Optical density calibration was performed in accordance with the protocol available at <https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>. Photomicrographs with 200x of magnification were obtained of each slide using ImageScope (Leica Biosystems Imaging, Inc., Nussloch, Germany). From these photomicrographs, three distinct areas were selected with *Freehand Selections tool*, always including about five cell layers starting from basal layer to stratum spinosum, followed by image processing with Color Deconvolution plugin for HDAB after calibration of scale bar (approximately 1.993 pixels/ μm). *Cell counter tool* was applied to count nuclei in both (H/E) and DAB images, providing the final absolute and relative number of nuclei positive for Ki-67, H3K9ac and H4K12ac. In order to obtain IOD values for H3K9ac and H4K12ac immunostaining, a selection restrained to the nuclear area was created over the hematoxylin images using *Create Selection tool*. This selection was then applied to the DAB images, in which mean IOD values of stained areas were measured. This procedure was performed in both OL and normal tissue samples. Mean IOD values of the control samples were used as cut off to separate high and low values of H3K9ac and H4K12ac immunohistochemical expression.

3.3.4 Data analyzes

Descriptive statistics were used to describe the sociodemographic, clinicopathological and immunostaining findings of the OL. For the analysis purpose, clinical type of OL were defined as homogeneous (HL) and nonhomogeneous (NHL)^{4,5}; presence of dysplasia was classified according to Kujan et al^{20,21} as being of low risk (LRL) and high risk leukoplasia (HRL). Differences in PTHM immunoreactivities (IOD and percentage of reactive nuclei) for OL and respective controls were tested with Student

t test and Mann-Whitney *U* test, and ANOVA and Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test. Presence of association among sociodemographic and clinicopathological aspects of OL with IOD and percentage of reactive nuclei for PTHM was tested by using the exact Fisher test or Pearson chi-square test. The Spearman rank correlation test was performed to test the correlation between proportion of immunoreactive nuclei and IOD scores of PTHM and Ki67 scores for OL. Alfa value was defined as 0.05 in a 95% confidence interval. Statistical significance was obtained when $p < 0.05$. All analyses were performed with GRAPHPAD PRISM, version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.4 RESULTS

The mean age of subjects diagnosed with oral leukoplakia was 54.1 ± 12.9 years (sd), with male patients being 51.8 ± 9.9 years old (sd) and female 57.3 ± 15.8 years old (sd). Most cases affected men (64.0%) in the buccal mucosa (40%), followed by tongue and floor of mouth (16%).

Large lesions ($\geq 200\text{mm}^2$) were frequent (60%), with an average diameter of 3.5 cm ($\pm 2,2$). Approximately 60% of the cases consisted of low risk leukoplakia (LRL) while 56% were homogeneous. Most patients were smokers (86%). Malignant transformation occurred in only 18% of OL during the period of evaluation.

For H4K12ac, percentage of positive nuclei ranged from 35.4 to 91.9, with a mean of 74.9 ± 12.8 (sd). Integrated optical density (IOD) values ranged from 230.1 to 2006.0, with a median of 536.3. Differences were observed for percentage of positive nuclei and IOD in comparison to the control group, which were statistically significant (Figure 1). When analyzing the percentage of positive nuclei according to stratified sociodemographic and clinical-pathological variables, a statistically significant difference was observed only for the location of OL, specifically between tongue/ floor and other locations (Figure 2).

No association could be found among sociodemographic and clinicopathological data of OL and PTHM. However, a positive and more expressive, albeit moderate, relationship was found between the percentage of nuclei reactive for

H3K9ac and Ki-67, this being statistically significant. Positive and statistically significant relationship was also observed between IOD values for the two histone modifications studied and Ki-67 (Figure 3).

3.5 DISCUSSION

Alterations in the epigenome have been shown to occur in the early stages of tumorigenesis and can be distinctively observed in the progression of dysplasia to neoplasia in premalignant disorders⁷.

In fact, levels of H3K4me2 and H3K4me3 are significantly increased from normal oral tissues to leukoplakia and oral squamous cell carcinoma²². Additionally, H3K4 and H3K9 methylation were found higher in dysplastic lesions and cancer tissues when compared to normal oral epithelium²³, suggesting that the increase in these histone marks is a potential mechanism of oral carcinogenesis.

Histone acetylation is a core mechanism controlling transcriptional activity, replication, site-specific recombination and DNA repair¹⁸. Among all histone modifications, acetylation has the higher potential to promote chromatin decompaction, allowing transcription factors to access the DNA¹⁴. Alterations in acetylation patterns result in transcriptional deregulation of several genes involved in cell cycle and apoptosis, thereby contributing to tumor initiation and progression²⁴. Acetylation of lysine residues 3, 9, 14 and 27 of histone H3 has been related to increased gene expression, whereas acetylation of histone H4 is associated to post-replication chromatin assembly and repressive histone marks, therefore leading to the silencing of gene transcription^{25,26}.

Loss of histone acetylation is considered a common marker for many human tumors²⁷. In oral cancer, histone acetylation has been associated to activation of oncogenes, as well as to defects in DNA repair and checkpoints, while the silencing of tumor suppressor genes has been attributed to histone deacetylation²⁸.

The present study analyzed the expression of H3K9ac and H4K12ac in human samples of oral leukoplakia. In general, H3K9ac was expressed weakly and in a

scattered fashion along the epithelial layers, and had no significant correlation to any sociodemographic or clinic-pathological data. Webber et al.¹² found that samples of oral squamous cell carcinoma were hypoacetylated in comparison to oral leukoplakia and normal tissues, though no significant difference was observed between leukoplakia and normal mucosa for H3K9ac expression. Hypoacetylation in H3K9 was also detected in the oral rinse of patients with OSSC, which was not observed in healthy patients²⁹. These findings, altogether, suggest that the loss of acetylation in H3K9 may occur as a late event in oral carcinogenesis.

On the other hand, expression of H4K12ac was high in samples of OL, which were significantly different from the normal mucosa. In OSSC, tumors with median H4K12ac expression correlated significantly with gender and alcohol intake, whereas high H4K12ac-expressing tumors also correlated with cervical lymph node metastasis¹³. This may indicate that H4K12ac also contributes to the transformation of normal oral epithelium into premalignant and malignant lesions.

There are limitations in the analysis of histone PTMD expression results. We herein performed an objective analysis using ImageJ to quantify the immunohistochemical expression of H3K9ac and H4K12ac by counting positive nuclei and measuring integrated optical density. Other methods, however, may also present limiting characteristics. Quantitative techniques such as western blotting and polymerase chain reaction (qPCR) can be used in association to immunohistochemical assay to improve data results.

To the author's knowledge, this is the first study analyzing the expression of H3K9ac and H4K12ac in oral leukoplakia. Despite the lack of correlation between histone modifications and clinical data, it is possible to conclude that H3K9ac and H4K12ac are important histone markers in the development of oral premalignant lesion such as leukoplakia, probably by regulating epithelial cell proliferation mechanisms.

In summary, our findings demonstrate that H3K9ac and H4K12ac may play distinct roles in the development of oral leukoplakia. By contrast, data recently

published by our department demonstrated that H3K9ac and H4K12ac were both reduced from normal epithelium to actinic cheilitis, indicating that the loss of these histone marks is associated to environmental damage induced by actinic radiation⁸. This finding suggests that histone modifications may act differently in distinct oral premalignant disorders. Further researches are necessary to elucidate the participation of this epigenetic alteration in oral carcinogenesis.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Brazilian governmental agencies Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Special thanks to Aline Carla Alves Silva Andrade (*BSc, MSc*) and Rafael Antônio Veloso Caixeta (undergraduate student in dentistry) for technical support in sample data registration.

3.7 CONFLICTS OF INTEREST

There are no interest conflicts.

3.8 REFERENCES

1. Hanahan D, Weinberg RA. *The Hallmarks of Cancer*. Cell 2000; 100: 57-70.
2. Hanahan D, Weinberg, RA. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell 2011; 144: 646-674.
3. Chaffer CL, Weinberg, RA. *How does multistep tumorigenesis really proceed?*Cancer Discov 2015; 5: 22-24.
4. Warnakulasurya S. *Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2018; 6: 582-590.
5. El-Naggar AK, Chan JKC, Takata T et al. *The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives*. Hum Pathol 2017; 66:10-12.
6. Portela A, Esteller M. *Epigenetic modifications and human disease*. Nat Biotechnol 2010; 28: 1057-1068.
7. Cardiff RD, Borowsky AD. *Precancer: Sequentially Acquired or Predetermined?*Toxicologic Pathology 2010; 38: 171-179.
8. Freitas Filho SAJ, Servato JSS, Sá RT et al. *Evaluation of specific modified histones in lip carcinogenesis*. Pathol Res Pract 2018; 214: 876-880.
9. Biswas S, Roo CM. *Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond*. Pharmacology & Therapeutics 2017; 173: 118-134.
10. Huang YK, Peng BY, Wu CY et al. *DNA methylation of PAX1 as a biomarker for oral squamous cell carcinoma*. Clin Oral Invest 2013; 18: 801-808.
11. Brito JAR, Gomes CC, Guimarães ALS et al. *Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia*. J Oral Pathol Med 2014; 43: 211–216
12. Webber LP, Wagner VP, Curra M et al. *Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral câncer*. Histopathology 2017; 71: 278-286.
13. Campos-Fernández E, Matsuo FS, Andrade MF et al. *Prognostic value of H3S10 phosphorylation and H4K12 acetylation in oral squamous cell carcinoma*. Histopathology 2018.

14. Kouzarides T. *Chromatin Modifications and Their Function*. Cell 2007; 128: 693-705.
15. Dawson MA, Kouzarides T. *Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy*. Cell 2012; 150: 12-27.
16. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. *Epigenetics in cancer*. Carcinogenesis 2010; 31: 27-36.
17. Li B, Cary M, Workman JL. *The Role of Chromatin during Transcription*. Cell 2007; 128: 707-719.
18. Grunstein M. *Histone acetylation in chromatin structure and transcription*. Nature 1997; 389: 349-352.
19. Chen YW, Kao SY, Wang HJ et al. *Histone Modification Patterns Correlate with Patient Outcome in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Cancer 2013; 119: 4259-67.
20. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A et al. *Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation*. Oral Oncol 2006; 42: 987-93.
21. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ et al. *Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation*. Oral Oncol. 2007 Mar;43(3):224-31.
22. Mancuso M, Matassa DS, Conte M et al. *H3K4 histone methylation in oral squamous cell carcinoma*. Acta Biochim Pol 2009; 56: 405-10.
23. Piyathilake CJ, Bell WC, Jones J et al. *Patterns of global DNA and histone methylation appear to be similar in normal, dysplastic and neoplastic oral epithelium of humans*. Dis Markers 2005; 21: 147-151.
24. Advani AS, Gibson SE, Douglas E et al. *Histone H4 acetylation by immunohistochemistry and prognosis in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients*. BMC Cancer 2010, 10: 387.
25. Turner BM. *Histone acetylation and an epigenetic code*. Bioessays 2000; 22: 836-45.
26. Gasche J, Goel A. *Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis*. Future Oncol 2012; 8:1407-1425.

27. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, et al. *Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer*. Nat Genet 2005; 37: 391-400.
28. Mascolo M, Siano M, Ilardi G et al. *Epigenetic Disregulation in Oral Cancer*. Int J Mol Sci 2012; 13: 2331-2353.
29. Kusumoto T, Hamada T, Yamada N et al. *Comprehensive Epigenetic Analysis Using Oral Rinse Samples: A Pilot Study*. J Oral Maxillofac Surg 2012; 70: 1486-1494.

3.9 FIGURES

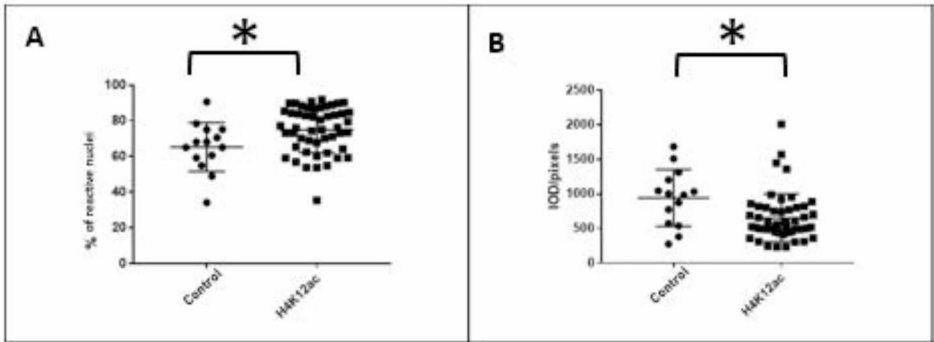


Figure 1.

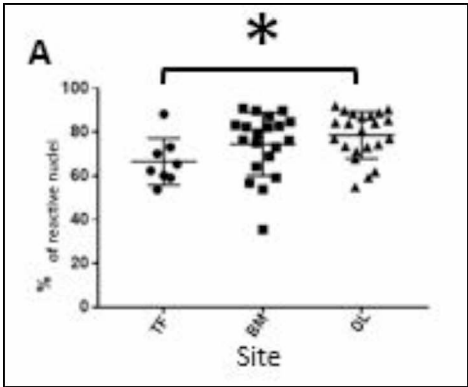


Figure 2.

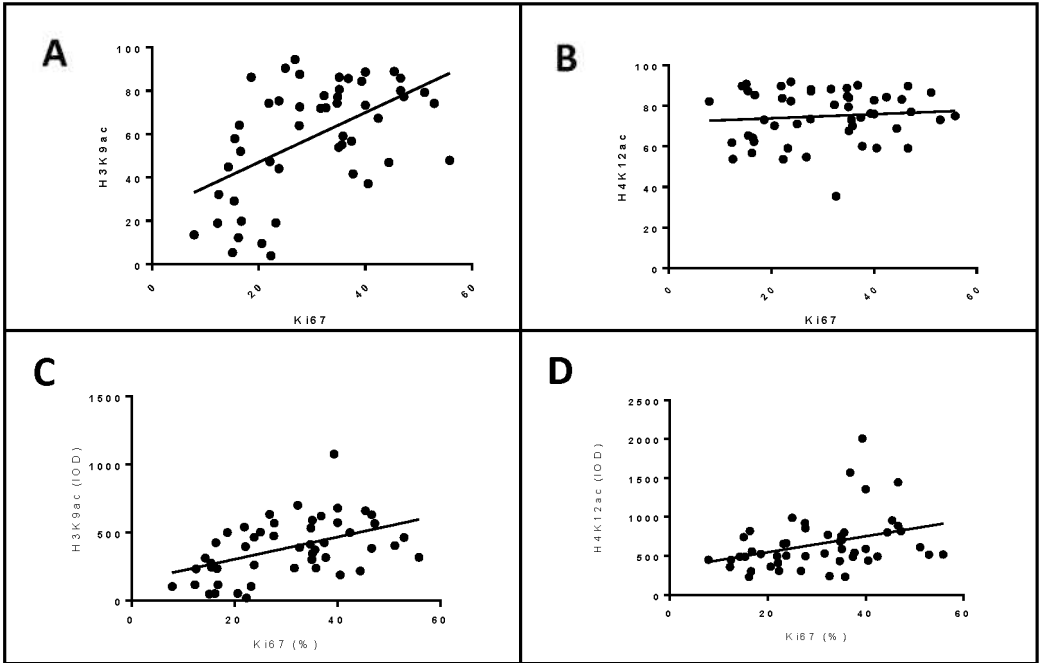


Figure 3.

3.10 FIGURE LEGENDS

Figure 1: Comparison of the values found for the antigenic reactivity between the control sample and oral leukoplakia. (A) Percentage of area of immunoreactive nuclei (Student's t test, $p = 0.02$); (B) Intensity of stain by IOD (Mann-Whitney U-test, $p = 0.007$).

Figure 2: (A) Comparison of the percentage values of immunoreactive nuclei for H4K12ac in cases of leukoplakia for the different sites: TF - tongue and floor; BM - buccal mucosa; OL - other locations: lip, palate, gum, alveolar ridge, hard and soft palate (Kruskal-Wallis test, Dunn post-test, $p = 0.04$).

Figure 3: Correlation between the percentage of histone modifications and IOD values for H3K9ac and H4K12ac and the extent of proliferative activity from values obtained for Ki-67 immunoreactivity. (A) Correlation between percentage of nuclei reactive for H3K9ac and Ki-67 ($r = 0.28$, $p < 0.0001$). (B) Correlation between percentage of nuclei reactive for H4K12ac and Ki-67 ($r = 0.008$, $p = 0.5$). (C) Correlation between nuclear reactivity IOD levels for H3K9ac and Ki-67 ($r = 0.47$, $p = 0.0007$); (D) Correlation between nuclear reactivity IOD levels for H4K12ac and Ki-67 ($r = 0.43$, $p = 0.002$).

4.CONCLUSÃO

Apesar da falta de correlação entre as modificações de histonas e dados clínicos, é possível concluir que H3K9ac e H4K12ac são importantes marcadores no desenvolvimento da lesão oral pré-maligna, como a leucoplasia, provavelmente pela regulação dos mecanismos de proliferação de células epiteliais.

5.REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MA, Franceschi FS, Rosenberg PS, et al. Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. **J Clin Oncol**. 2013;31(36):4550-9.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.3870>
2. Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue- clinicopathologic features affecting outcome. **Cancer**. 2012;(118):101–11.
<https://doi.org/10.1002/cncr.26229>
3. INCA. Estimativa 2018. Rio de Janeiro; acessado em junho de 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>.
4. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**. 2007; (36):575–80.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x>
5. World Health Organization Collaborating Centre for Oral Precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral pre-cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1978; (46): 518-39.
6. El naggar. What Is New in the World Health Organization 2017 Histopathology Classification? **Curr Treat Options Oncol**. 2017;(7):43.
7. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**. 2011; (11):9–22.
<https://doi.org/10.1038/nrc2982>
8. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **J Oncol**. 2011;603740.
<https://doi.org/10.1155/2011/603740>
9. Lee JJ, Hung HC, Cheng SJ, Chen YJ, Chiang CP, Liu BY et al. Carcinomas e dysplasia in oral leukoplakia in Taiwan: prevalence and risk factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 2006; (101):472-80.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.024>
10. Lee CH, Ko AM, Warnakulasuriya S, Yin BL, Sunarjo, Zain RB, Ibrahim SO et al. Inter-country prevalences and practices of betelquid use in south, southeast and

- eastern Asia regions and associated oral preneoplastic disorders: an international collaborative study by Asian betel-quid consortium of south and east Asia. **Int J Cancer** 2011;(129):1741–51.
<https://doi.org/10.1002/ijc.25809>
11. Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2006; (15): 774–81.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0842>
 12. Van der Wall I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: present concepts of management. **Oral Oncol.** 2010; (46): 423-25.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.02.016>
 13. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med.** 2008; (37): 127–33.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x>
 14. Ram S, Siar CH. Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2005; (34): 521–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2004.10.008>
 15. Missmann M, Jank S, Laimer K, Gassner R. A reason for the use of toluidine blue staining in the pre-surgical management of patients with oral squamous cell carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006; (102): 741–43.
<https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.03.012>
 16. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology.** 2009;(45): 317–323.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.016>
 17. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics. Head and neck tumours. **World Health Organization**; 2005.

18. Brothwell DJ, Lewis DW, Bradley G, Leong I, Jordan RC, Mock D, et al. Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. **Community Dent Oral Epidemiol.** 2003;(31):300-5.
19. - Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol.** 2006;(42):987–93.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2005.12.014>
20. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncol.** 2007;(3):224-31.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2006.03.009>
21. Liu W, Shi LJ, Wu L, Feng JQ, Yang X, Li J, et al. Oral Cancer Development in Patients with Leukoplakia – Clinicopathological Factors Affecting Outcome. **PLoSOne.** 2012;7(4): e34773.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034773>
22. Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jainawalla PN, et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. **Community Dent Oral Epidemiol.** 1980;(6):283–333.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1980.tb01302.x>
23. Kil TJ, Kim HS, Kim HJ, Nam W, Cha I. Genetic Abnormalities in Oral Leukoplakia and Oral Cancer Progression. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2016; (17):3001-06.
24. Taby R, Issa JJ. Cancer Epigenetics. **CA Cancer J Clin.** 2010; (60):376-92.
<https://doi.org/10.3322/caac.20085>
25. Verma M, Srivastava S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol.** 2002;(12):755-63.
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00932-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00932-4)
26. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. **Seminars in Cancer Biology.** 2004;(14): 427–32.
<https://doi.org/10.1016/j.semancer.2004.06.005>

27. Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. **Cell**. 1999; (98): 285±94.
28. Grunstein M. Histones as regulators of genes, **Sci. Am.** 1992; (267):68–74.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican1092-68>
29. Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. **Curr Opin Genet Dev**. 2003; (13):127-35.
[https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(03\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(03)00026-1)
30. Wolffe AP, Hayes JJ. Chromatin disruption and modification. **Nucleic Acids Res**. 1999; (27):711±20.
31. Fan Y, Nikitina T, Zhao J, Fleury TJ, Bhattacharyya R, Bouhassira EE et al. Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. **Cell**. 2005; (7):1199 212.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.028>
32. Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. **Curr Biol**. 2004;(14):546-51.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>
33. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. **Science**.2001; (293):1074–80.
<https://doi.org/10.1126/science.1063127>
34. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer, **Nat. Rev. Genet**. 2006; (7):21–33.
<https://doi.org/10.1038/nrg1748>
35. Shahbazian MD, Grunstein M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. **Annu Rev Biochem**. 2007;(76):75-100.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.162114>
36. Almeida LO, Abrahao AC, Rosseli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM et al. NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). **FEBS Open Bio**. 2013; (4):96-04.
37. Webber LP, Wagner VP, Curra M, Vargas PA, Meurer L, Carrard VC, et al. Hypoacetylation of acetylhistone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathol**. 2017;(2):278-86.

38. Juríková M, Danihel L, Polák Š, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. **Acta Histochem.** 2016;118(5):544-52.
<https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.002>
39. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. **Breast.** 2015;24 Suppl 2:S67-72.
<https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.017>
40. Montebugnoli L, Badiali G, Marchetti C, Cervellati F, Farnedi A, Foschini MP. Prognostic value of Ki67 from clinically and histologically 'normal' distant mucosa in patients surgically treated for oral squamous cell carcinoma: a prospective study. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2009;38(11):1165-72.
<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2009.06.011>
41. Sinanoglu A, Soluk-Tekkesin M, Olgac V. Cyclooxygenase-2 and Ki67 Expression in Oral Leukoplakia: a Clinicopathological Study. **J Oral Maxillofac Res.** 2015; 30;6(2):e3.
42. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Li J, Lloyd M, Casto BC et al. Frequent alterations of p16INK4a and p14ARF in oral proliferative verrucous leukoplakia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2008;17(11):3179-87.
<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0574>
43. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Prognostic significance of p53 protein overexpression in betel- and tobacco-related oral oncogenesis. **Int J Cancer.** 1998; 21;79(4):370-5.

6.ANEXOS

ANEXO6.1-Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

 UFU Comitê de Ética em Pesquisa	UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA/MG	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Avaliação de alterações epigenéticas em doenças da região bucomaxilofacial.		
Pesquisador: ADRIANO MOTA LOYOLA		
Área Temática:		
Versão: 2		
CAAE: 60858016.1.0000.5152		
Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/UFU/MG		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 2.001.481		
Apresentação do Projeto:		
<p>Conforme apresenta o protocolo, As modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas. Evidências recentes sugerem a participação de componentes epigenéticos também em lesões cancerizáveis. Esse estudo foi desenvolvido para analisar as alterações epigenéticas associadas à carcinogênese humana na região bucomaxilofacial. Padrões dessas alterações têm sido observados em amostras dessas neoplasias. A identificação e caracterização desses distócos padrões se faz essencial para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes e efetivas, além de proporcionar a tentativa de explicar a etiopatogenia, e detectar possíveis influências das mesmas no comportamento desses tumores. Até recentemente, o sequenciamento de DNA para identificar mutações genéticas em neoplasias era impraticável e caro. Os recentes avanços tecnológicos nesse processo, como a criação do método de sequenciamento de última geração, baseada no uso de semicondutores Ion Proton, otimizou o custo e o tempo do sequenciamento, além de oferecer resultados mais confiáveis. Usando o Ion Proton, os pesquisadores sequenciarão genes mais comumente relacionados às alterações em histonas, buscando identificar o papel dessas alterações epigenéticas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis.</p>		
Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica		
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.456-144		
UF: MG Município: UBERLÂNDIA		
Telefone: (34)3236-4331 Fax: (34)3236-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br		

Página 31 de 38

(leucoplasia, entropiasia e queilite actínica). Serão considerados na composição da amostra tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, entropiasia e queilite actínica). Todos os casos incluídos nesse estudo serão coletados prospectivamente, a partir da aprovação do presente projeto, e retrospectivamente, a partir de 1978 (início do arquivamento das amostras cirúrgicas do Laboratório de patologia bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia). A coleta dos casos em ambas as situações se fará até 2021 período limite do desenvolvimento do estudo, perfazendo um número provável de 320 amostras ao final, baseado na frequência de seus diagnósticos registrados no Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia. Todos os casos elegíveis serão incluídos no estudo a partir da aceitação do paciente, mediante a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar e analisar alterações epigenéticas, em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, entropiasia e queilite actínica) e sua relação com comportamento biológico e parâmetros clinicopatológicos das lesões supracitadas.

Objetivo Secundário:

- A) Descrever as características clinicopatológicas das lesões estudadas, considerando, quando pertinente, a possibilidade de estudar casos isolados ou pequenas série de casos, especialmente quando os casos trouxerem informações inusitadas em relação ao que é conhecido pela literatura;
- B) Descrever e semiquantificar os padrões de reatividade imunoistoquímica de vários antígenos representativos das modificações de histonas, nas lesões supracitadas;
- C) Analisar os padrões de reatividade imunoistoquímica com os dados clínico-patológicos nas diferentes lesões a busca de associações entre os padrões e comportamento biológico das lesões e sobrevida dos pacientes;
- D) Quantificar por Western Blotting, a presença de proteínas histonas modificadas, em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, entropiasia e queilite actínica);

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: 2.001.461

E) Mapear as mutações gênicas de histonas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica); F) Avaliar a presença de miRNA relacionados as proteínas histonas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: Os participantes incluídos na pesquisa serão submetidos a riscos considerados mínimos, que consistem em incômodo ou desconforto no momento da coleta do material. Os mesmos serão coletados após a retirada cirúrgica, que acontecerá, independentemente da realização desta pesquisa. Essa coleta será realizada por profissional experiente das clínicas de estomatologia e cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. O risco de identificação do participante da pesquisa será minimizado através da aplicação das seguintes medidas: a privacidade do participante da pesquisa será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo. Não serão utilizadas identificações como as iniciais do nome do participante, cada participante será identificado por um número no instrumento de coleta de dados e nos tubos que serão coletadas as amostras, garantindo assim o sigilo da sua identidade em todas as etapas da pesquisa.

Benefícios: Quanto aos benefícios, o projeto pretende proporcionar um melhor entendimento acerca da patogenia dessas lesões. Entendemos que, a depender dos resultados obtidos, o conhecimento gerado por este estudo poderá somar-se a outros já presentes na literatura ou motivar sua expansão para que, oportunamente, possamos vislumbrar o surgimento de técnicas terapêuticas no combate a essas neoplasias, de forma menos invasiva e mais eficiente, proporcionando melhor qualidade de vida aos pacientes tratados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa está descrito de maneira detalhada, permitindo adequada interpretação para a elaboração do parecer ético deste comitê.

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@prop.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.001.481

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.864.897, de 05 de Dezembro de 2018, 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.

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2018.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2019.

Data para entrega de Relatório Parcial ao CEP/UFU: Setembro de 2020.

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: Setembro de 2021.

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 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

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)3235-4131 Fax: (34)3235-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.001.481

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).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_804983.pdf	14/12/2016 20:23:48		Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1864897.pdf	14/12/2016 20:23:12	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Respostas_pendencias_CEP.pdf	14/12/2016 20:22:32	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	14/12/2016 20:18:20	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/12/2016 20:17:07	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/10/2016 11:31:04	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Questionario.pdf	06/10/2016 13:03:59	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito

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: 2.001.661

Outros	Declaracao_Instituicao_Co_Participante.pdf	05/10/2016 10:03:35	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_compromisso_da_equipe_executora.pdf	05/10/2016 10:01:55	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Carta_de_encaminhamento_de_protocolo.pdf	05/10/2016 10:00:30	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Diretor_HQ.pdf	05/10/2016 09:58:04	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Diretor_FOUFU.pdf	05/10/2016 09:57:24	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Lattes.pdf	05/10/2016 09:53:57	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 05 de Abril de 2017

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Anexo 6.2-Materiais e Métodos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU) (CAAE: 60858016.1.0000.5152, CEP-UFU #1.516.159) (Anexo x).

6.2.1Casuística

Para esta pesquisa foram utilizadas 50 amostras de leucoplasia bucal e 15 casos de mucosa normal originados de margem de lesões inerentes a mucosa. Os casos foram levantados dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (LPBMF-FOUFU), compreendendo o período de 1994 a 2016.

Para os casos foram coletados dados sociodemográficos e clinicopatológicos a saber: idade e sexo dos pacientes; localização primária e dimensão das lesões, tipo clínico, se houve transformação maligna e se o paciente era fumante.

O único critério absoluto considerado para exclusão foi a ausência de material suficiente necessário à investigação antigênica.

6.2.2Ensaio imunohistoquímico

Foram feitos cortes de 3 µm a partir dos blocos parafinados, transferidos para lâminas polarizadas StarFrost® (Knittel Glaser, Brunsquive, BS, Alemanha) ou silanizadas, conforme protocolo do LPBMF-FOUFU. Os ensaios imunohistoquímicos foram desenvolvidos de acordo com protocolos pré-definidos pelo Laboratório, descritos a seguir: primeiramente, para desparafinação, os cortes foram incubados no primeiro banho de xilol (Synth, São Paulo, SP, Brasil) em estufa, a uma temperatura de 56°C durante 30 minutos (min) e em seguida, durante 15 min no segundo banho de xilol à temperatura ambiente. Posteriormente, seguiu-se a hidratação em sessões decrescentes de etanol: duas passagens em etanol 100%, uma passagem em etanol 95% e 80% respectivamente, num período de 5 min cada. Para remoção do pigmento formólico, as amostras ficaram imersas em solução de hidróxido de amônio a 10%

(Synth) em etanol a 95% durante 10 min e após essa etapa, foram feitas sete lavagens em água destilada.

Em seguida, procedeu-se ao resgate antigênico, para o qual as lâminas foram imersas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Amresco, Solon, OH, EUA), a 1,0 mM, tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em um ciclo de 15 min à temperatura de 110°C, em câmara termopressurizada (Steamer – Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Após resfriamento por 40 min, os cortes foram submetidos a cinco banhos de água destilada.

Para o bloqueio da atividade endógena da biotina as lâminas foram imersas durante 15 min à temperatura ambiente em solução preparada com duas claras de ovos dissolvidas em 200 mL de água deionizada e filtrada por três vezes em gaze, seguidos de 10 banhos em água destilada. Já o bloqueio da atividade endógena da avidina, os cortes foram imersos por 15 min à temperatura ambiente em solução preparada com 30g de leite em pó desnatado (Itambé®, São Paulo, SP, Brasil) dissolvido em 180 ml de água deionizada, seguido de dez banhos em água destilada (MILLER, et al, 1999).

Na etapa seguinte, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a imersão dos cortes em três banhos de 10 min cada em solução de peróxido de hidrogênio (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) a 10 volumes, seguidos por cinco banhos em água destilada e posteriormente três lavagens de cinco min cada uma em solução tampão tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl), 20 mM pH 7,4 (Amresco, Dallas, Texas, USA) à temperatura ambiente.

Os cortes foram inicialmente incubados à temperatura ambiente em câmara úmida, em solução bloqueadora de reações inespecíficas a base de caseína (Background Sniper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 15 min. Posteriormente, os anticorpos primários foram diluídos em solução PBS-BSA (tampão fosfato/soro albumina bovina) na titulação previamente estabelecida em testes de padronização: diluição 1:2.000 para H3K9ac (Referência: ab32129), 1:20.000 para H4K12ac (Referência: ab61238) e 1:500 para o Ki67 (Referência: ab16667), adicionados às

lâminas, que então foram incubadas e armazenadas por duas horas à temperatura ambiente em câmara úmida. Todos os anticorpos utilizados foram fornecidos pela Abcam (Cambridge, Reino Unido). Para controle negativo omitiu-se os anticorpos primários na solução de PBS-BSA.

Em seguida, os cortes foram desincubados e lavados em dois banhos de solução de Tris-HCl por dois min cada. Então, foram incubados por 20 min novamente em câmara úmida à temperatura ambiente, com sistema de amplificação estreptavidina-biotina-peroxidase (Trekki Universal Link, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), que consiste em solução de anticorpo secundário biotinilado. Na sequência, os cortes foram lavados por dois banhos em solução de Tris-HCl durante dois min cada.

Adiante, seguiu-se a incubação em complexo terciário a base de estreptavidina conjugada a peroxidase (Trekki Avidin-HRP Label, Biocare Medical) por dez min, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Sucessivamente, os mesmos foram submetidos a duas lavagens em tampão Tris-HCl no período de dois min cada.

Para a revelação da reação utilizou-se substrato cromogênico 3,3'-tetrahidroclorato de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (Betazoid DAB Chromogen Solution, Biocare Medical) por 5 min, seguido por lavagem em água corrente durante o mesmo tempo.

Para finalizar a reação, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, sequentemente lavadas em água corrente, desidratadas em etanol 100% por 10 min, secas em estufa a 60°C e montadas com lamínulas de vidro em resina histológica (Permunt, Fisher Scientific International, Pittsburgh PA, EUA).

6.2.3 Análise de reatividade imunohistoquímica para H3K9ac e H4K12ac

Para a realização da análise imuno-histoquímica da expressão de H3K9ac e H4K12ac utilizou-se o *software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versão 1.38e/Java 1.5.0_09)* através da ferramenta que avalia o índice de absorvância (IOD) da imagem, o qual foi admitido como a relação entre intensidade e a área nuclear

ocupada pela expressão colorimétrica do antígeno pesquisado. O IOD de cada caso representou uma média dos valores obtidos para os campos avaliados.

Inicialmente, todas as lâminas foram escaneadas em ampliação original de 200X, usando o *Slide Scanner* Aperio AT2 (Leica Biosystem Imaging, Inc., Nussloch, Germany) acoplado a um computador (Dell Precision T3600). Posteriormente, foi então submetida a avaliação através do *ImageJ* (Jensen et al, 2013) (Figura 1).

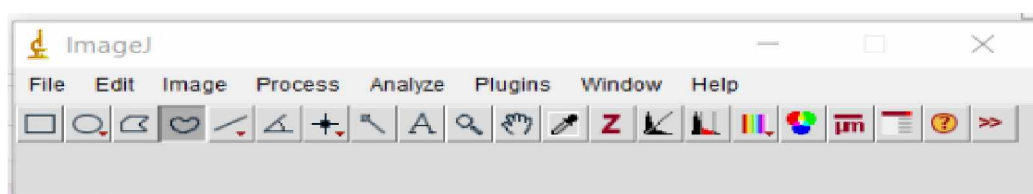


Figura2- Tela inicial do *ImageJ* contendo diferentes ícones relativos às ferramentas utilizadas em morfometria. (Fonte: <https://imagej.nih.gov/ij/features.html>).

6.2.4 Calibração do *ImageJ* para análise morfométrica

Previamente à análise, procedeu-se a calibração dos parâmetros de distância e escala de cinza, indispensáveis para que todas as imagens tenham o mesmo padrão de análise, seguindo-se o protocolo disponível no site www.ImageJ.inh.gov.

6.2.5 Calibração da distância

A calibração de distância permite que se obtenha a informação sobre o número de pixels presentes numa determinada área de valor conhecido. Este dado permite estabelecer a relação entre intensidade de cor (marcação) e pixels avaliados, visando dados proporcionais (relativos) para os casos sob análise. Para tanto, utilizou-se a imagem de um caso, obedecendo as seguintes etapas:

1. Mensuração do valor de pixels presentes em 200 μm a partir da utilização do ícone *Straight line* da barra de ferramenta, dispondo-a sobre a barra de medida em μm (200 μm) presente na imagem (Figura 3);
2. Acessar na barra de ferramentas o ícone *Analyze* e, em seguida, *Set Scale*, possibilitando a abertura de janela para inserção dos dados relativos a distância em μm : no caso distância, 200 e unidade, μm (Figura 4);

3. Marcar o ícone *Global* e *OK*, de forma que os dados fornecidos sejam aplicados a todas as imagens abertas posteriormente.

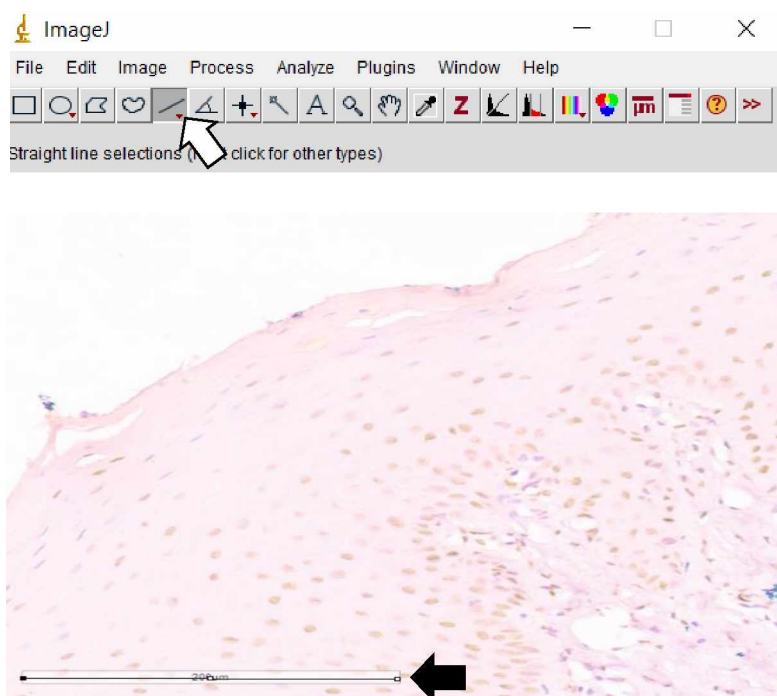


Figura3- Imagem aberta no *ImageJ* utilizada para calibração. A seta branca indica o ícone pressionado na barra de ferramentas que permitirá a inserção da linha sobre a barra de medida em μm (200 μm) presente na imagem (seta escura).

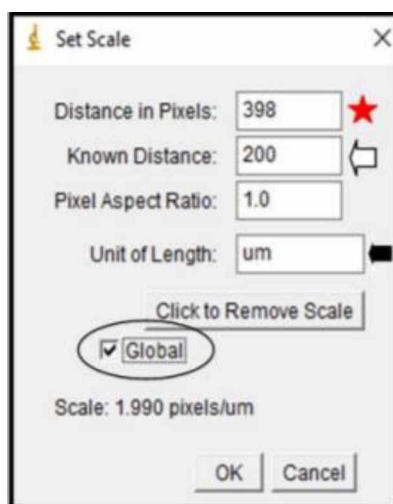


Figura 4-Janela de inserção de dados para calibração de dimensão. O dado *Distance in Pixels* (398) aparece automaticamente (★); na janela *Known Distance* deverá ser inserido o número 200 (seta branca) e na janela *Unit of Length* a unidade de medida (μm) (seta escura). Após estes procedimentos, marcar a caixa de marcação (*checkbox*) *Global*.

6.2.6 Calibração da escala de cinza

Para a mensuração de intensidade, o *ImageJ* trabalha com escala de cinza, sendo dessa forma necessário fazer a conversão desses valores para os de absorbância (intensidade). Este procedimento foi realizado utilizando-se valores relativos a intervalos de densidade de cinza, fornecidos por uma escala previamente calibrada (Kodak nº 3, tutorial (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>)). Para tanto, acessou-se na barra de ferramentas o ícone *Analyze* e então, *Calibrate*. Deste ponto, selecionou-se a função *Rodbard* e a unidade IOD, seguindo-se a inserção de valores obtidos do site <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration> (Figura 5). Este procedimento permite a construção de uma relação entre valores de *pixel* e IOD traduzidos por uma curva exponencial (Figura 6).

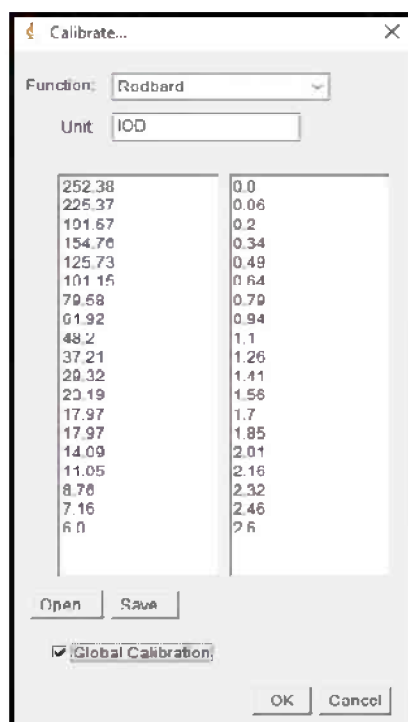


Figura5- Janela de inserção de dados para calibração de absorbância, relativos aos valores de densidade de cinza. Selecionada a função (*Function*) *Rodbard* e a unidade IOD (*Unit*), com a inclusão dos valores de densidades de cinza e absorbância após a clicagem em *Open*. Na janela esquerda estão os valores de cinza, e na janela direita os valores de absorbância correspondentes. A marcação do *checkbox* *Global Calibration* deve ser realizada para a produção de uma curva de correlação entre IOD e *pixels*. (Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>).

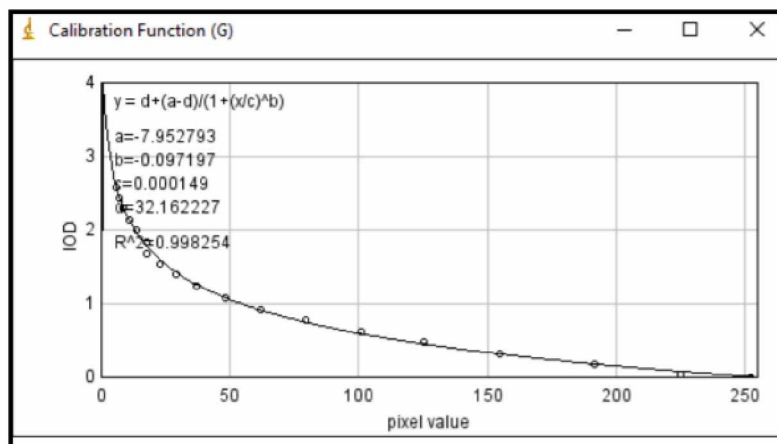


Figura6- Curva de calibração obtida a partir dos valores da escala de cinza e IOD utilizadas na calibração. (Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>).

6.2.7 Análise das imagens

Foi realizada a seleção de três áreas da amostra, sempre incluindo cinco camadas de células partindo da camada basal para a espinhosa (Figura 7). Para isso foram desenvolvidas os seguintes procedimentos: Através da ferramenta *Freehand Selection* foi feita a seleção das áreas. As áreas a serem analisadas foram então colocadas na ferramenta *New Image*, o que possibilitou realizar a análise de forma conjunta.

1. Foi realizada a deconvolução (imagem original é separada em dois matizes, o da coloração pela Hematoxilina e o do DAB) da imagem e contagem dos núcleos na imagem original utilizando o programa, na opção *CellCounter* (Figura 8).
2. Na imagem de DAB, foi aplicado *Threshold* para se ter a marcação nuclear, e assim obter a seleção dos núcleos.
3. Com isso, mais uma contagem foi realizada através da ferramenta *Cell Counter*, para assim termos a relação percentual de núcleos imuno-reativos (Figura 8).

4. Para obtenção da absorbância de reatividade nuclear (IOD), clicou-se em *Analyze* e em seguida *Measure*. Assim todos os núcleos selecionados foram então medidos simultaneamente, e os valores transferidos para a janela *Results* do *software*. Os valores médios dos controles foram considerados como parâmetros para estabelecimento de *cut-off*.

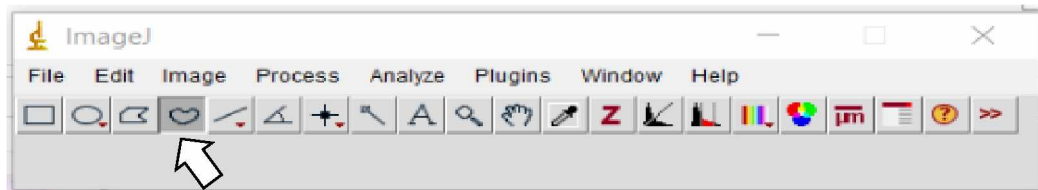


Figura7- Através da ferramenta indicada pela seta, foi feita a seleção das áreas analisadas.

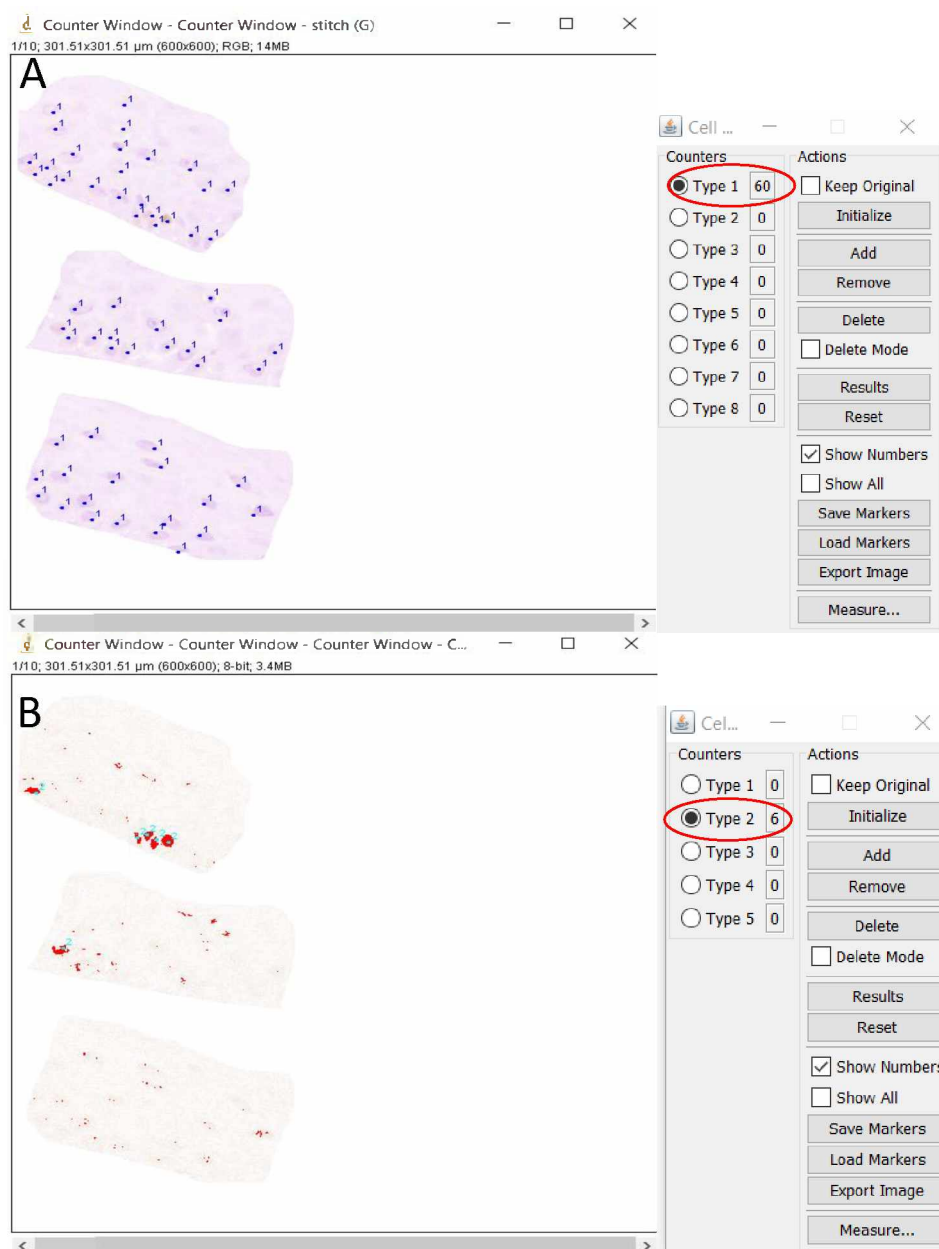


Figura8- Contagem dos núcleos (A) Contagem dos núcleos na imagem original; (B) Contagem dos núcleos na imagem de DAB após a seleção dos núcleos com a ferramenta *Threshold*.

6.2.8 Estatística

Os valores obtidos para os dados sociodemográficos e clinicopatológicos serão descritos a partir de estatística descritiva utilizando-se de valores médios, medianos e de percentuais.

6.2.9 Análise dos dados

Para a realização das análises estatísticas, as variáveis foram assim categorizadas:

1. Idade: não idoso (≤ 65 anos); idoso (> 65 anos);
2. Sexo: masculino; feminino;
3. Localização: LS – língua e soalho bucal; MJ – mucosa jugal; OL – outras localizações: lábio, palato, gengiva, rebordo alveolar, palato duro e mole;
4. Tipo Clínico: LBH, homogênea; LBNH, não homogênea;
5. Tamanho: $\leq 200\text{mm}^2$ e $> 200\text{mm}^2$;
6. Fumante: sim e não;
7. Displasia: LBR, baixo risco; LAR, alto risco;
8. Transformação maligna; sim e não.

A análise estatística foi realizada utilizando-se de *software* GraphPad Prism, versão 7.04 (GraphPad Software, Inc. San Diego, EUA). Inicialmente, os valores obtidos para os diferentes grupos foram testados quanto à distribuição gaussiana pelo teste padrão do software (D'Agostino & Pearson). Para as avaliações comparativas dos valores de percentagem de núcleos imunorreativos e de IOD obtidos entre dois grupos representativos das variáveis definidas para os casos de LB (idade; sexo, localização, tipo clínico; tamanho; fumante; displasia, transformação) foi utilizado teste *t* de Student para distribuição normal e *U* de Mann-Whitney para não normal. Para o estrato de localização foi utilizado *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn*. O teste de correlação de *Spearman* foi empregado para verificar a correlação entre os valores de percentagem de núcleos imunorreativos e de IOD para as modificações de histonas e a extensão de atividade proliferativa dada pelo percentual de positividade para Ki67. Todos os testes foram realizados considerando intervalo de confiança de 95% (*default* do *software*), sendo significativos os valores de $p < 0,05$.

ANEXO 6.3- Resultados

6.3.1 Dados sociodemográficos e clinicopatológicos

O presente estudo foi composto por 50 amostras de LB e 15 casos controle de mucosa normal originados de margem de lesões inerentes a mucosa. Os casos foram diagnosticados em pacientes com média etária de $54,08 \pm 12,9$ (dp), em homens com uma média de idade de $51,8 \pm 9,9$ (dp) e mulheres de $57,3 \pm 15,8$ (dp). A maioria dos diagnósticos foi em homens (64,0%); sendo que mucosa jugal apresentou 40% e língua e assoalho 16%. Em relação ao tamanho, houve uma maior frequência nas leucoplasias maiores que 200mm^2 (60%), com média de 3,51 cm ($\pm 2,226$). A maioria das LB (60%) mostrou-se como LBR, do tipo clínico homogêneo (56%), sendo que a maior parte do total de pacientes era fumante (86%). A maioria dos casos não apresentaram transformação maligna (82%). As amostras de controle utilizadas são de tecido normal provenientes de periferia de outras lesões localizadas em mucosa de bochecha, lábio, assoalho, palato, rebordo alveolar.

6.3.2 Análise e avaliação imuno-histoquímica

6.3.3 Histona H3K9ac

À análise das amostras controle para aH3K9ac, percebeu-se imunorreatividade nuclear difusa por todas as camadas epiteliais não queratinizadas que visualmente mostraram-se com intensidade fraca. O percentual médio de núcleos marcados foi de $71,8 \pm 22,4$ (dp) variando de 7,8 a 90,5; em relação a absorbância (IOD) para reatividade nuclear, houve uma variação de 34,7 a 719,4, com absorbância média de $417,8 \pm 197,9$ (dp).

Para as LB observou-se prevalência de imunomarcção nuclear de intensidade fraca, também dispersa pelos diferentes estratos epiteliais não queratinizados (Figura 9). Percebeu-se uma variação de valores de percentagem de núcleos imunorreativos, compreendendo de 3,9 a 94,4 com uma mediana de 65,7. Em relação à absorbância da reatividade antigênica (IOD) houve uma variação de 19,1 a 1077 com média de $388,4 \pm 212,1$ (dp). Para nenhuma destas variáveis observou-se

diferenças estatisticamente significativas entre as LB e os respectivos controles (Figura 9).

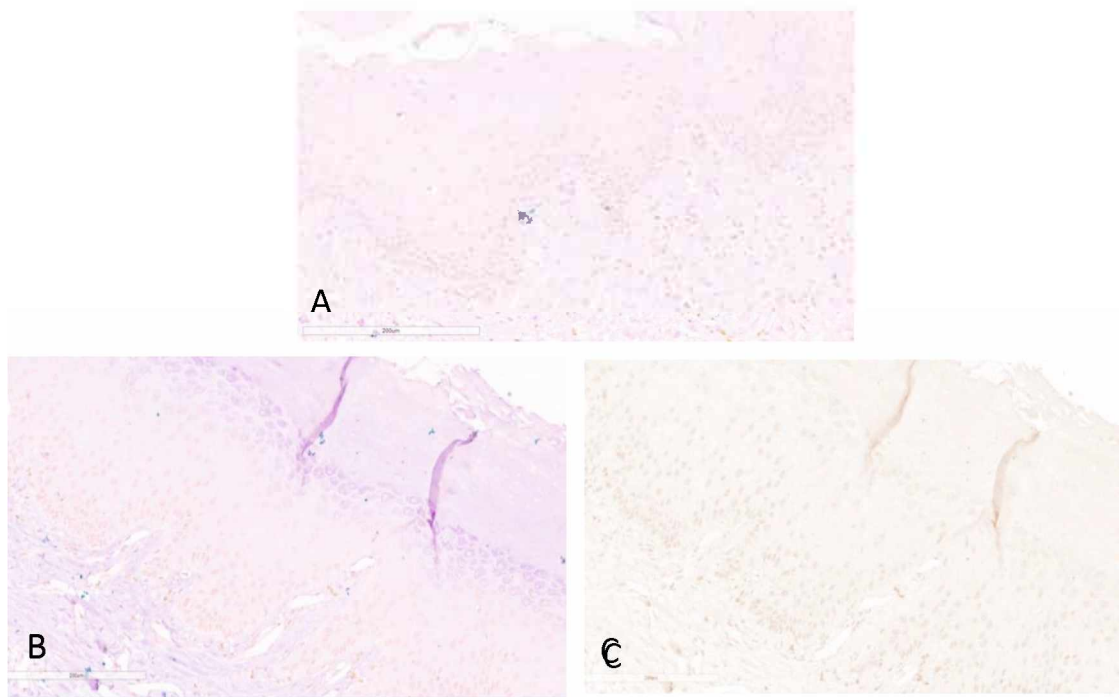


Figura 9-Imunorreatividade antigênica para H3K9ac no epitélio das mucosas incluídas como grupos controle e leucoplasia. (A) Grupo controle com imunorreatividade atenuada de H3K9ac e dispersa nas camadas do epitélio. Em (B) observamos a imunorreatividade antigênica para H3K9ac em leucoplasias bucais; em (C), o mesmo corte histológico é mostrado após a deconvolução da imagem em que temos apenas os núcleos reativos para a referida modificação de histona.

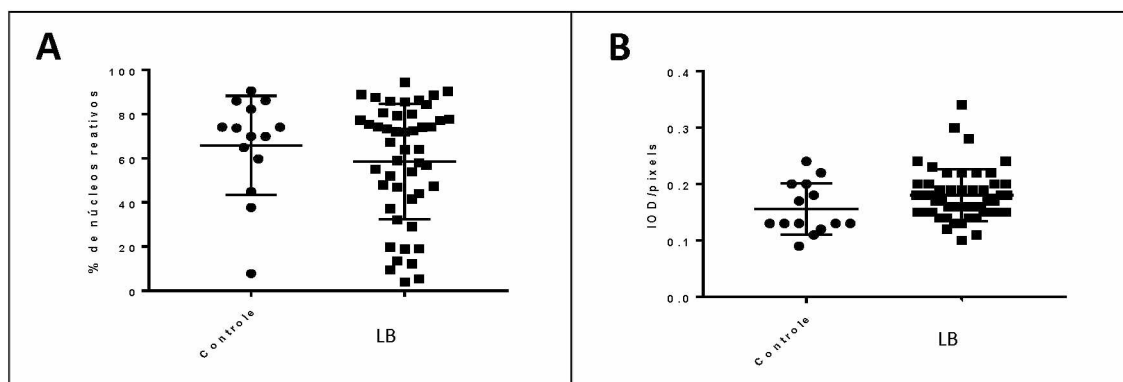


Figura 10: Comparação dos valores percentuais de núcleos reativos e de intensidade de reatividade entre o grupo controle com os casos de leucoplasias bucais referentes a imunomarcagem de H3K9ac. (A) percentagem de núcleos imunorreativos (teste *U* de Mann-Whitney, $p= 0,4658$); (B) Intensidade de imunorreatividade em absorbância (IOD) (teste *t* de Student, $p= 0,6441$).

Ao comparar os valores de percentagem de núcleos reativos e de intensidade de absorbância (IOD) não se observaram diferenças estatísticas significantes entre as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas estudadas (Figuras 11 e 12).

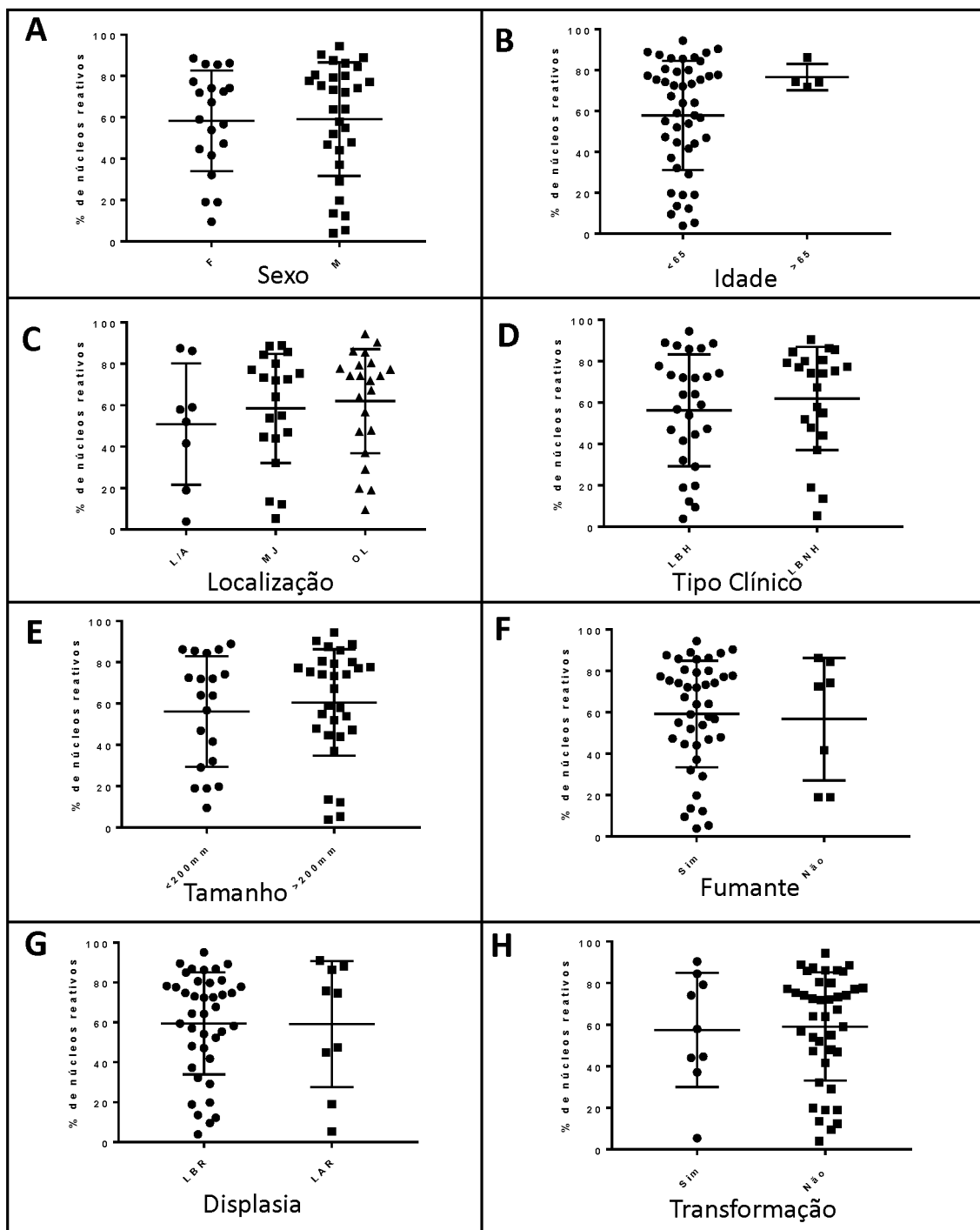


Figura 11: Comparação dos valores de percentagem de núcleos marcados de H3K9ac nos casos de leucoplasia para as diferentes variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas analisadas (A) Sexo (teste *t* de *Student*, $p = 0,91$); (B) Idade (teste *t* de *Student*, $p = 0,34$); (C) Localização: LS – língua e soalho bucal; MJ – mucosa jugal; OL – outras localizações: lábio, palato, gengiva, rebordo alveolar, palato duro e mole (ANOVA, $p = 0,92$); (D) Tipo clínico LBH, homogênea; LBNH, não homogênea (teste *t* de *Student*, $p = 0,45$); (E) Tamanho (teste *t* de *Student*, $p = 0,57$); (F) Fumante (teste *t* de *Student*, $p = 0,82$); (G) Displasia, LBR, baixo risco; LAR, alto risco (teste *t* de *Student*, $p = 0,97$); (H) Transformação maligna (teste *t* de *Student*, $p = 0,87$).

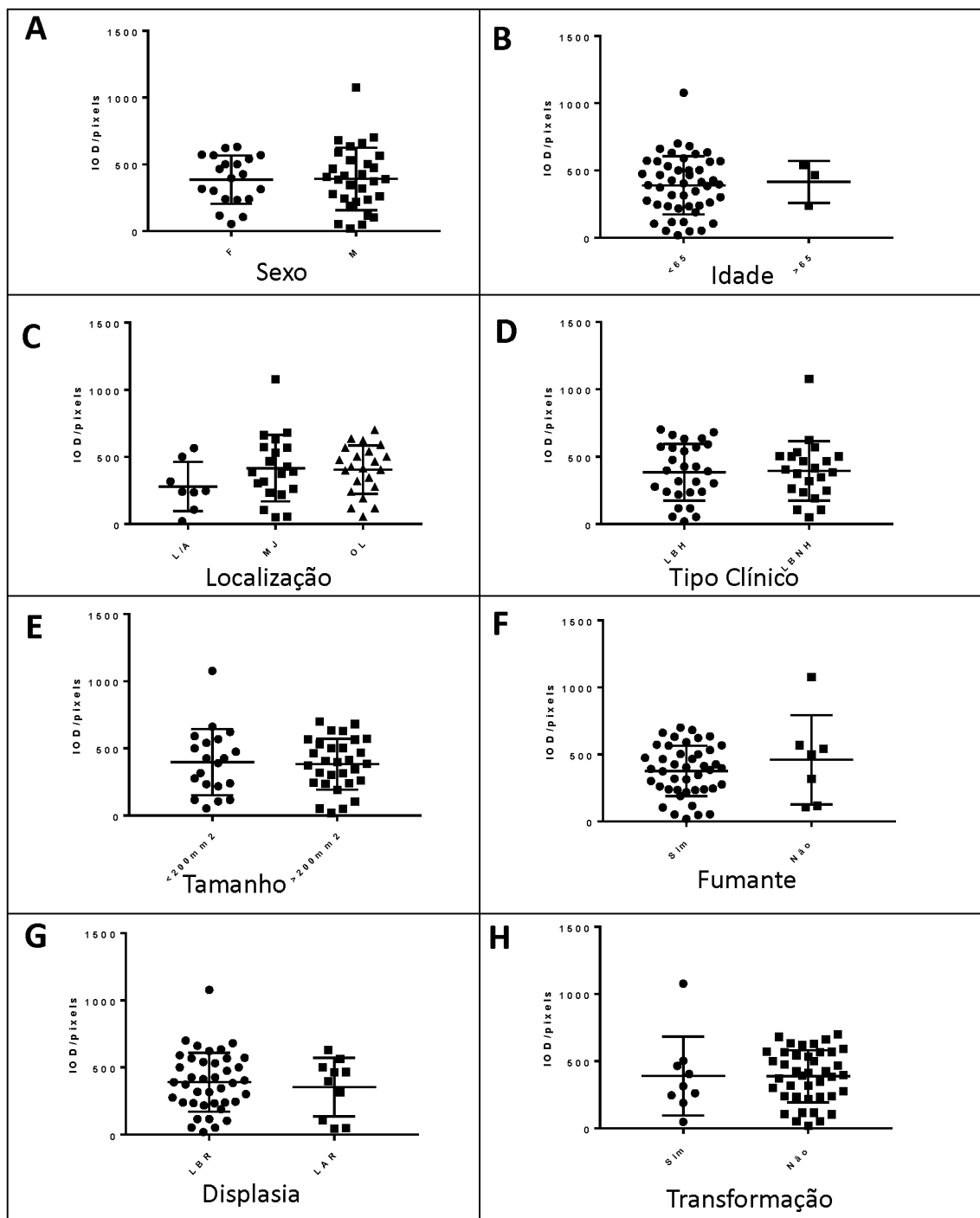


Figura 12- Comparação de valores de IOD para H3K9ac nos casos de leucoplasias bucais para as diferentes variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas analisadas. (A) Sexo (teste *t* de *Student*, $p = 0,94$); (B) Idade (teste *t* de *Student*, $p = 0,85$); (C) Localização: LS – língua e soalho bucal; MJ – mucosa jugal; OL – outras localizações: lábio, palato, gengiva, rebordo alveolar, palato duro e mole (ANOVA, $p = 0,28$); (D) Tipo Clínico: LBH, homogênea; LBNH, não homogênea (teste *U* de *Mann-Whitney*, $p = 0,82$) (E) Tamanho (teste *t* de *Student*, $p = 0,81$) (F) Fumante (teste *t* de *Student*, $p = 0,34$) (G) Displasia, LBR, baixo risco; LAR, alto risco (teste *t* de *Student*, $p = 0,63$); (H) Transformação maligna (teste *U* de *Mann-Whitney*, $p = 0,55$).

6.3.4Histona H4K12ac

Para o grupo controle a histona H4K12ac apresentou imunorreatividade nuclear visualmente difusa, porém mais intensa quando comparado a histona H3K9ac, notada em todos os estratos epiteliais não queratinizados. A absorbância média para a reatividade nuclear (IOD) foi de $941,6 \pm 410,7$ (dp), enquanto para percentagem de núcleos marcados a mediana foi de 66,6. Para H4K12ac, foi identificada uma variação de área percentual nos controles de 34,1 a 90,6 com média de $65,3 \pm 13,7$ (dp) (Figura 8).

A imunorreatividade para H4K12ac na LB apresentou marcação forte, compreendendo toda a espessura do epitélio, excetuando-se as camadas mais superficiais: granulosa e córnea. (Figura 13). Foi identificada uma variação de percentual de núcleos marcados de 35,44 a 91,9 com média de $74,94 \pm 12,8$ (dp). Em relação a absorbância de reatividade nuclear, observaram-se IOD que variaram de 230,1 a 2006,0, com mediana de 536,3. Perceberam-se diferenças para percentual de núcleos marcados e absorbância de imunorreatividade nuclear em relação aos controles, que se mostraram estatisticamente significativas (Figura 13 e 14).

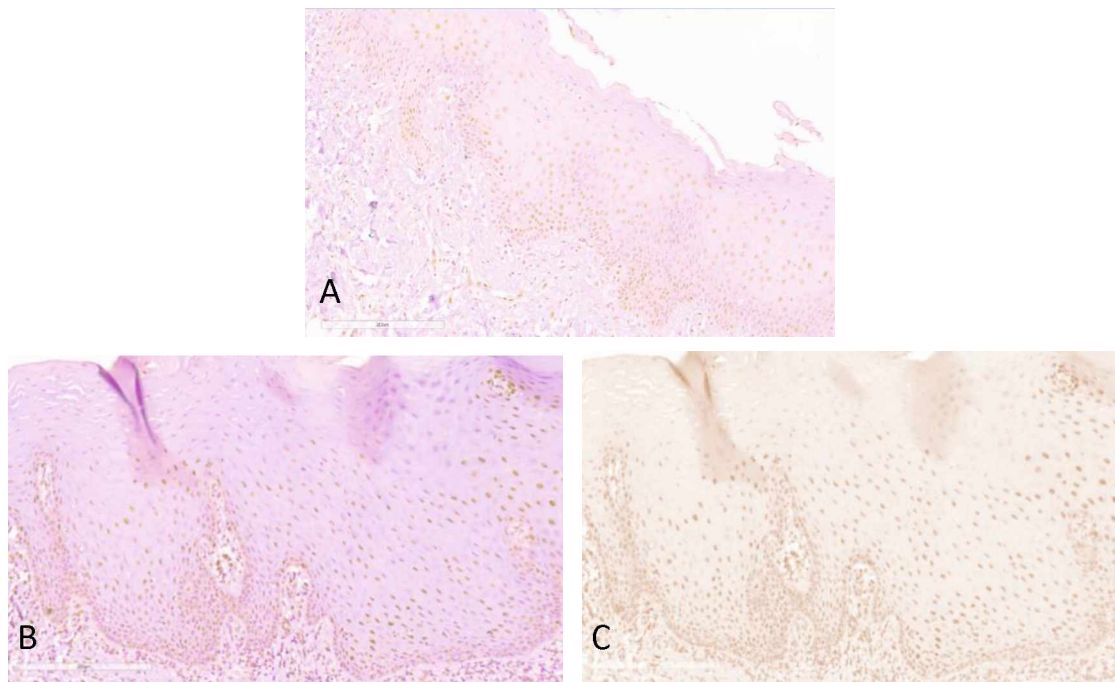


Figura 13-Imunorreatividade antigênica para H4K12ac no epitélio das mucosas incluídas como grupos controle e leucoplasia. (A) Grupo controle com imunorreatividade atenuada de H4K12ac se observa marcação intensa e dispersa pelas camadas epiteliais. Em (B) e (C) temos a imunorreatividade antigênica para H4K12ac em leucoplasias bucais. Em (B) a secção tecidual da leucoplasia original demonstrando as marcações nucleares em toda a espessura do epitélio; em (C) aspecto histológico após deconvolução da imagem, onde só aparecem os núcleos marcados. (aumento original de 200x, estreptavidina-biotina, contracoloradas por hematoxilina de Harris).

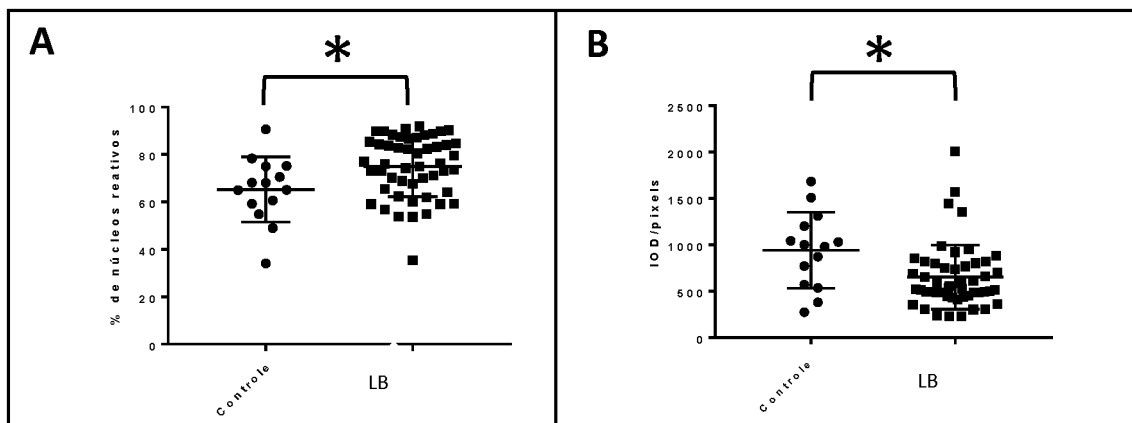


Figura 14- Comparação dos valores encontrados para a reatividade antigênica entre a amostra controle e de leucoplasias bucais. (A) Percentagem de área dos núcleos imunorreativos (teste *t* de *Student*, $p = 0,02$); (B) Intensidade de marcação por IOD (teste *U* de *Mann-Whitney*, $p = 0,007$). *Diferenças estatisticamente significativas.

Ao analisar os valores das percentagens de núcleos marcados para os grupos de variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas estratificadas, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa apenas para a localização das lesões. A diferença ocorreu entre os valores para língua/soalho e outras localizações (Figura 15).

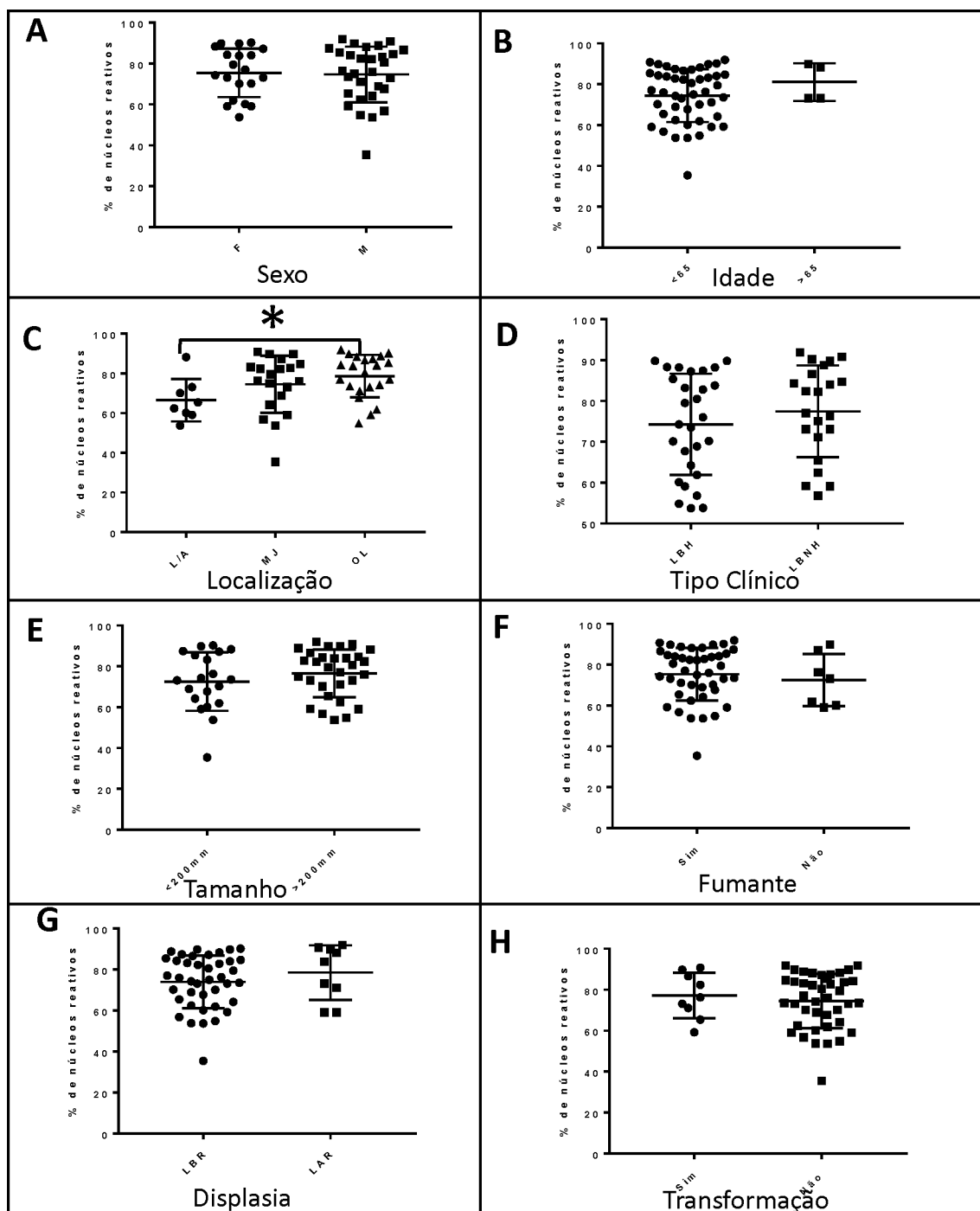


Figura 15- Comparação dos valores de percentagem de núcleos imunorreativos para H4K12ac nos casos de leucoplasia para os diferentes estratos das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas analisadas (A) Sexo: (teste *t* de Student, $p = 0,83$); (B) Idade (teste *t* de Student, $p = 0,32$); (C) Localização: LS – língua e soalho bucal; MJ – mucosa jugal; OL – outras localizações: lábio, palato, gengiva, rebordo alveolar, palato duro e mole (teste de *Kruskal-Wallis*, pós- teste de *Dunn*, $p = 0,04$)*; (D) Tipo clínico (teste *U* de *Mann-Whitney*, $p = 0,31$) (E) Tamanho (teste *t* de Student, $p=0,28$) (F) Fumante (teste *U* de *Mann-Whitney*, $p = 0,57$) (G) Displasia, LBR, baixo risco; LAR, alto risco (teste *t* de Student, $p = 0,34$); (H) Transformação (teste *t* de Student, $p = 0,57$). *Diferenças estatisticamente significativas.

A comparação dos valores de absorbância (IOD) da reatividade nuclear para H4K12ac considerando os estratos das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos casos de LB esta representada na figura 16, para nenhuma das variáveis não houve diferença estatisticamente significativa.

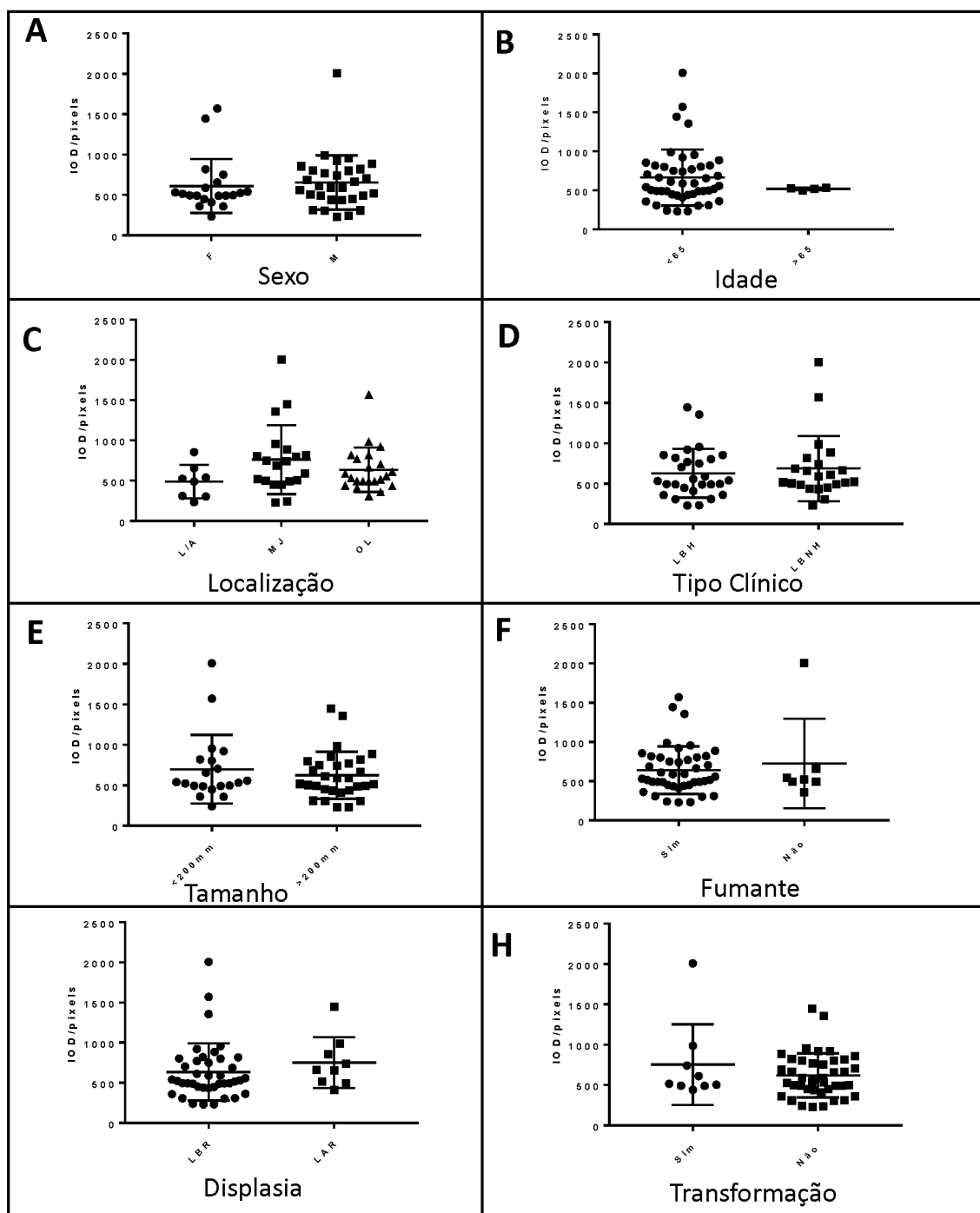


Figura 16- Comparação dos valores de absorbância da reatividade nuclear (IOD) para H4K12ac nos casos de leucoplasia para os diferentes estratos das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas analisadas (A) Sexo: (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,31$); (B) Idade (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,70$); (C) Localização: L/S – língua e soalho bucal; MJ – mucosa jugal; OL – outras localizações (teste de *Kruskal-Wallis*, $p = 0,20$); (D) Tipo Clínico: LBH, homogenia; LBNH, não homogenia; (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,74$) (E) Tamanho (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,64$) (F) Fumante (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,98$) (G) Displasia, LBR, baixo risco; LAR, alto risco (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,21$); (H) Transformação (teste *U de Mann-Whitney*, $p = 0,67$).

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados dos testes de associação entre as diferentes variáveis estudadas e os valores dos percentuais de núcleos imunorreativos e de intensidades de reatividade antigênica nuclear, obtidos a partir de cut-offs previamente determinados. Pode-se perceber que nenhuma associação foi observada entre as MPTH e as variáveis estudadas para os casos de LB.

Tabela 1 – Associação entre diferentes estratos categorias das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos casos de leucoplasias bucais e as modificações transcricionais de histonas estudadas, segundo os percentuais de reatividade antigênica nuclear obtidos.

Variáveis	n..casos ¹	H3K9ac		<i>p</i> ⁴	H4K12ac		<i>p</i> ⁴
		ALTA ²	BAIXA ²		ALTA ³	BAIXA ³	
Sexo							
Masculino	30	15	15	1,0	23	7	1,0
Feminino	20	10	10		15	5	
Idade							
≤ 65 anos	46	22	24	0,11	35	11	0,56
> 65 anos	4	4	0		4	0	
Exposição ao fumo							
Sim	42	21	21	1,0	34	9	0,33
Não	7	4	3		4	3	
Dimensão							
≤ 200m²	20	9	11	0,77	14	6	0,50
> 200m²	30	16	14		24	6	
Localização*							
Língua/soalho	8	2	6	0,30	4	4	0,12
Mucosa de bochecha	20	11	9		15	5	
Outras localizações	22	12	10		19	3	
Displasia ⁴							
Alto Risco	9	5	4	1,0	7	2	1,0
Baixo Risco	41	20	21		29	12	
Tipo clínico							
Homogênea	28	12	16	0,39	20	8	0,51
Não homogênea	22	13	9		18	4	
Transformação maligna							
Sim	9	4	5	1,0	8	1	0,41
Não	41	21	20		29	12	

1 – número de casos; 2 – altos e baixos níveis de percentagem de núcleos imunorreativos, *cut-off* para H3K9ac = 65,8, alto: > 65,8; baixo: ≤ 65,8; 3– altos e baixos níveis de percentagem de núcleos imunorreativos, *cut-off* para H4K12ac = 65,2, alto: > 65,2; baixo: ≤ 65,2; 4 – valor de *p* para os testes estatísticos empregados: teste do *Qui-quadrado* (*) e teste exato de *Fisher*, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 2 – Associação entre diferentes categorias das variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas dos casos de leucoplasias bucais e as modificações transcricionais de histonas estudadas, segundo os valores de absorbância para as reatividades nucleares obtidas.

Variáveis	n..casos ¹	H3K9ac		p ⁴	H4K12ac		p ⁴
		ALTA ²	BAIXA ²		ALTA ³	BAIXA ³	
Sexo							
Masculino	30	14	16	1,0	3	27	1,0
Feminino	20	10	10		2	18	
Idade							
≤ 65 anos	46	20	26	0,32	5	41	1,0
> 65 anos	4	3	1		0	4	
Exposição ao fumo							
Sim	43	18	25	0,68	5	38	1,0
Não	7	4	3		1	6	
Dimensão							
≤ 200m²	20	10	10	0,49	3	17	0,67
> 200m²	30	12	18		3	27	
Localização*							
Língua/soalho	8	2	6	0,48	0	8	0,39
Mucosa de bochecha	20	10	10		4	16	
Outras localizações	20	10	12		3	19	
Displasia ⁴							
Alto Risco	9	5	4	0,48	2	7	0,29
Baixo Risco	41	17	24		4	37	
Tipo clínico							
Homogênea	28	12	16	1,0	3	25	1,0
Não homogênea	22	9	13		3	19	
Transformação maligna							
Sim	9	3	6	0,71	2	7	0,21
Não	41	19	22		3	38	

1 – número de casos; 2 – altos e baixos valores de absorbância (IOD) para os núcleos imunorreativos, *cut-off* para H3K9ac = 417,8, alto: > 417,8; baixo: ≤ 417,8; 3– altos e baixos valores de absorbância (IOD) para os núcleos imunorreativos, *cut-off* para H4K12ac = 941,6, alto: > 941,6; baixo: ≤ 941,6; 4 – valor de *p* para os testes estatísticos empregados: teste do *Qui-quadrado* (*) e teste exato de *Fisher*, com intervalo de confiança de 95%.

6.3.5 Correlação entre MPTH e Ki67

5.3.6 Ki67

Para Ki67, foi identificada uma variação de área percentual nos controles de 5,6 a 57,2 com média de $24,44 \pm 14,73$ (dp), enquanto para as LB de 7,9 a 55,8 com média de $30,34 \pm 12,1$ (dp). Pode-se observar uma maior atividade proliferativa nas LB comparativamente aos controles, embora não tenha sido identificada diferença estatisticamente significativa (Figura 17).

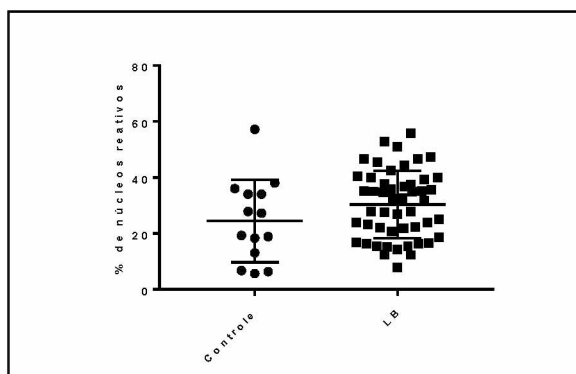


Figura17-Comparação dos valores de porcentagem de núcleos imunorreativos para Ki67 nos casos de leucoplasia (teste *t* de Student, $p = 0,13$).

Os dados plotados na Figura 18 mostram a relação entre os valores de percentual de núcleos imunorreativos e de absorbância de imunoreatividade nuclear (IO) e os valores de Ki67 para as LB. Percebe-se uma relação positiva e mais expressiva, embora moderada, entre percentual de núcleos reativos para H3K9ac e Ki67, estatisticamente significativa. Relação positiva e estatisticamente significativa também foi observada entre os valores de absorbância de reatividade nuclear para as duas modificações de histonas estudadas e Ki67.

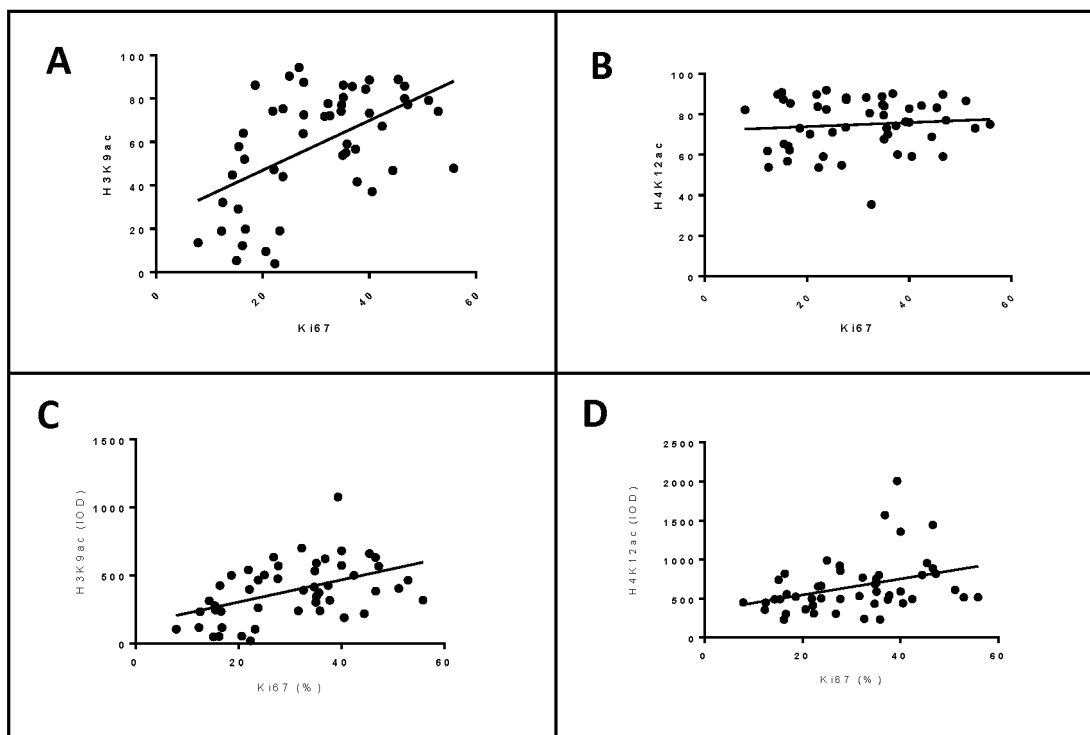


Figura 18- Correlação entre a percentagem das modificações de histonas e níveis de absorbância de reatividade para H3K9ac e H4K12ac e a extensão da atividade proliferativa a partir de valores obtidos de imunorreatividade para Ki67. (A) Correlação entre percentual de núcleos reativos para H3K9ac e Ki67 ($r = 0,28$, $p < 0,0001$). (B) Correlação entre percentual de núcleos reativos para H4K12ac e Ki67 ($r = 0,008$, $p = 0,5$). (C) Correlação entre níveis de absorbância de reatividade nuclear para H3K9ac e Ki67 ($r = 0,47$, $p = 0,0007$); (D) Correlação entre níveis de absorbância de reatividade nuclear para H4K12ac e Ki67 ($r = 0,43$, $p = 0,002$).