

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ALINE CARLA ALVES SILVA ANDRADE

Expressão da H3K9ac e H4K12ac no Adenocarcinoma Polimorfo e Carcinoma Adenoide  
Cístico de Glândulas Salivares

UBERLÂNDIA

2018

ALINE CARLA ALVES SILVA ANDRADE

Expressão da H3K9ac e H4K12ac no Adenocarcinoma Polimorfo e Carcinoma Adenoide  
Cístico de Glândulas Salivares

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

UBERLÂNDIA

2018

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

---

A553e  
2018      Andrade, Aline Carla Alves Silva, 1988  
            Expressão da H3K9ac e H4K12ac no adenocarcinoma polimorfo e  
            carcinoma adenoide cístico de glândulas salivares / Aline Carla Alves  
            Silva Andrade. - 2018.  
            85 f. : il.

            Orientador: Adriano Mota Loyola.  
            Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
            Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
            Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.755>  
            Inclui bibliografia.

            1. Citologia - Teses. 2. Epigenômica - Teses. 3. Carcinoma adenoide  
            cístico - Teses. 4. Histonas - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II.  
            Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
            Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas

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

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número: 001/2018 do PPGBC

Data: 31 de Janeiro de 2018

Discente: Aline Carla Alves Silva Andrade

Matrícula nº 11522BCE001

Título do Trabalho: "Análise do perfil de expressão da H3K9ac e H4K12ac no Adenocarcinoma Polimorfo e Carcinoma Adenoide Cístico"

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Biologia Celular Tumoral

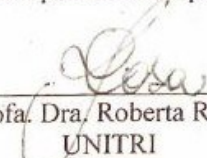
Projeto de Pesquisa vinculado: Avaliação de alterações epigenéticas em doenças da região bucomaxilofacial

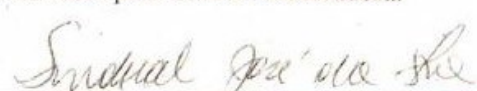
Às nove horas do dia trinta e um de janeiro do ano de 2018 no Auditório do Bloco 8B - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Sindeval José da Silva - UFU; Roberta Rezende Rosa - UNITRI e Adriano Mota Loyola orientador da candidata. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa Prof. Dr. Adriano Mota Loyola - apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

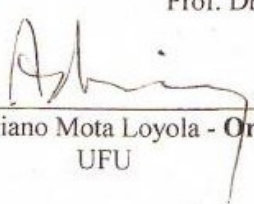
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Aline Carla Alves Silva Andrade** APROVADA. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho: "EXPRESSIONS DE H3K9ac e H4K12ac NO ADENOCARCINOMA POLIMORFO E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO DE GLÂNDULAS SALIVARES"

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

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

  
Prof. Dra. Roberta Rezende Rosa  
UNITRI

  
Prof. Dr. Sindeval José da Silva  
UFU

  
Prof. Dr. Adriano Mota Loyola - Orientador  
UFU

Aos meus entes queridos que partiram, vocês iluminaram meu caminho e agora estão ao lado de Deus. A separação física só fortalece os laços que o amor uniu. Minha profunda gratidão a vocês, que com amor e simplicidade souberam levar da vida o que ela tem de melhor.

## **Agradecimentos**

Se hoje cheguei até aqui é porque um ser iluminado me guiou...Deus, és meu pai, meu amigo, minha força e meu guia. Obrigada por estar comigo em todos os momentos, colocando pessoas maravilhosas em minha vida e por me fazer acreditar que sonhos como esse que estou realizando são possíveis para qualquer pessoa que acredita...

Ao meu marido Sérgio, palavras são insuficientes para dizer o quanto você é crucial na minha caminhada...Você que se faz forte nos momentos mais difíceis, me injeta ânimo e coragem quando eu fraquejo, você me conhece pelo simples jeito de olhar e sabe ser duro quando eu preciso. Obrigada por me compreender, apoiar, tirar o melhor de mim e me fazer acreditar que sou capaz como qualquer outra pessoa...amo você.

Aos meus amados pais, pessoas extraordinárias, que nunca mediram esforços em sacrificar seus sonhos para que os meus se realizassem, que me ensinaram a viver com humildade e simplicidade respeitando o próximo. Não existem palavras que consigam descrever o amor e a gratidão que sinto por vocês. Mamãe, você é meu porto seguro, suas palavras acalmam e tranquilizam, me fazendo sempre ter a certeza que tudo ficará bem. Papai, você é amigo e companheiro para todas as horas, tenho muita sorte em tê-lo como pai. Obrigada por me entenderem e, ao me darem apoio e liberdade, me permitiram voar mais alto...

A toda minha família, que sempre acreditou em mim e me deu forças, em especial à minha madrinha Maria Antônia, Neide, Nandinha e minha irmã.

Aos meus amigos do Laboratório de Análises Clínicas da UFU, em especial a segunda família que Deus me deu: família HEMATO...Tamirinha, Tata, Débora, Sandra, Márcia, Keila, Aline, Sharlles, Dimas, Ana Paula, Cris, Michelle, Odair e Geraldo...vocês nunca mediram esforços para tornar possível que meu sonho se concretizasse, que muitas vezes se prejudicaram para me beneficiar, que Deus conceda a vocês todas as oportunidades que vocês me deram.

Aos amigos construídos ao longo de uma vida: Laís, Eliza, Suéllen, Ana Olímpia, Daniel, Carla, Vanessinha, Heliada, Aline...vocês estão sempre presentes na minha vida trazendo serenidade e palavras de incentivo, sou imensamente feliz e abençoada por ter amigos como vocês.

Agradeço a todos aqueles que com profissionalismo, alegria e boa vontade me estenderam a mão e me auxiliaram com carinho e presteza: Ângela, Lúbia, Adalci, Lilian.

Aos amigos que fiz na Biocel, em especial Rafa, Jeranice, Kelen, Dani, Ingrid e Bruno. Obrigada pelo apoio, pelas palavras de incentivo, o caminho se tornou ainda mais especial estando vocês ao meu lado.

Aos amigos do Laboratório de Patologia muito obrigada pela ajuda, João Paulo, Roberta e Anaíra. Agradeço a você Vinícius pelo companheirismo e disponibilidade de sempre em me ajudar. E não poderia deixar de agradecer a você Cássio, que foi um amigo para todas as horas...como eu te disse um dia, as amizades feitas já teriam valido todo o caminho...e você é uma delas.

Aos professores do programa de Biologia Celular e Estrutural Aplicadas agradeço pelos ensinamentos que não se limitaram às disciplinas. Em especial ao professor Alberto que sempre se colou a minha disposição, me ajudando com paciência...você professor fez toda a diferença, muito obrigada. E não poderia de forma alguma deixar meus agradecimentos do fundo do coração à professora Ana Paula Balbi, que foi muito além de uma professora, foi amiga e se tornou uma pessoa especial para toda a vida.

Ao professor Adriano, que mesmo sem me conhecer como aluna, profissional e pessoa aceitou me orientar e, assim, abriu as portas de um novo mundo, cheio de conhecimento e surpresas...obrigada professor, pois no momento em que mais precisei pude contar com seu apoio, isso jamais esquecerei...

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)



## RESUMO

Alterações epigenéticas, como metilação do DNA, microRNAs e modificações pós-traducionais (MPT) de histonas tem sido alvo de grande estudo para as mais diversas doenças, inclusive o câncer, uma vez que estão envolvidas no controle de expressão gênica. Modificações pós-traducionais de histonas (MPTH) controlam o acesso da cromatina aos mais diversos fatores de transcrição e modulam assim a expressão e o silenciamento dos genes, e portanto, alterações em suas expressões contribuem para o aparecimento de tumores. Este trabalho teve como objetivo obter dados sobre a presença de MPTH, em especial acetilação, em dois dos mais frequentes tumores malignos de glândulas salivares que possuem similaridades morfohistogenéticas, mas comportamentos distintos: o adenocarcinoma polimorfo (ACP) e o carcinoma adenoide cístico (CAC). Para isso, avaliamos por imunohistoquímica a expressão de H3K9ac e H4K12ac em 29 casos de ACP e 38 de CAC, tendo como referência de sua expressão em amostras teciduais glandulares não neoplásicas, admitidamente normais. Para tanto, foi construído um índice traduzisse intensidade de absorbância por área nuclear do parênquima tumoral, designada IOD. As análises mostraram que valores de IOD para H3K9ac foram significativamente diferentes entre ACP (média: 0,144; DP:  $\pm 0,08$ ) para o controle e CAC (média: 0,27; DP:  $\pm 0,07$ ) ( $p < 0,05$ ). Já os valores de IOD obtidos para H4K12ac apresentaram diferenças estatisticamente significativas tanto para o ACP (média: 0,114; DP:  $\pm 0,06$ ) como para o CAC (média: 0,115; DP:  $\pm 0,06$ ) comparado aos controles ( $p < 0,05$ ). Quando os valores de IOD para H3K9ac e H4K12ac foram analisados segundo estratificações predefinidas das variáveis clinicopatológicas, as diferenças significativas foram observadas para os casos recidivantes, que apresentaram valores menores de IOD para H3K9ac em relação aos não recidivantes ( $p = 0,02$ ). Para H4K12ac, portadores de metástase do grupo de CAC apresentaram valores maiores em relação aos não metastáticos ( $p = 0,04$ ). Não encontramos correlação entre H3K9ac e H4K12ac com a proliferação celular (Ki67). Conclui-se que variações de expressão nessas modificações podem contribuir para o surgimento desses tumores. Os resultados apontam para a possibilidade de fenômenos de acetilação influenciarem no comportamento do tumor. Todavia, os resultados obtidos necessitam de maior consistência para sua confirmação.

**Palavras-chave:** epigenética, modificações de histona, adenocarcinoma polimorfo, carcinoma adenoide cístico.

## ABSTRACT

Epigenetic changes such as DNA methylation, microRNAs, and post-translational modifications (PTM) of histones have been the subject of major study for a variety of diseases, including cancer, since they are involved in the control of gene expression. Histone post-translational modifications control chromatin access to the most diverse transcription factors and thus modulate gene expression and silencing, therefore, changes in these modifications contribute to the appearance of tumors. The aim of this study was to obtain data on the presence of PTM, especially acetylation, in two of the most common malignant tumors of salivary glands that have morphohistogenetic similarities, but different behaviors: polymorphous adenocarcinoma (PAC) and adenoid cystic carcinoma (ACC). For this, we evaluated by immunohistochemistry the expression of H3K9ac and H4K12ac in 29 cases of PAC and 38 of ACC, with reference to its expression in admittedly normal non-neoplastic glandular tissue samples. For this, an index was constructed to translate absorbance intensity by nuclear area of the tumor parenchyma, called IOD. The analysis showed that IOD values for H3K9ac were significantly different between PAC (mean: 0.144; SD:  $\pm$  0.08) for the control and ACC (mean: 0.27, SD:  $\pm$  0.07) ( $p < 0.05$ ). On the other hand, the values of IOD obtained for H4K12ac showed statistically significant differences for the PAC (mean: 0.114, SD:  $\pm$  0.06) and for the ACC (mean: 0.115, SD:  $\pm$  0.06) compared to controls ( $p < 0.05$ ). When IOD values for H3K9ac and H4K12ac were analyzed according to predefined stratifications of clinicopathological variables, significant differences were observed for recurrent cases, which presented lower IOD values for H3K9ac than non-recurrent ones ( $p = 0.02$ ). For H4K12ac, carriers of metastasis in the ACC group presented higher values than non-metastatic ( $p = 0.04$ ). We found no correlation between H3K9ac and H4K12ac with cell proliferation (Ki67). It is concluded that variations in expression of these modifications may contribute to the appearance of these tumors. The results also point to the possibility that acetylation phenomena influence the behavior of the tumor. However, the results obtained require more consistency for its confirmation.

**Keywords:** epigenetics, histone modifications, polymorphous adenocarcinoma, adenoid cystic carcinoma.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

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

**Figura 2** – Representação esquemática de algumas modificações pós-traducionais de histonas.

**Figura 3** – Representação esquemática de acetilação e desacetilação de lisina.

**Figura 4** – Tela inicial do *ImageJ*

**Figura 5** – Imagem aberta no *ImageJ* utilizada para calibração

**Figura 6** – Janela de inserção de dados para calibração de dimensão no *ImageJ*.

**Figura 7** – Janela de inserção de dados para calibração de absorbância no *ImageJ*.

**Figura 8** – Curva de calibração obtida a partir dos valores da escala de cinza e IOD

**Figura 9** – Imagem parcial do parênquima de glândula salivar admitida como controle do estudo utilizada para obtenção dos valores de IOD médios para H3K9ac.

**Figura 10** – Núcleos selecionados e numerados para quantificação do número de núcleos total a serem considerados na análise do controle.

**Figura 11** – Janela de Resultados.

**Figura 12** – Seleção de núcleos a partir da imagem de hematoxilina

**Figura 13** – Imagem de DAB com a máscara aplicada

**Figura 14** – Janela do Threshold.

**Figura 15** – Imunomarcação de H3K9ac e H4K12ac no parênquima das glândulas salivares.

**Figura 16** – Imunomarcação de H3K9ac nos tumores.

**Figura 17** – Distribuição dos valores de IOD para as amostras do grupo controle, Adenocarcinoma Polimorfo (ACP) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) referentes a imunomarcação para H3K9ac.

**Figura 18** – Comparação dos valores de IOD de H3K9ac observados nos casos de Adenocarcinoma Polimorfo para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas.

**Figura 19** – Comparação dos valores de IOD de H3K9ac observados nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas.

**Figura 20** – Valores de área (%) hipoacetilada marcada para H3K9ac.

**Figura 21** – Imunomarcção de H4K12ac nas glândulas salivares.

**Figura 22** – Distribuição dos valores de IOD para as amostras do grupo controle, Adenocarcinoma Polimorfo (ACP) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) referentes a imunomarcção para H4K12ac.

**Figura 23** – Comparação dos valores de IOD de H4K12ac observados nos casos de Adenocarcinoma Polimorfo para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas.

**Figura 24** – Comparação dos valores de IOD de H4K12ac observados nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas.

**Figura 25** – Valores de área (%) hipoacetilada marcada para H4K12ac.

**Figura 26** – Imunomarcção Ki67.

**Figura 27** – Correlação entre valores de IOD das MPTHs (H3K9ac e H4K12ac) e Ki67.

**Figura 28** – Barra de calibração da Kodak nº3

## QUADROS

**Quadro 1** – Modificações globais de histonas em diferentes tipos de tumores, podendo ser utilizadas como prognóstico e/ou diagnóstico.

**Quadro 2** – Valores médios, mínimos e máximos da relação entre intensidade de absorbância (IOD) e áreas nucleares avaliadas.

## TABELAS

**Tabela 1** - Dados clinicopatológicos dos pacientes com Adenocarcinoma Polimorfo (ACP) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) de glândulas salivares

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ACP – Adenocarcinoma Polimorfo

ADP – Adenosina Difosfato

AFN – Aspiração por Agulha Fina

CAAE – Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CAC – Carcinoma Adenoide Cístico

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

DAB – Diaminobenzidina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

FOUFU – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IOD – Índice de Densidade Ótica

MPTs – Modificações Pós-Traducionais de Histonas

H1 – Histona H1

H2 – Histona H2

H3 – Histona H3

H4 – Histona H4

H2A – Histona H2A

H2AX – Histona H2AX

H2B – Histona H2B

H3K9ac – acetilação da lisina 9 da histona H3

H3K18ac – acetilação da lisina 18 da histona H3

H3K4me – metilação da lisina 4 da histona H3

H3K4me2 – dimetilação da lisina 4 da histona H3

H3K4me3 – trimetilação da lisina 4 da histona H3

H3K9me – metilação da lisina 9 da histona H3

H3K9me3 – trimetilação da lisina 9 da histona H3

H3K27me – metilação da lisina 27 da histona H3

H3K27me3 – trimetilação da lisina 27 da histona H3

H4K16ac – acetilação da lisina 16 da histona H4

H4K20me3 – trimetilação da lisina 20 da histona H4

HATs – histona acetiltransferase

hmt – histona desacetilase

HMT – histona metiltransferase

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LPBMF – Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial

OMS – Organização Mundial de Saúde

p21 – proteína p21

p53 – proteína p53

PBS – tampão fosfato salino

RT – Radioterapia

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

TGSs – Tumores de Glândula Salivar

TRIS-HCL – hidroximetil aminometano hidrocloreídrico

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

USG-AFN – Ultrassonografia por Aspiração com Agulha Fina

USP22 – protease ubiquitina-específica 22

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Tumores de glândulas salivares .....	17
2.1.1 Adenocarcinoma polimorfo.....	19
2.1.2 Carcinoma adenoide cístico.....	20
2.2 Epigenética .....	21
2.2.1 Histonas .....	22
2.2.2 Modificações de histonas .....	24
2.2.2.1 Acetilação .....	27
2.2.2.2 Metilação, fosforilação e ubiquitinação.....	30
2.2.3 Modificações de histonas e tumores de glândulas salivares.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo geral .....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. JUSTIFICATIVA .....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
5.1 Casuística.....	36
5.2 Ensaio imunohistoquímico .....	36
5.3 Análise de reatividade imuno-histoquímica para H3K9ac e H4K12ac .....	38
5.3.1 Calibração do ImageJ para análise morfométrica .....	39
5.3.1.1 Calibração da distância.....	39

5.3.1.2 Calibração da escala de cinza .....	41
5.3.2 Análise das imagens .....	42
5.3.2.1 Índice de Absorbância (IOD) do grupo controle .....	42
5.3.2.2 Índice de Absorbância (IOD) dos tumores .....	44
5.3.3 Análise imuno-histoquímica dos valores de Ki67 .....	46
5.4 Estatística.....	46
5.4.1 Análise dos dados .....	46
6.1 Dados sociodemográficos e clinicopatológicos.....	48
6.2 Análise e avaliação imuno-histoquímica.....	50
6.2.1 H3K9ac e H4K12ac.....	50
6.2.2 H3K9ac em amostras tumorais.....	50
6.2.3 H4K12ac em amostras tumorais.....	55
6.3 Proliferação celular e MPTHs .....	60
7. DISCUSSÃO.....	62
8. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS .....	67
ANEXOS.....	77
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa .....	77
Anexo 2 – Calibração em níveis de cinza .....	83



## 1. INTRODUÇÃO

A epigenética é atualmente definida como estudo de mudanças hereditárias em expressão gênica, que ocorre independentemente das alterações na sequência primária do DNA (KHAN; REDDY; GUPTA, 2015). Seu estudo tem mostrado novas possibilidades de entendimento da ativação, da transcrição e do silenciamento gênico. Os mecanismos epigenéticos incluem metilação de DNA, microRNA e modificações pós-traducionais de histonas (MPTH). Sendo consideradas reversíveis, aparecem como alvos de estudos na prevenção, controle e tratamento do câncer (SIDOLI; CHENG; JENSEN, 2012; MORADIAN; KALLIL; SWEREDOSKI, 2014; BAYAT et al., 2017).

As proteínas histonas são os principais componentes da cromatina e formam o esqueleto nucleossômico na compactação do DNA (MORADIAN; KALLIL; SWEREDOSKI, 2014; FINNERTY et al., 2017). Cada uma das histonas possui uma "cauda" amino-terminal de aminoácidos que estão sujeitas a diferentes tipos de modificações covalentes, como fosforilação, acetilação, ubiquitinação e metilação, que controlam a condensação da cromatina (ALBERTS et al, 2010; HAN; KOC; COC, 2014).

As consequências funcionais destas modificações podem provocar alterações estruturais da cromatina e/ou servir para incluir ou excluir complexos proteicos de entrarem em contato com o DNA, influenciando assim o padrão de transcrição dos genes, alterando a sua atividade e, provavelmente, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da tumorigênese (CHERVONA; COSTA, 2012; HAN; KOC; COC, 2014). Sua participação tem sido evidenciada em vários fenômenos da biologia celular tumoral, incluindo a proliferação celular, a diferenciação e a apoptose, podendo também ter importância no diagnóstico e na elaboração do prognóstico das doenças (XIA et al., 2013). Modificações de histonas têm sido associadas a diferentes tipos de cânceres, como câncer hepático, mama, ovário, próstata, esôfago, colorretal, rim, pulmão, pâncreas e mieloma (KHAN; REDDY; GUPTA, 2015). Estes estudos têm sugerido ou identificado a participação das MPTH na tumorigênese, não só como um fenômeno da patogenia, como também como marcador de diagnóstico, de evolução da doença e, portanto, de prognóstico.

Os tumores de glândulas salivares (TGSs) são incomuns, representando menos de 5% de todos os cânceres de cabeça e pescoço (EL-NAGGAR et al., 2017). Em geral, são

caracterizados por crescimento lento, recorrências locais múltiplas e curso clínico prolongado, muitas vezes com o desenvolvimento tardio de metástase regional e à distância. Embora incomuns, variam consideravelmente em seus padrões histológicos e comportamentais (LAGHA et al., 2012). Chama atenção a sua complexidade histológica que em várias situações dificultam a distinção clara das diferentes entidades nosológicas. Isto tem implicação direta na compreensão do seu comportamento e, por consequência, no estabelecimento de terapêuticas específicas, mais eficientes. Nesse sentido, o estabelecimento do diagnóstico preciso da lesão continua a estimular os patologistas na procura de testes auxiliares com vistas à identificação de marcadores, sejam morfológicos, histoquímicos, imuno-histoquímicos ou moleculares para este fim (SKÁLOVÁ et al., 2017). Dentre os diversos TGSs malignos, o adenocarcinoma polimorfo (ACP) e o carcinoma adenoide cístico (CAC) se destacam pela sua frequência, similaridade morfofogenética, variando, contudo, no seu comportamento e prognóstico (EL-NAGGAR et al., 2017).

As informações sobre a participação de fenômenos epigenéticos na patogenia das neoplasias salivares e seu significado para o desenvolvimento e progressão dessas lesões ainda não são bem compreendidos (WAGNER et al., 2017). Uma vez que as modificações de histonas têm sido encontradas em diversos tumores e, levando-se em consideração que elas podem ser reversíveis, o conhecimento de sua participação na oncogênese potencializa a perspectiva da construção de abordagens terapêuticas alternativas mais eficientes, ou mesmo complementares àquelas classicamente já utilizadas. Nesta linha de pensamento, o presente trabalho objetiva identificar alterações de histonas nos tumores ACP e CAC, na perspectiva de contribuir para compreensão da patogenia desses tumores, investigando concomitantemente seu potencial uso como marcador de seu diagnóstico e comportamento biológico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Para a revisão bibliográfica utilizou-se como fonte de pesquisa no Banco de Dados do *US National Library of Medicine National Institutes of Health* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), considerando as seguintes palavras chaves diversamente cruzadas: *salivary gland tumor, adenoid cystic carcinoma, low-grade polymorphous adenocarcinoma, epigenetic, histone, histone modification, histone acetylation, histone methylation, H3K9ac, H4K12ac, tumors and histone, cancer and histone* (Período das publicações: 1983 a 2018).

### 2.1 Tumores de glândulas salivares

Os TGSs constituem um grupo heterogêneo de neoplasias benignas e malignas relativamente à morfologia e ao comportamento biológico. Destaca-se, assim, pela sobreposição de padrões morfológicos evidentes em lesões de natureza e comportamento biológico distintos (SPEIGHT; BARRET, 2009; DAS; SAHA; SATYANARAYANA, 2016). Soma-se a isto a existência de tumores híbridos e de colisão que dão maior complexidade as tentativas de individualização nosológica. Estes dados, potencializados pela sua raridade – menos de 5,0 % dos tumores de cabeça e pescoço –, mostram que diagnóstico e tratamento ainda persistem como um desafio clinicopatológico a superar (BARNES et al., 2005).

A tumorigênese envolvendo o parênquima das glândulas salivares permanece ainda elusiva. Enquanto a maioria dos outros tipos de câncer de cabeça e pescoço está fortemente relacionada ao tabagismo e ao consumo de álcool, estes parecem não desempenhar um papel central na tumorigênese glandular (TO et al., 2012; EL-NAGGAR et al, 2017). Alguns possíveis fatores de risco incluem a submissão à terapia para outros tipos de câncer de cabeça e pescoço, radiação, histórico familiar de câncer, infecção pelo vírus Epstein-Barr e imunossupressão (TO et al., 2012). Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de TGS ainda não são claros (ANDISHEH-TADBIR et al., 2016).

A maioria (70%) dos tumores das glândulas salivares é de origem epitelial, originando-se nas glândula parótidas, e os outros surgem nas glândulas salivares menores (22%) e glândulas submandibulares (8%) (SOLANKI, 2011). A maior parte das lesões é

benigna, sendo o tumor mais frequentemente encontrado o adenoma pleomórfico; para as neoplasias malignas, destacam-se o ACP, CAC e o carcinoma mucoepidermoide (EVESON et al., 2011).

Para a avaliação do comportamento biológico das neoplasias e prognóstico do paciente, principalmente para tumores malignos, algumas variáveis têm sido consideradas importantes como: sintomatologia dolorosa, possibilidade de propagação neoplásica peri ou intraneural; presença de metástases regionais linfáticas e a distância; comprometimento marginal após o tratamento cirúrgico; dimensão tumoral, gradação histológica, estadiamento clínico, este de maior valor do que a histologia e grau de malignidade (SPEIGHT; BARRETT, 2009). O antígeno Ki-67, proteína expressa durante todas as fases ativas do ciclo celular e ausentes em células de repouso, é o mais forte preditor negativo no câncer de glândula salivar, uma vez que reage apenas com células em proliferação (NAMBOODIRIPAD, 2014; LARSEN et al., 2012).

A escolha do procedimento terapêutico para TGS é baseada na avaliação clínica (estadiamento clínico da lesão), complementada pela utilização de métodos imagiológicos: ultra-sonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e pela análise citológica do material obtido por aspiração de agulha fina (AFN), guiada ou não por ultrassom (USG-AFN), e pelo exame anatomopatológico (ISRAEL et al., 2017).

O tratamento preferencial é cirúrgico; para alguns casos de neoplasia maligna, a complementação é feita com radioterapia (RT) adjuvante (tumor de alto grau ou em estágio avançado, invasão perineural ou linfovascular, margens de ressecção positivas, extensão extra-parótida ou envolvimento nodular linfático) e quimioterápico para casos com metástases distantes (ISRAEL et al., 2017).

Dois dos mais importantes cânceres de glândulas salivares, tanto em glândulas maiores quanto menores, são ACP e o CAC. No passado, e ainda hoje, podem ser alvos de diagnóstico equivocado, tendo em vista sua semelhança morfológica. Este contexto dá margem a possíveis equívocos terapêuticos, com repercussões negativas diretas e indiretas sobre o prognóstico do paciente (CHATURA, 2015). Várias tentativas têm sido conduzidas no sentido de entender a sua patogenia, na identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos específicos para estas lesões.

### ***2.1.1 Adenocarcinoma polimorfo***

O atualmente designado adenocarcinoma polimorfo (ACP) foi inicialmente identificado com a denominação adenocarcinoma do ducto terminal, adenocarcinoma lobular, adenocarcinoma cribriforme e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (BATSAKIS et al., 1983; FREEDMAN; LUMMERMAN, 1983; EVANS; BATSAKIS, 1984; BARNES et al., 2005; FONSECA et al., 2017). Embora seja uma das neoplasias mais frequentes das glândulas salivares, ainda permanece como uma lesão mal compreendida, subdiagnosticada, controversa na nomenclatura e imprevisível no comportamento (ARAÚJO et al., 2013; CHATURA, 2015; FONSECA et al., 2017).

O ACP é um tumor epitelial maligno caracterizado pela uniformidade citológica, diversidade morfológica, padrão de crescimento infiltrativo, podendo ocorrer neurotropismo, com invasão perineural, identificada em cerca de 30% dos casos (CASTLE et al., 1999; ARAÚJO et al., 1999; LUNA; WENIG, 2005; PALERI; ROBINSON; BRADLEY, 2008; KRISHNAMURTHY; VAIDHYANATHAN; MAJHI, 2011; CHATURA, 2015). A dificuldade diagnóstica deve-se principalmente à heterogeneidade morfológica, tendo em vista aspectos histopatológicos que se assemelham àqueles encontrados em outras neoplasias de glândulas salivares, como o adenoma pleomorfo e o CAC (SPEIGHT; BARRETT, 2009; OLUSANYA et al., 2011).

A maioria das lesões é diagnosticada acima da sexta década de vida, com raros casos em crianças, sendo o sexo feminino mais acometido (OLUSANYA et al., 2011). Apresentam-se clinicamente como nódulos firmes e fixos, não ulcerados, geralmente assintomáticos (CASTLE et al., 1999; SCHEETALA et al., 2010; SCHEETALA, 2011). Mortes atribuídas ao tumor são incomuns, e ocorreram após períodos prolongados (LUNA; WENIG, 2005). Embora possuam um comportamento menos agressivo, recidivas e metástases têm sido relatados em até aproximadamente 30% e 15% dos casos (KIMPLE et al., 2014; PATEL et al., 2015). Em função do comportamento recidivante e metastático, e da possibilidade já identificada de transformação em alto grau, a OMS recentemente retirou o termo “baixo grau” de sua designação (LLORETA et al., 1995; PEREZ-ORDONEZ; LINKOY; HUVOS, 1998; PELKEY; MILL, 1999; SIMPSON et al., 2002; FONSECA et al., 2017). Não obstante, Elhakim et al. (2016), analisaram dados de 73 pacientes diagnosticados com ACP, no período de 1990 a 2005, encontrando como percentagens para sobrevivência global, sobrevivência

específica da doença e sobrevivência livre de recorrência, respectivamente: 73%, 99% e 83%, demonstrando que esse tumor apresenta um bom prognóstico.

O tratamento primário de escolha é a excisão das lesões com margem de segurança, podendo ser complementada por radioterapia e quimioterapia (DE ARRUDA et al., 2010). Existem fatores que acabam por contribuir de forma desfavorável à progressão clínica da doença como: margem cirúrgica positiva, repetidas intervenções cirúrgicas, exposição à radiação, duração prolongada e ocorrência em pacientes jovens (OLUSANYA et al., 2011).

### **2.1.2 Carcinoma adenoide cístico**

A OMS tem definido o carcinoma adenoide cístico como um tumor basaloide composto por células epiteliais e mioepiteliais em configurações morfológicas variáveis, incluindo os padrões tubular, cribriforme e sólido (EL-NAGGAR et al., 2017).

O CAC é a segunda neoplasia maligna mais freqüente das glândulas salivares, representando mais de 20% delas, sendo o segundo tipo de câncer mais comum das glândulas parótidas, ocorrendo em 7% a 18% dos casos. Nas glândulas salivares menores, alterna com o ACP como sendo uma das duas neoplasias malignas mais diagnosticadas (aproximadamente 22%) (YARBROUGH et al., 2016).

O CAC se expressa clinicamente com aumento de volume assintomático, crescimento lento, com maior frequência no sexo masculino, em pacientes acima da sexta década de vida. Sintomatologia dolorosa, ulceração, reabsorção óssea e linfadenopatia podem ser mais usualmente descritas para estas lesões, em especial para as localizadas nas glândulas salivares menores (LOYOLA et al., 1995).

O CAC se apresenta histologicamente em três padrões de crescimento distintos denominados como cribriformes, tubulares e sólidos, que em maior ou menor grau se sobrepõem. O padrão mais típico é o cribriforme, composto por ilhas de células basaloides cercadas por espaços de aspecto cístico de tamanho variável que não representam lumens glandulares, sendo contíguos com o estroma circundante. Estruturas tubulares verdadeiras, com células cuboidais luminiais, estão tipicamente espalhadas ao longo do tumor. O padrão tubular se assemelha ao cribriforme, mas com as células tumorais dispostas em túbulos contornados por uma ou duas camadas de células mioepiteliais, imersos em quantidades variáveis de estroma eosinofílico, muitas vezes hialino. Já o subtipo histológico sólido, mostra

agregados de células basaloídes sem túbulos nem formações pseudocíticas, podendo se encontrar figuras de mitose e necrose (DILLON et al., 2011).

Este tumor foi descrito como "um dos tumores biologicamente mais destrutivos e imprevisíveis da cabeça e do pescoço" (COCA-PELAZ et al., 2015). Possui alta incidência de invasão perineural, metástases regionais incomuns e recorrência local frequente. As metástases hematogênicas são mais comuns que as linfonodais, atingindo principalmente pulmão, osso e fígado (HUANG et al., 1997; SANTIAGO et al., 2005).

Van Weert et al. (2013) analisaram a sobrevida global de 105 pacientes entre o período de 1979 a 2009, e encontraram taxas de sobrevida de 68%, 52% e 28% respectivamente em 5, 10 e 20 anos. Já no trabalho de Huang et al. (1997), as taxas foram as seguintes: 63,7% após 5 anos, 37,4% após 10 anos, 24,5% após 15 anos. Ambos os trabalhos mostram que a taxa de sobrevida diminui com o passar dos anos. Zhang et al. (2013) afirmaram que o padrão histológico sólido, estágio avançado, recorrência local, margens comprometidas, invasão perineural, metástases e idade dos pacientes apresentaram papel significativo na determinação da sobrevida.

A expressão aumentada do marcador de proliferação celular Ki-67 é vista com quantidades crescentes de componente sólido e mostrou-se correlacionado com pior prognóstico. Assim, pode ser um complemento útil na atribuição de grau e prognóstico tumoral (JASO; MALHOTRA, 2011).

O tratamento do CAC consiste em remoção cirúrgica, quase sempre seguida de radioterapia pós-operatória, uma vez que é frequente a invasão perineural e a presença de margens cirúrgicas positivas (VAN WEERT et al., 2005). Embora a ressecção total com margens cirúrgicas livres seja geralmente possível, as recidivas locais tardias podem ocorrer mesmo após uma ressecção radical e terapia de radiação adjuvante (WYSOCKI et al., 2016).

A radioterapia tem sido indicada para portadores de tumores irresssecáveis (JE et al., 2017). Para os portadores de metástase, os cuidados a serem adotados são paliativos, tendo em vista que a quimioterapia parece ineficaz (COCA-PELAZ et al., 2015).

## **2.2 Epigenética**

A epigenética é o estudo de fenótipos herdados, que não são codificados pela sequência de DNA, referindo-se às alterações na metilação do DNA, microRNAs,

modificações pós-traducionais das histonas (MPH) e outros elementos da cromatina que podem alterar a expressão gênica (CHERVONA; COSTA, 2012). Fenômenos epigenéticos influenciam na fisiologia celular nos organismos multicelulares atuando na regulação da proliferação e diferenciação celular, e apoptose, podendo contribuir para o desenvolvimento e progressão tumoral (KELLY; ISSA, 2017; XIA et al., 2013).

Os mecanismos epigenéticos regulam a transcrição dos genes através do controle que exercem sobre a cromatina, modulando sua acessibilidade, e essa regulação transcricional pode ser local e/ou global por meio de modificações do DNA e pela modificação ou rearranjo dos nucleossomos (LUND; LOHUIZEN, 2004). Considerando que a regulação epigenética colabora com alterações genéticas no desenvolvimento do câncer, a possibilidade de reverter códigos epigenéticos fornece uma nova perspectiva no que se refere ao desenvolvimento de novas terapêuticas (LUND; LOHUIZEN, 2004).

As histonas são proteínas nucleares que compõem a cromatina, permitindo que a molécula do DNA seja organizada, compactada e confinada a uma pequena área física do núcleo celular, favorecendo, também, a mediação de processos funcionais vinculados ao DNA (PETERSON; LANIEL, 2004). Elas são capazes de sofrer inúmeras modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas amino-terminais, alterando assim, a acessibilidade da cromatina, facilitando ou dificultando a associação de proteínas de reparação do DNA e fatores de transcrição (DAVIS; ROSS, 2007).

### **2.2.1 Histonas**

Nos núcleos de todas as células eucarióticas, o DNA genômico encontra-se altamente compactado pela ação de proteínas, histonas e não histonas, que formam dobramentos complexos (JENUWEIN; ALLIS, 2001). O conjunto formado pelas proteínas histonas, não histonas e DNA é reconhecido como cromatina, na qual as histonas estruturam-se como “carretéis”, em torno dos quais o DNA é enovelado e condensado. Assim identificado e caracterizado, o nucleossomo constitui-se o nível mais básico de organização cromossômica (FÜLLGRABE; KAVANAGH; JOSEPH, 2011; COOPER; HAUSMAN, 2013).

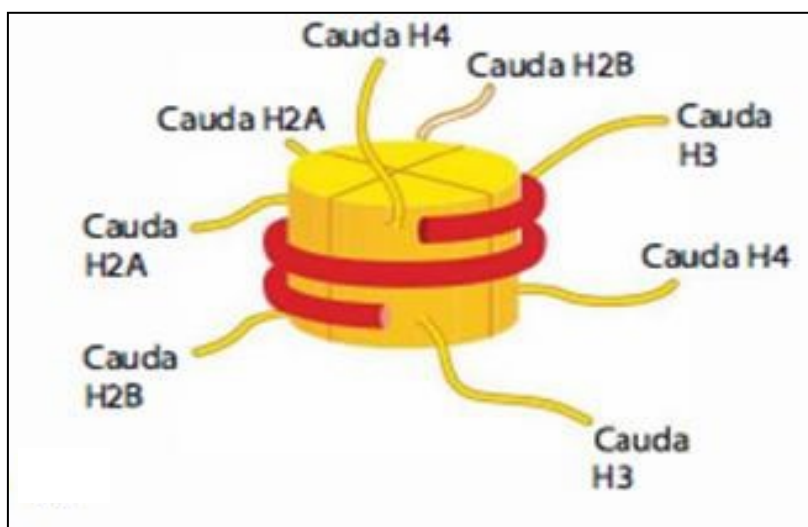
Os nucleossomos (Figura 1) são as unidades de embalagem fundamentais do genoma eucariótico. A organização estrutural desse genoma está associada ao acesso regulado à informação genética e à proteção dos genes contra danos físicos. O nucleossomo compreende



aproximadamente 147 pares de bases de DNA em um formato helicoidal, com 1,67 volta em torno de um núcleo octamérico de histona formado por dois dímeros de H2A/H2B e um tetrâmero H3/H4 (LEE; LEE, 2011; COOPER; HASMAN, 2013). Uma quinta histona, chamada H1, está ligada ao DNA no momento de sua entrada no nucleossomo, propiciando a estabilização das fitas de DNA. As H1 conseguem compactar o DNA em níveis mais elevados, reduzindo-o a uma dimensão compatível com a mínima área do núcleo em que se encontra. Ainda não está claro como as matrizes nucleossômicas contendo histona ligante (H1) torcem e dobram esta fibra de cromatina em filamentos cada vez mais compactados, produzindo estruturas organizacionais de níveis mais altos de complexidade (JENUWEIN; ALLIS, 2001; FÜLLGRABE; KAVANAGH; JOSEPH, 2011; COOPER; HAUSMAN, 2013).

As histonas são pequenas proteínas básicas constituídas por um domínio globular e uma cauda amino-terminal, mais flexível e carregada, que se projeta para fora do nucleossomo (JENUWEIN; ALLIS, 2001). Devido ao seu papel fundamental na função do DNA pelo controle da estrutura da cromatina, as histonas estão entre as proteínas eucarióticas mais conservadas (ALBERTS et al., 2010).

Uma característica notável das histonas, e particularmente das suas caudas, é o grande número e tipos de resíduos modificados que possuem (KOUZARIDES, 2007). Estas modificações covalentes de DNA e histonas desempenham importantes papéis na regulação de várias atividades do genoma, processos que usualmente ocorrem após a tradução, podendo ocorrer simultaneamente em diversas formas, em vários resíduos de aminoácidos (BANERJEE; CHAKRAVARTI, 2011). Este fato possibilita que haja inúmeras modificações únicas e ou combinadas, que repercutem funcionalmente de forma específica e variadas no genôma (PETERSON; LANIEL, 2004; BANERJEE; CHAKRAVARTI, 2011).



**Figura 1** – Desenho representativo do nucleossomo. Em amarelo, octâmero de histonas com suas caudas N-terminais fora do cerne octamérico, as quais estão sujeitas a modificações pós-traducionais. O DNA (vermelho) se enovela ao redor do octâmero de histonas, formando o nucleossomo. São as modificações nas caudas N-terminais que alteram a ligação das proteínas histonas com o DNA. Dessa forma, essas proteínas participam do controle da expressão gênica. (Fonte: ALBERTS et al., 2010).

### 2.2.2 Modificações de histonas

No ano de 2000, Strahl, Allis e Turner propuseram o código de histonas, segundo o qual modificações pós-traducionais de histonas tem a capacidade de influenciar estruturalmente a cromatina e regular portanto, a transcrição gênica (FÜLLGRABE; KAVANAGH; JOSEPH, 2011). Segundo esse código, as modificações nas caudas das histonas devem fornecer locais de ligação para as proteínas efetoras (JENUWEIN; ALLIS, 2001). Assim, modificações de histonas são consideradas como um dos marcadores de elementos reguladores, que são segmentos de DNA que modulam diferentes processos como transcrição, reparação e replicação, favorecendo a estabilidade genômica (CHOE et al., 2012). Alterações aberrantes de níveis de modificação das histonas são frequentemente observadas no câncer (KHAN; REDDY; GUPTA, 2015) (Quadro 1).

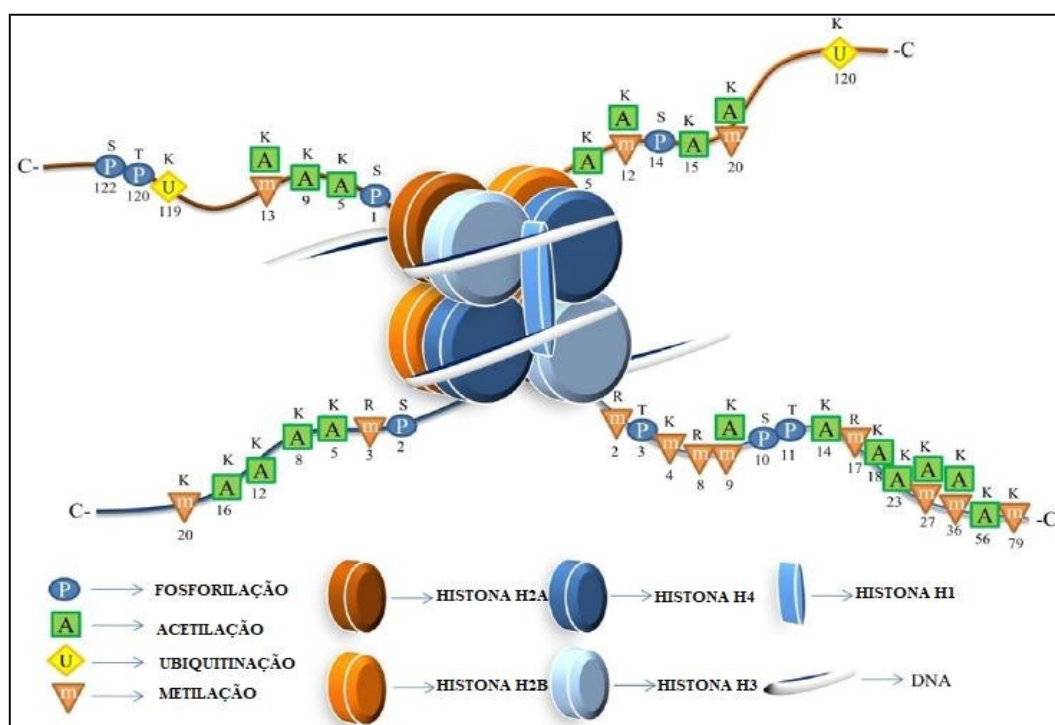
**Quadro 1** – Modificações globais de histonas em diferentes tipos de tumores, podendo ser utilizadas como prognóstico e/ou diagnóstico.

<b>Modificações pós-traducionais de histonas</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Tipos de cânceres</b>
<b>H3K9ac</b>	Prognóstico	Pulmão, mama, ovário, TGS <sup>1</sup> , queilite actínica <sup>1</sup> , boca <sup>1</sup> , tumor odontogênico <sup>1</sup>
<b>H3K18ac</b>	Prognóstico	Pulmão, próstata, mama, esôfago, pâncreas <sup>1</sup>
<b>H4K5ac</b>	Prognóstico	Pulmão
<b>H4K12ac</b>	Prognóstico	Queilite actínica <sup>1</sup> , pâncreas <sup>1</sup> , tumor odontogênico <sup>1</sup>
<b>H4K16ac</b>	Diagnóstico/ Prognóstico	Colorretal, pulmão, mama, estômago
<b>H3K4me</b>	Prognóstico	Próstata, rim
<b>H3K4me2</b>	Prognóstico	Próstata, pulmão, rim, mama, pâncreas, fígado
<b>H3K4me3</b>	Prognóstico	Rim, fígado, próstata
<b>H3K9me</b>	Diagnóstico/ Prognóstico	Mieloma, rim, pâncreas, próstata
<b>H3K9me2</b>	Prognóstico	Próstata, pâncreas
<b>H3K9me3</b>	Diagnóstico/ Prognóstico	Colorretal, mieloma, fígado, pulmão, próstata, mama, leucemia, estômago, glândula salivar <sup>1</sup>
<b>H3K27me</b>	Prognóstico	Rim
<b>H3K27me3</b>	Prognóstico	Pulmão, pâncreas, ovário, próstata, estômago, esôfago, fígado
<b>H4K20me3</b>	Diagnóstico/ Prognóstico	Colorretal, mieloma, próstata, mama, pulmão, linfoma, cólon, útero
<b>H3K36me3</b>	Prognóstico	Tireoide, tumor odontogênico <sup>1</sup>

1- Resultados considerados sugestivos para a relação entre o tumor e o fenômeno descrito.

Fonte: KHAN; REDDY; GUPTA, 2015. Adaptado pela autora.

A grande diversidade dessas modificações demonstra notável complexidade estrutural e funcional destas moléculas, que são capazes de gerar mudanças estruturais secundárias em pontos específicos, mas também tem a capacidade de atingir locais distantes que podem também afetar a função de outros genes (PETERSON; LANIEL, 2004; DAWSON; KOUZARIDES, 2012; ZHANG et al., 2015) (Figura 2).



**Figura 2** – 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.

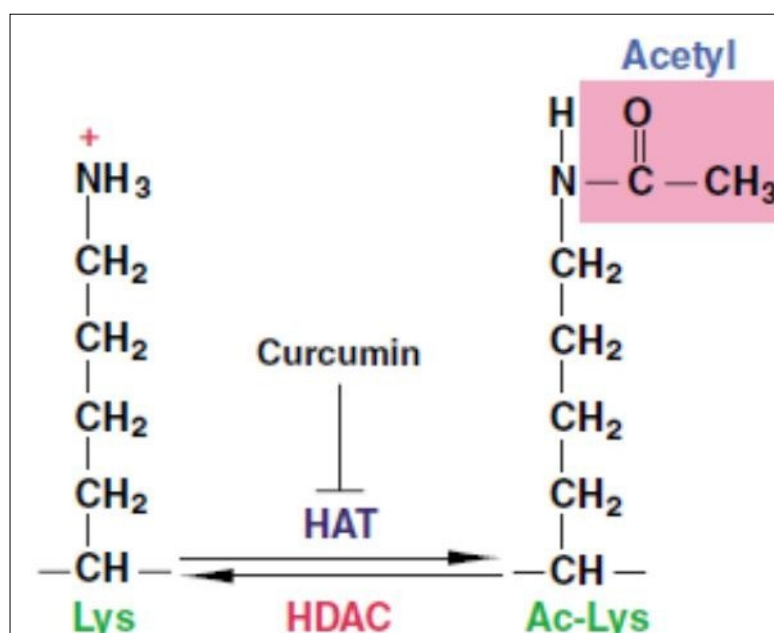
As caudas amino-terminais das proteínas histonas estão fora do cerne octamérico e servem como registradoras sobre os quais podem ser escritos sinais epigenéticos. A modificação covalente de histonas inclui acetilação de lisinas, metilação de lisinas e argininas, fosforilação de serinas e treoninas, ADP-ribosilação de ácidos glutâmicos, ubiquitinação e sumoilação de resíduos de lisina (LUND; LOHUIZEN, 2004). Estas modificações são dependentes de enzimas que traduzem as modificações nas caudas amino-terminais e são altamente específicas para posições de aminoácidos, estendendo assim o conteúdo de informação do genoma para além do código genético (CHOE et al., 2012; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

Importante ressaltar que a cronologia do aparecimento de uma modificação dependerá das condições de sinalização dentro da célula, podendo surgir e desaparecer em poucos minutos após o estímulo chegar à superfície celular (KOUZARIDES, 2007).

A seguir, serão considerados alguns tipos de modificações de histonas já descritas na literatura, seus prováveis significados e alguns fenômenos aos quais têm sido associadas.

### 2.2.2.1 Acetilação

A acetilação é um dos mecanismos que pode afetar as caudas amino-terminais das histonas, principalmente em resíduos de lisina. Este fenômeno foi associado diretamente a regulação da atividade transcricional, tendo em vista as evidências que ativadores e repressores de transcrição estão diretamente relacionados à presença de enzimas histona-acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs), respectivamente (COOPER; HAUSEMAN, 2013; WISNIESKI; CALCAGNO, 2015). O equilíbrio dessas enzimas mantém de forma satisfatória os processos de acetilação. As HATs são responsáveis por catalisar a transferência de acetil-coenzima A ao grupo amino-terminal dos resíduos de lisina, enquanto que as HDAC agem no sentido contrário, removendo os radicais acetil do grupo amino-terminal na cadeia lateral de resíduos de lisina (Figura 3) (GIL; RAMÍREZ-TORRES; ENCARNACIÓN-GUEVARA, 2017).



**Figura 3** – Acetilação de lisina. Adição do grupo acetil ao resíduo N-terminal de lisina, que ocorre através de enzima histona-acetiltransferases (HAT), sendo removido por uma enzima diferente, as desacetilases (HDAC). Fonte: YANG; SETO, 2007. Adaptado pela autora.

As HATs são classificadas quanto a sua localização celular: tipo A (nuclear), que participam de processos transcricionais e tipo B (citoplasmática), que tem como função

acetilar proteínas histonas recentemente sintetizadas. Em relação à função e estrutura são classificadas em cinco famílias: GNAT, p300 / CBP, MYST, basal TF e NRCF. Já as HDAs são classificadas em quatro classes (I a IV) que se subdividem (LIU; LI; WU, 2017).

Os grupos acetil adicionam cargas negativas às lisinas que possuem cargas positivas, levando a uma diminuição da interação entre DNA e histonas, o que permite ao nucleossomo compactado se abrir e dar acesso para que a maquinaria de transcrição entre em contato com o DNA, levando à sua transcrição. A remoção do grupo acetil durante a desacetilação permite que as histonas interajam mais fortemente com o DNA para formar conjuntos de nucleossomos compactados, o que pode efetivamente silenciar a transcrição gênica (ZHANG et al., 2015).

A acetilação de resíduos de lisina além de alterar propriedades físico-químicas das histonas, permite a interação destas com outras proteínas capazes de reconhecer resíduos acetilados, como os bromodomínios, que reconhecem esses resíduos de lisina acetilados, o qual o genoma humano é capaz de codificar 61 (JAIN; BARTON, 2016). Até o momento, o bromodomínio é o único domínio especializado que se liga com especificidade às marcas de acetilação, sendo evolutivamente conservados (GIL; RAMÍREZ-TORRES; ENCARNACIÓN-GUEVARA, 2017). Dessa forma, eles agem como um andaime para a montagem de maiores complexos macromoleculares de vários componentes que regulam a acessibilidade da cromatina e para o recrutamento de proteínas transcricionais chave como a RNAPolimerase, as proteínas contendo bromodomínio são consideradas "leitoras" do código de histonas (HELIN; DHANAK, 2013).

Embora esteja claro que os padrões globais de acetilação das histonas podem estar alterados no câncer, também está bem estabelecido na literatura que várias proteínas não histonas, incluindo muitos oncogenes importantes e genes supressores tumorais como MYC, p53 e PTEN, são também dinamicamente acetilados (DAWSON; KOUZARIDES, 2012). Vários estudos têm observado a importância da acetilação como se verá a seguir.

Ao estudarem padrões de acetilação da histona H3K9ac, H3K18ac e H4K12ac no câncer de pâncreas, Juliano et al. (2016) encontraram associações significativas entre os parâmetros clínico-patológicos e os grupos de histonas dicotomizados, especialmente para a acetilação de H4K12, sendo esta fortemente correlacionada a estágios mais avançados nesses tumores. Ao contrário deste trabalho, Moraes (2014) analisou a modificação H4K12ac em neoplasias da tireoide, mas não encontrou nenhum achado considerado relevante.

A desacetilação de histonas tem sido implicada na repressão transcricional de vários genes supressores de tumores. Ao estudar a relação da histona H3 na região promotora p21, Mitani et al. (2005) verificaram que essa região é hipoacetilada e associada à expressão reduzida de p21 em espécimes de carcinoma gástrico. Para os tumores endócrinos, o padrão de acetilação de H3K9 apresentou valores mais baixos nas neoplasias com maior probabilidade de recorrência e maior proliferação, tendo então grande relevância prognóstica nesses tumores (EBRAHIMI et al., 2013).

Ashktorab et al. (2009) ao estudarem tumores colorretais, encontraram diminuição nos valores para H4K12ac e H3K18ac nos tumores mal diferenciados quando comparados aos tumores moderados a bem diferenciados. Entretanto, não encontraram diferenças estatísticas significativas entre a porcentagem marcação destas MPTs e a sobrevivência.

Estudo realizado em pacientes com carcinoma de células escamosas esofágicas submetidos a esofagectomia, mostrou níveis de H3K9ac e H4K12ac maiores nos casos bem diferenciados em relação aos moderadamente ou mal diferenciados. A modificação H3K18ac é detectada em genes que promovem a entrada no ciclo celular, e neste trabalho a hiperacetilação de H3K18 foi significativamente associado a piores taxas de sobrevida livre de recorrência nesses tumores (HOSEOK et al., 2010).

Avaliação da acetilação de H3K9, H3K18 e total de H4 foram estudadas em carcinoma de células renais e oncocitomas, demonstrando não haver diferença nos padrões de expressão entre os dois grupos. Valores mais baixos de acetilação de H3 se correlacionaram com pior estágio, metástase à distância e progressão tumoral nos carcinomas de células renais, enquanto que a desacetilação de H4 se associou a um pior estágio (MOSASHVILLI et al., 2010). Resultados semelhantes também foram encontrados em tumores pancreáticos, nos quais casos com baixos níveis de expressão de acetilação mostraram taxa de sobrevida menor (MANUYAKORN et al., 2010). Contraditoriamente, Sant'ana (2014) ao estudar modificações de histonas em amostras metastáticas e não metastáticas de carcinoma epidermoide bucal, observou que portadores de metástase apresentaram índices mais altos de H3K9ac em relação ao grupo não metastático. Além disso, valores mais altos foram correlacionados a presença de metástase e recidiva.

Elsheikh et al. (2009) ao analisar a expressão de algumas histonas em câncer de mama, obteve como resultado baixa expressão de H4K16ac em 78,9 % dos tumores, sendo

que aqueles que apresentaram altos níveis desta hipoaceliação foram associados a um melhor prognóstico, e a perda desta modificação pode ser um evento precoce na patogênese do câncer de mama invasivo. Em contrapartida, níveis baixos e moderados de acetilação de H3K9, H3K18ac e H4K12ac demonstraram ter pior prognóstico nos pacientes acometidos por essas neoplasias.

Diferentemente de outros trabalhos que observaram uma correlação da redução de H3K9ac com pior prognóstico, estudo em amostras de carcinomas de esôfago demonstraram uma melhor sobrevida em pacientes que apresentaram níveis reduzidos para H3K18ac, consequentemente melhor prognóstico, principalmente em estágios iniciais (TZAIO et al., 2009).

Freitas Filho (2015) estudou na queilite actínica (QA) e no carcinoma epidermóide de lábio (CEL) as seguintes MPTHs: H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph. Ele observou que para ambas lesões, o H3K36me3 e H3S10ph apresentou valores de reatividade menores em relação ao tecido labial normal. Diminuições de imunomarcações também foram observadas em H3K9ac e H4K12ac no grupo de QA.

#### ***2.2.2.2 Metilação, fosforilação e ubiquitinação***

A metilação é uma MPT catalisada por enzimas metiltransferases (200 nos seres humanos), e sua desregulação é um dos principais contribuintes para o câncer, já que ela também participa na regulação da expressão gênica (ROTH et al., 2018).

Histonas são metiladas nas cadeias laterais de resíduos de arginina, lisina e histidina, e diferentemente do que ocorre nos processos de acetilação e fosforilação, a metilação não altera a carga elétrica global da molécula. Uma das contribuições para a diversidade das modificações, é que alguns aminoácidos como as lisinas podem ser mono-, di- ou tri-metiladas, já os resíduos de arginina podem ser simetricamente ou assimetricamente metilados (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

O reparo de pareamento indevido das bases no DNA (MMR – mismatch repair) garante a fidelidade estrutural do DNA, corrigindo os defeitos gerados durante a sua replicação. Já foi provado que a H3K36me3 é essencial para esse reparo in vivo, sendo que a falta ou depleção dela pode levar ao desenvolvimento tumoral, além dessa modificação ser



importante no recrutamento da proteína de reconhecimento de desajustamento hMutS $\alpha$  (hMSH2-hMSH6) sobre a cromatina (LI et al., 2013).

As modificações epigenéticas em leucemia linfóide aguda (LLA) incluem hipermetilação de DNA e modificações de histonas, tornando-se claro, recentemente, que os sistemas de metilação de DNA e lisina nas histonas estão altamente inter-relacionados e dependem mecanicamente um dos outros para que a cromatina funcione normalmente (WISNIESKI; CALCAGNO, 2015).

Dados obtidos por Müller-Tidow et al. (2010) sugerem que existem padrões específicos de níveis de H3K9me3 na leucemia mieloide aguda (LMA), e possíveis alterações em seus níveis são provavelmente o resultado da atividade alterada do fator de transcrição, sendo importante ressaltar que os padrões H3K9me3 estão intimamente associados com o prognóstico dos pacientes. Já a diminuição da expressão de H3K27me2 foi observada em metástases hepáticas de carcinomas colorretais; sua baixa expressão em casos primários associou-se a baixa taxa de sobrevida (TAMAGAWA et al., 2013).

No adenocarcinoma gástrico, a H3K9me3 correlacionou-se positivamente com a fase tumoral, invasão linfovascular, recorrência do câncer e, níveis de expressão mais elevados dessa modificação, correlacionou-se com uma fraca taxa de sobrevivência (PARK et al., 2008). Healey et al. (2014), ao analisarem o padrão de expressão de H3K9me3 e H3K27me3 de 804 casos de câncer de mama de grau variável, demonstraram que uma maior expressão de H3K27me3 está associada com tumores de baixo grau. Uma vez que esta modificação de histona foi inversamente proporcional ao grau do tumor, sua alta expressão sugere um melhor prognóstico.

A fosforilação da histona é a adição de um grupo fosfato nos resíduos de serina, treonina e tirosina, em qualquer uma das caudas de histonas, sendo fosforilados por proteínas quinases e desfosforilados por fosfatases (ROSSETTO; AVVAKUMOV; CÔTÉ, 2012). Tem sido correlacionada com diversos processos como meiose, mitose, apoptose, transcrição gênica e reparação aos danos causados ao DNA (COHEN et al., 2011). A alta expressão da fosforilação da histona H2AX foi encontrada nos tumores ovarianos epiteliais, verificando-se que o tecido ovariano normal apresentou baixa imunoreatividade, demonstrando que esta modificação pode ser de grande valor prognóstico e diagnóstico (MEI et al., 2015). Pereira (2015) avaliou por imuno-histoquímica a fosforilação da serina10 na histona H3 (H3S10ph) em neoplasias da tireoide, sendo que os carcinomas apresentaram uma reatividade menor que

os adenomas e o tecido glandular tireoidiano normal, demonstrando que esta MPTH está correlacionada à tumorigênese dessa neoplasia e a um pior prognóstico.

O processo de ubiquitinação ocorre pela adição de ubiquitina nos resíduos de lisina nas caudas de histonas, estas podem somente ser monoubiquitinadas, estando este processo relacionado ao controle transcricional da expressão gênica e à resposta ao dano no DNA (COLE; CLIFTON-BLIGH; MARSH, 2015). Estudos tem mostrado que a USSP22, enzima que remove a ubiquitina das proteínas, pode contribuir para o surgimento tumoral inibindo a transcrição do gene p21 (TANG B. et al., 2015). Altos níveis de sua expressão foram encontrados no carcinoma hepatocelular em comparação com tecido hepático normal, e quanto maior essa expressão menor a sobrevida dos pacientes (TANG B. et al., 2015). Semelhante análise foi desenvolvida em amostras tumorais de mama e os resultados obtidos foram equivalentes ao estudo anteriormente citado, com altos valores de expressões de USP22 nos casos de neoplasias e pior prognóstico para esses pacientes (ZHANG Y., 2011).

### ***2.2.3 Modificações de histonas e tumores de glândulas salivares***

Em tumores de glândula salivar, outros mecanismos epigenéticos foram amplamente explorados em detrimento das modificações de histonas, tais como a metilação de vários genes supressores de tumor, com ênfase no carcinoma adenoide cístico. Há um número limitado de trabalhos na literatura, sendo igualmente limitados os grupos de tumores estudados, sugerindo modificações de histonas como mecanismos epigenéticos de desenvolvimento e progressão de tumores de glândula salivar em humanos.

Variações nos padrões de metilação, acetilação e ubiquitinização das diferentes histonas, bem como a expressão das enzimas relacionadas foram relatadas em alguns tumores. Um ensaio imuno-histoquímico analisando 36 amostras de diferentes tumores de glândulas salivares identificou a menor expressão de acetilação da histona H3 em quatro amostras de carcinoma adenoide cístico (n=17) e em dois carcinomas mucoepidermóides (n=7), representando 16,7% do total de casos analisados, enquanto a redução de expressão da histona H4 foi observada apenas em cinco amostras do primeiro tumor, representando, por sua vez, 13,9% dos casos (KISHI et al., 2005).

Diferentes padrões de expressão das enzimas histona-metiltransferase (HMT) foram identificados em amostras de adenoma pleomórfico comparativamente aos tecidos glandulares

normais. Em dez tumores avaliados através de RT-PCR e *Southern blot analysis*, as enzimas SETB1 e Eu-HMTase, responsáveis pela metilação da histona H3K9, e a SETD8, responsável pela metilação da H4K20, apresentaram maiores níveis de expressão, enquanto a DOT1L, que metila a H3 na lisina79, obteve menores taxas de expressão (ANIELLO et al., 2006).

As alterações de histonas também podem exercer um papel importante na progressão dos tumores de glândulas salivares. Em uma avaliação de 66 casos de carcinoma adenoide cístico, elevados níveis de H3K9me3 foram associados a uma maior taxa de proliferação celular, metástases à distância e pior prognóstico, enquanto que maior expressão de H3K9ac apresentaram uma taxa de sobrevivência significativamente maior (XIA et al., 2013).

Outro estudo aponta a associação entre a expressão de protease ubiquitina-específica 22 (USP22), uma enzima de desubiquitinização de histonas H2A e H2B, com o subtipo histológico, taxa de metástase linfonodal, gradação e expressão de Ki-67 em 135 pacientes com carcinoma adenoide cístico, indicando-o como um fator de prognóstico independente (DAI et al., 2014).

O envolvimento das modificações de histona com o prognóstico de pacientes diagnosticados com carcinoma adenoide cístico foi ainda evidenciado através de sua interação com o gene que codifica o receptor de endotelina B (EDNRB), cuja expressão foi significativamente menor em pacientes com tumores em estágios avançados (XIA et al., 2015). Outro estudo identificou uma correlação inversamente proporcional da H3K9ac com a atividade proliferativa dos tumores de glândula salivar ao comparar sua expressão com Ki-67, além de evidenciar um maior percentual de reduzida expressão da MPTH nos tumores malignos em relação aos benignos (WAGNER et al., 2017).

Desta forma, percebe-se que fenômenos da epigenética relacionados às modificações de histonas ainda devem ser explorados nestas lesões, buscando consolidar seu papel na tumorigênese de glândula salivar.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a presença de modificações pós-traducionais de histonas H3K9ac e H4K12ac no adenocarcinoma polimorfo e carcinoma adenoide cístico de glândulas salivares e identificar sua relação com aspectos clinicopatológicos e da progressão tumoral.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Avaliar a presença do antígeno relacionado à modificação de histona H3K9ac e H4K12ac no adenocarcinoma polimorfo e carcinoma adenoide cístico de glândulas salivares;
2. Avaliar a extensão de atividade proliferativa celular no adenocarcinoma polimorfo e carcinoma adenoide cístico de glândulas salivares;
3. Avaliar a relação entre a intensidade da presença antigênica da H3K9ac e H4K12ac e a extensão da atividade proliferativa nos tumores mencionados;
4. Identificar provável relação entre as modificações pós-traducionais de histonas citadas anteriormente com aspectos clinicopatológicos da doença e fenômenos intercorrente: recidiva, metástases e sobrevida.

#### 4. JUSTIFICATIVA

O adenocarcinoma polimorfo e carcinoma adenoide cístico são tumores malignos, porém de comportamento distinto, de forma a terem um prognóstico e tratamento diferentes. Embora haja um esforço contínuo na identificação de marcadores que possam auxiliar no diagnóstico diferencial, estes marcadores não têm especificidade absoluta, e ainda permanecem casos com necessidade de maior definição com vistas à adequação terapêutica e predição de prognóstico. Pouco ainda também é conhecido sobre os fatores genéticos e epigenéticos que participariam de sua patogenia. Recentes estudos desenvolvidos no Laboratório de Patologia bucomaxilofacial da FOUFU têm agregado informações e confirmando outras descritas na literatura sobre a relação das MPTHs com a patogenia de doenças cancerizáveis, tumores odontogênicos, neoplasias de tireoide e carcinoma de células escamosas, mostrando também seu potencial uso como marcador de prognóstico. Por outro lado, considerando a reversibilidade das modificações de histonas, é fundamental que possamos identificar as alterações presentes em cânceres, para que, futuramente, se possa pensar em planejamentos terapêuticos utilizando-se de abordagens não cirúrgicas efetivas no controle das neoplasias. Dessa forma, as MPTs de histonas, que vem sendo encontradas em diversos tumores, podem ajudar no desenvolvimento de novos marcadores de diagnósticos e terapêuticas, a fim de colaborar não só com o tratamento dos pacientes, mas também dar a eles uma melhor qualidade de vida.

## **5. 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) (Anexo 1).

### **5.1 Casuística**

Para essa pesquisa foram utilizadas amostras de 67 casos de neoplasias de glândulas salivares malignas, a saber: ACP (n= 29) e CAC (n= 38), provenientes dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (LPBMF-FOUFU) no período de 1978 a 2017, e da Divisão Interna de Patologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA, MC&T, Rio de Janeiro, Brasil), no período entre 1997 e 2006. Para inclusão, todos os casos foram revistos pelos patologistas da Área de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFU, seguindo os critérios definidos pela OMS (EL-NAGGAR et al., 2017).

Foram coletados dados sociodemográficos, clinicopatológicos e de intercorrência, a saber: idade e sexo dos pacientes; localização primária e dimensão das lesões, estadiamento clínico, recidivas, ocorrência e localização de metástases, e sobrevida dos pacientes.

O único critério absoluto considerado para exclusão foi a ausência de material suficiente necessário à investigação antigênica. Os casos dos quais não se obtiveram dados sociodemográficos e clinicopatológicos permaneceram no estudo, sendo excluídos apenas das análises para as quais o seu registro não foi efetuado. Este procedimento fez com que algumas análises fossem realizadas com um número menor de casos do que aquele originalmente incluído no estudo.

### **5.2 Ensaios imunohistoquímicos**

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 imuno-histoquímicos 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 minutos 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 minutos 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 minutos 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 minutos à temperatura de 110° C, em câmara termopressurizada (Steamer – Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Após resfriamento por 40 minutos, os cortes foram submetidos a cinco banhos de água destilada.

Para o bloqueio da atividade endógena da biotina as lâminas foram imersas durante 15 minutos 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 minutos 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 minutos 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 5 minutos cada uma em solução tampão tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl), 20 nM 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 minutos. 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 2 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 2 minutos cada. Então, foram incubados por 20 minutos novamente em câmara úmida à temperatura ambiente, com sistema de amplificação estreptavidina-biotina-peroxidase (Trek 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 2 minutos cada.

Adiante, seguiu-se a incubação em complexo terciário a base de estreptavidina conjugada a peroxidase (Trek Avidin-HRP Label, Biocare Medical) por 10 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Sucessivamente, os mesmos foram submetidos a duas lavagens em tampão Tris-HCl no período de 2 minutos cada.

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

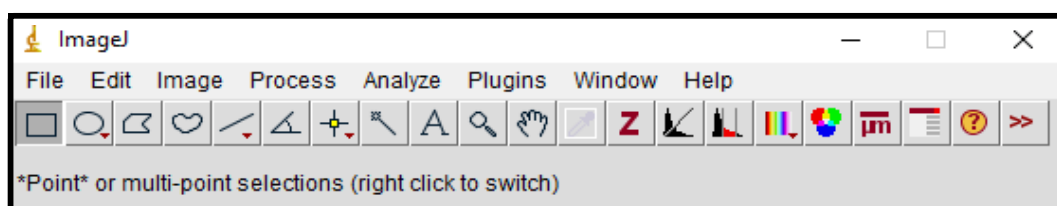
Para finalizar a reação, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, sequentemente lavadas em água corrente, desidratadas em etanol 100% por 10 minutos, secas em estufa a 60°C e montadas com lamínulas de vidro em resina histológica (Permount, Fisher Scientific International, Pittsburgh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

### **5.3 Análise de reatividade imuno-histoquímica 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 absorbância (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). Todos os casos foram avaliados a partir das áreas “*hotspot*” de marcação, percorrendo em zigue-zague cada uma das lâminas. Posteriormente, foi então submetida avaliação através do *ImageJ* (Jensen et al, 2013) (Figura 4).



**Figura 4** – Tela inicial do *ImageJ* contendo diferentes ícones relativos às ferramentas utilizadas em morfometria. (Fonte: <https://imagej.nih.gov/ij/features.html>).

### 5.3.1 Calibração do *ImageJ* para análise morfométrica

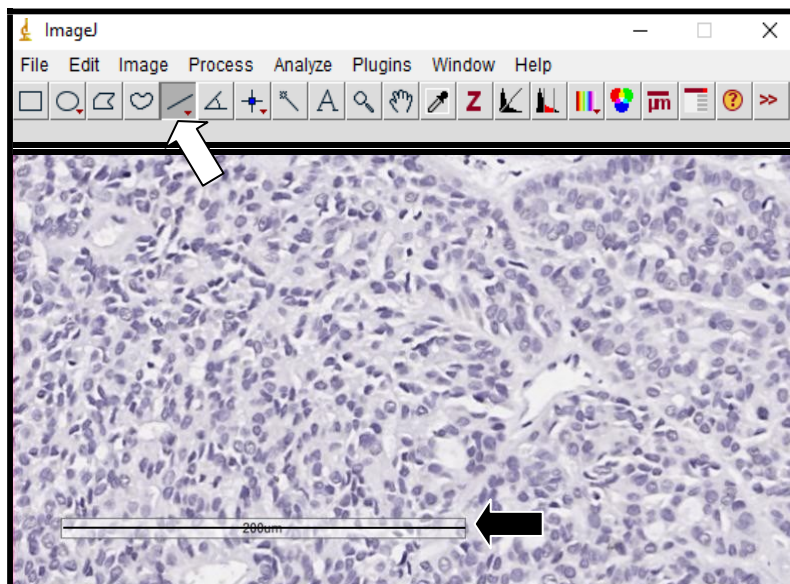
Previamente à análise, procedeu-se a calibração dos parâmetros de distância e escala de cinza, indispensáveis para que todas as imagens tenham o mesmo padrão de análise, seguindo-se o protocolo disponível no site [www.ImageJ.inh.gov](http://www.ImageJ.inh.gov).

#### 5.3.1.1 Calibração da distância

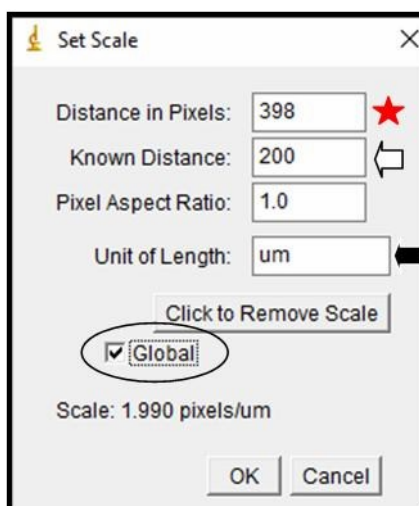
A calibração de distância permite que se obtenha a informação sobre o número de *pixels* presentes numa determinada área de valor conhecido. Este dado permite estabelecer a relação entre intensidade de cor (marcação) e *pixels* avaliados, visando dados proporcionais (relativos) para os casos sob análise.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

1. Mensuração do valor de *pixels* presentes em 200  $\mu\text{m}$  a partir da utilização do ícone *Straight line* da barra de ferramenta, dispondo-a sobre a barra de medida em  $\mu\text{m}$  (200  $\mu\text{m}$ ) presente na imagem (Figura 5);
2. Acessar na barra de ferramentas o ícone *Analyze* e, em seguida, *Set Scale*, possibilitando a abertura de janela para inserção dos dados relativos à distância em  $\mu\text{m}$ : no caso distância, 200 e unidade,  $\mu\text{m}$  (Figura 6);

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



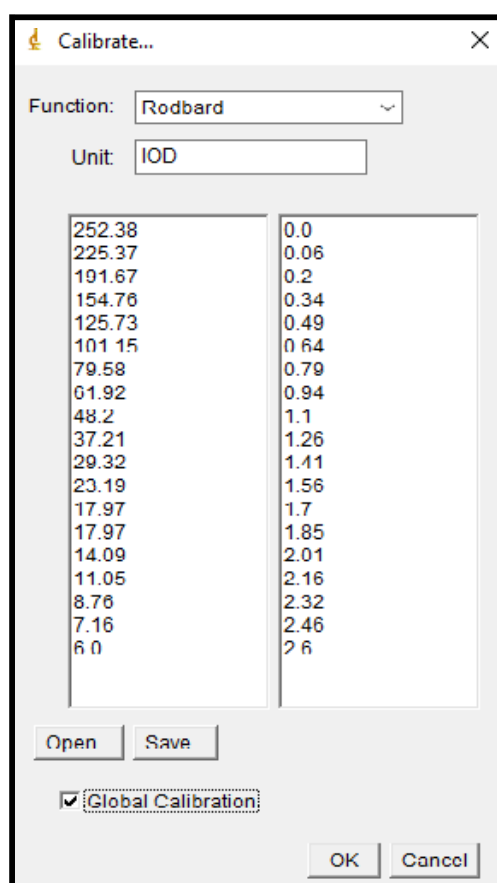
**Figura 5** – Imagem aberta no *ImageJ* utilizada para calibração. A seta branca indica o ícone pressionado na barra de ferramentas que permitirá a inserção da linha sobre a barra de medida em  $\mu\text{m}$  (200  $\mu\text{m}$ ) presente na imagem (seta escura).



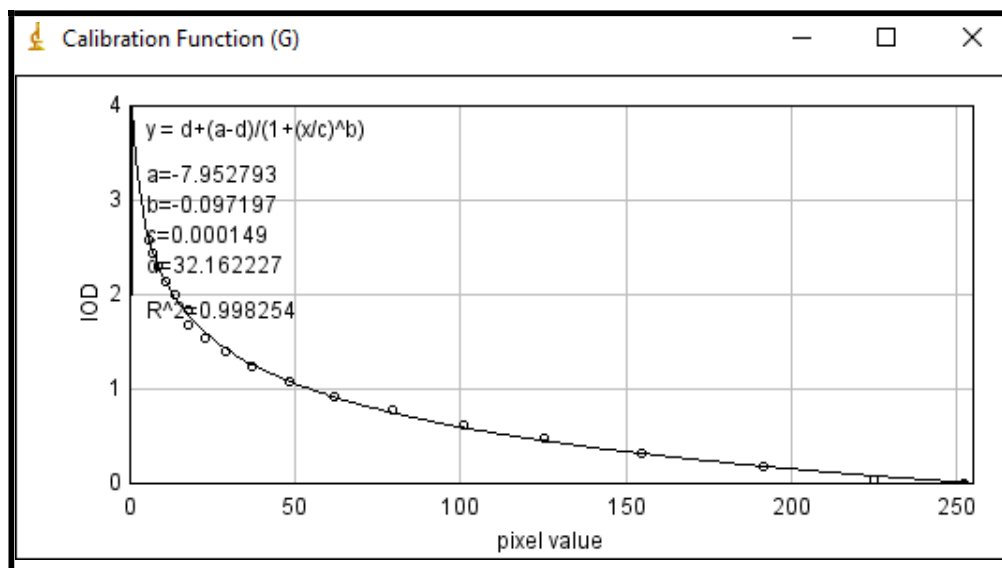
**Figura 6** – Janela de inserção de dados para calibração de dimensão. O dado *Distance in Pixels* (398) aparece automaticamente (★); na janela *Known Distance* deverá ser inserido o número 200 (seta branca) e na janela *Unit of Length* a unidade de medida ( $\mu\text{m}$ ) (seta escura). Após estes procedimentos, marcar a caixa de marcação (*checkbox*) *Global*.

### 5.3.1.2 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>) (Anexo 2). 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 7). Este procedimento permite a construção de uma relação entre valores de *pixel* e IOD traduzidos por uma curva exponencial (Figura 8).



**Figura 7** – 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/>).



**Figura 8** – 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/>).

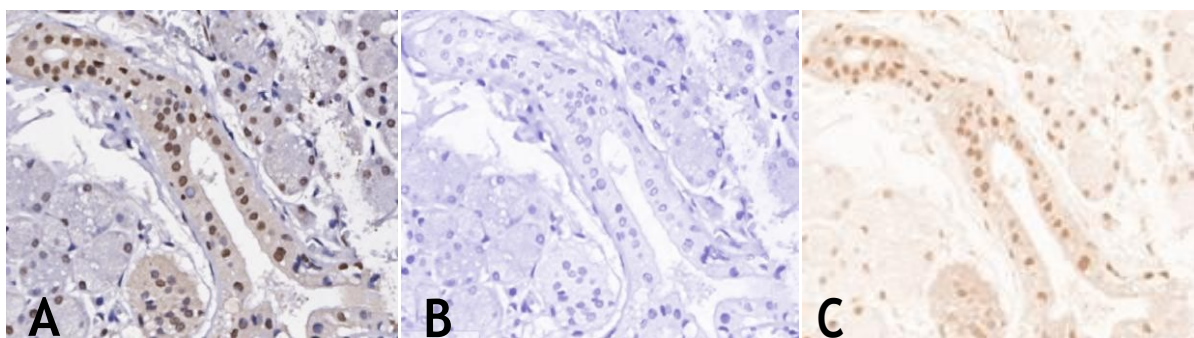
### 5.3.2 Análise das imagens

#### 5.3.2.1 Índice de Absorbância (IOD) do grupo controle

O grupo controle foi constituído de amostras de glândulas salivares menores e maiores, externas (não associadas aos tumores) e internas (presentes em fragmentos da exérese tumoral), não envolvidas pelo tumor. As avaliações foram realizadas a partir de 500 núcleos de células ductais internas (luminais) e externas (mioepiteliais e de reserva). Para tanto, foram desenvolvidos os seguintes procedimentos:

1. Deconvolução das imagens histológicas com marcações imuno-histoquímicas: nesta etapa, a imagem original é separada em dois matizes, o da coloração pela Hematoxilina e o do DAB (Figura 9).
2. Utilizando a imagem de DAB, os núcleos foram sendo delimitados (Figura 10) e posteriormente, para que somente essas áreas nucleares fossem analisadas, clicou-se o ícone *Roy Manager*, ferramenta que tem como função gravar a delimitação selecionada a ser mensurada na imagem.
3. Para obtenção dos resultados, clicou-se em *Analyze* e em seguida *Measure*. Todos os núcleos selecionados foram então medidos simultaneamente, e os valores transferidos para a janela de Resultados do *software* (Figura 11), na qual são dados os valores da área, média do

IOD, desvio padrão, IOD absoluto e percentagem de área marcada. Desta avaliação, obtiveram-se valores médio, mínimo e máximo, correspondentes a relação entre intensidade de coloração e área nuclear avaliada (Figura 12 e Quadro 2). Os valores mínimos e máximos foram considerados como parâmetros para estabelecimento de estado de hipo e hiperacetilação, respectivamente, e para estabelecimento do valor de *cut-off* médio para o IOD do grupo controle.



**Figura 9** – Imagem parcial do parênquima de glândula salivar admitida como controle do estudo utilizada para obtenção dos valores de IOD médios para H3K9ac. (A) área do parênquima glandular com núcleos ductais marcados para H3K9ac; (B) área mostrada em (A) após a deconvolução, revelando apenas o parênquima corado por Hematoxilina; (C) área mostrada em (A) mostrando núcleos ductais marcados para a histona H3K9ac em DAB. (Aumento original 200x; A: Hematoxilina/DAB; B: Hematoxilina; C: DAB). (Fonte: Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial – FOUFU).

**Quadro 2** – Valores médios, mínimos e máximos da relação entre intensidade de absorbância (IOD) e áreas nucleares avaliadas.

Anticorpo	Média	<i>Cut-off</i> máximo	<i>Cut -off</i> mínimo
H3K9ac	0,242	0,84	0,10
H4K12ac	0,272	1,03	0,10



**Figura 10** – Núcleos selecionados e numerados para quantificação do número de núcleos total a serem considerados na análise do controle, cujas áreas foram gravadas utilizando a ferramenta *Roi Manager* para posterior mensuração. (Fonte: Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial – FOUFU).

Results						
File Edit Font						
	Label	Area	Mean	StdDev	IntDen	%Area
1	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0106-0392	26.26	0.17	0.04	4.58	100
2	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0100-0365	37.37	0.14	0.03	5.25	100
3	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0135-0452	52.52	0.14	0.03	7.20	100
4	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0123-0313	38.89	0.13	0.04	4.88	100
5	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0109-0420	34.60	0.14	0.03	4.74	100
6	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0103-0342	32.32	0.17	0.05	5.37	100
7	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0151-0335	44.44	0.18	0.03	8.05	100
8	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0187-0389	41.92	0.16	0.04	6.68	100
9	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0177-0377	31.31	0.15	0.03	4.73	100
10	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0193-0423	41.92	0.17	0.03	7.09	100
11	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0160-0348	40.40	0.19	0.04	7.83	100
12	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0193-0438	38.13	0.18	0.04	7.01	100
13	1870 - H3K9me3.tif 2.tif (Colour[2]):0176-0399	25.76	0.19	0.03	4.88	100

**Figura 11** - Janela de Resultados, para a qual os valores mensurados são transferidos.

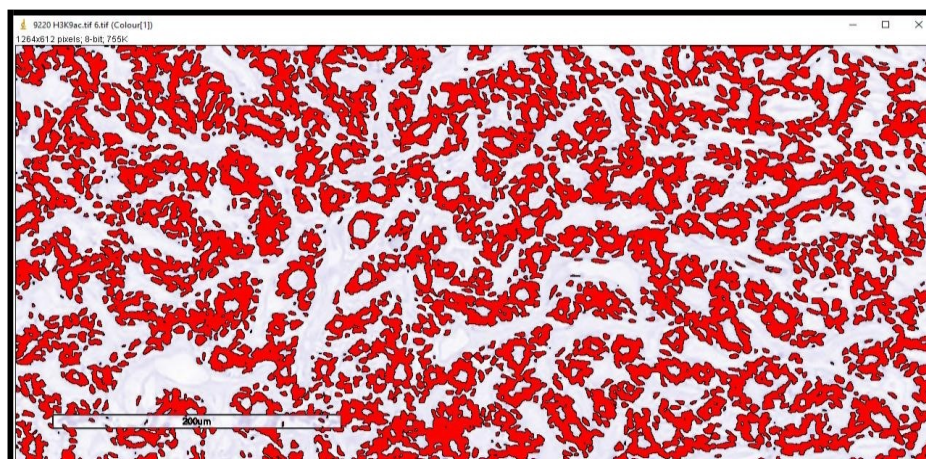
### 5.3.2.2 Índice de Absorbância (IOD) dos tumores

Para cada caso foram avaliados 10 campos; em três casos não foi possível atingir este número de campos avaliados em função da dimensão dos cortes histológicos tumorais. Previamente à realização da mensuração, todas as imagens passaram pela deconvolução. A partir da imagem em Hematoxilina, confeccionou-se uma “máscara” para cada campo a ser analisado, de forma a contemplar todos os núcleos de células neoplásicas presentes no campo (Figura 12). Com a ferramenta *Draw tool (Flood fill toll)*, procedeu-se a eliminação de células (núcleos de células) do estroma, corando toda esta parte de branco, para permitir que a máscara contornasse apenas os núcleos neoplásicos. Após a seleção de núcleos, utilizamos a ferramenta *Roy Manager*, gravando assim a delimitação selecionada na imagem de hematoxilina. Em seguida, esta “máscara” foi aplicada a imagem em DAB (Figura 13).

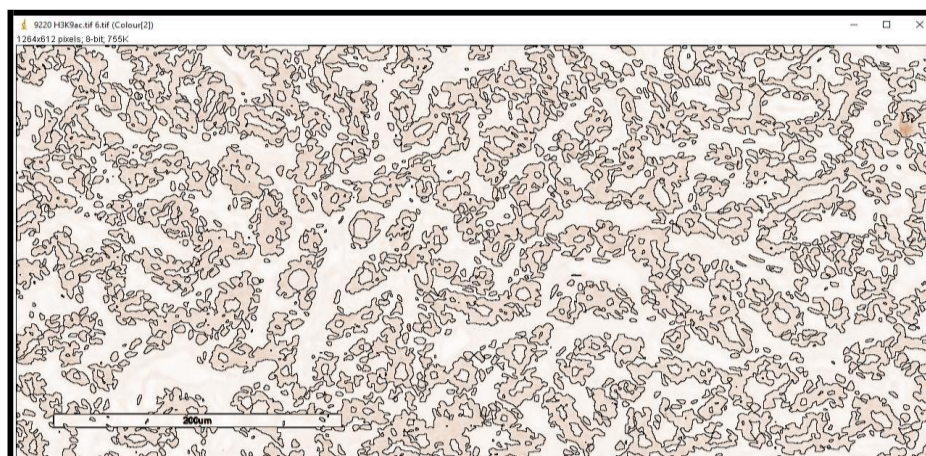
Após a aplicação da máscara, mensurou-se, primeiramente, a área total nuclear para a obtenção da média. Em seguida, aplicou-se os valores de *cut-offs* (Figura 14) a partir da ferramenta *Threshold*. Desta forma, somente as marcações nucleares acima ou abaixo desses valores foram medidas.

Ao ajustar os valores dos *cut-offs*, faz-se a mensuração clicando em “*Analyze*” e “*Measure*”, sendo os valores resultantes das análises transferidos para a janela de Resultados.

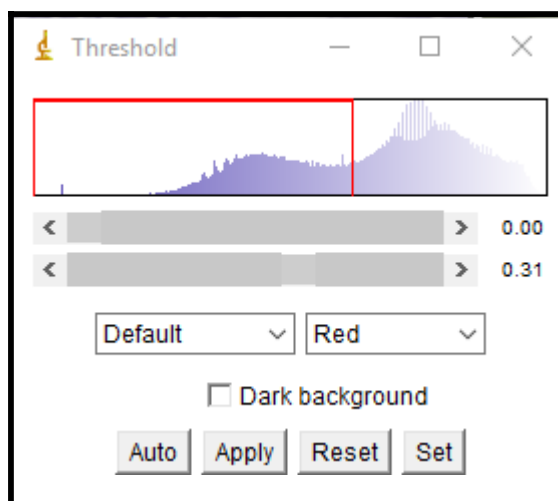




**Figura 12** – Seleção de núcleos a partir da imagem de hematoxilina para criação da máscara que será utilizada na imagem de DAB. (Fonte: Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial – FOUFU).



**Figura 13** – Imagem de DAB com a máscara aplicada proveniente da imagem de Hematoxilina, demonstrando que somente os núcleos são marcados para mensuração. (Fonte: Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial – FOUFU).



**Figura 14** – Janela do *Threshold*. A barra inferior da ferramenta é utilizada para se trabalhar com os valores de *cut-offs* máximos, e a barra superior para *cut-offs* mínimos.

### 5.3.3 Análise imuno-histoquímica dos valores de Ki67

O princípio de avaliação para o Ki67 seguiu aquele considerado para a análise das modificações de histonas H3K9ac e H4K12ac, considerando-se apenas o percentual de área ocupada pelos núcleos marcados em relação à área total de núcleos da imagem original. A determinação da imunomarcacão dos núcleos positivos para Ki-67 foi realizada pela identificação de diferentes matizes de coloração marrom na imagem DAB após a deconvolução da imagem histológica original imunomarcada.

## 5.4 Estatística

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

### 5.4.1 Análise dos dados

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

1. Idade: não idoso ( $\leq 60$  anos); idoso ( $> 60$  anos);
2. Sexo: masculino; feminino;
3. Localização das lesões: glândulas maiores/glândulas menores;



4. Dimensão:  $T_i$ : T1 e T2 (até 4 cm);  $T_a$ : T3 e T4 (> que 4 cm);
5. Estadiamento: Inicial (E1 e E2) e Avançado (E3 e E4);
6. Presença de metástases: sim e não;
7. Presença de recidivas: sim e não;
8. Óbito/FPT: sim e não;
9. Alteração de histonas: hipoacetilado ( $< cut-off$ ); hiperacetilado ( $\geq cut-off$ ).

Foram considerados fora de possibilidade terapêutica (FPT) aqueles pacientes com doença (primária, metastática, recidivante) cujo tratamento não viabilizaria possibilidade técnica de remoção da lesão, pacientes com estado geral de saúde que não permitiria qualquer tipo de proposta terapêutica.

A análise estatística será realizada utilizando-se de *software* GraphPad, versão 5.01 (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), resultando em distribuição não normal. Para avaliação comparativa dos valores dos grupos testados foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, com *post-hoc* teste de Dumm. Para a avaliação comparativa dos valores de IOD obtidos entre dois grupos representativos das variáveis definidas para os casos de ACP e CAC (idade e sexo dos pacientes, localização, tamanho do tumor, estágio da lesão, presença de recidivas e metástase e sobrevida dos pacientes discriminados acima) foi empregado o teste *t* de *Student* para distribuição normal e *U* de Mann-Whitney para não normal. O teste de correlação de Spearman foi empregado para verificar a correlação entre os valores de IOD para as MPTH 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  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Dados sociodemográficos e clinicopatológicos

O presente estudo foi composto por 67 amostras de neoplasias malignas de glândulas salivares, sendo 29 casos de pacientes portadores de ACP e 38 de CAC. Os casos de ACP foram diagnosticados em pacientes com média etária de 58,8 ( $\pm 11,6$ ) anos, com pico de frequência na 6ª década de vida, sem predileção por sexo e maior incidência no palato (40,7%). Em relação ao tamanho, houve uma frequência maior de tumores entre  $> 2$  e  $\leq 4$  cm (50%), com média de 3,54 cm ( $\pm 2,2$ ). Dos tumores diagnosticados, 65% se encontravam em estágio inicial (3/20); 20% apresentaram recidivas (4/20); metástases ocorreram em 15% da amostra (3/20), todas para os pulmões. Além disso, 20% dos pacientes foram a óbito ou se encontravam fora de possibilidades terapêuticas (FPT) (4/20).

Para os casos de CAC, percebeu-se uma ampla faixa etária (26-80) para diagnóstico da doença, com média de 51,0 ( $\pm 13,6$ ) anos, e pico de frequência na 4ª e 5ª década de vida. A maioria dos diagnósticos foi em mulheres (63,9%), com maior frequência de casos em glândulas submandibulares (27,8%), seguidas do palato (25%). A maior parte dos tumores mostrou dimensão entre  $> 2$  e  $\leq 4$  cm (55,2%), com média de 4,0 ( $\pm 2,4$ ). 57,6% dos casos eram tumores em estágio avançado (19/33), 9,1% apresentaram recidivas (3/33), sendo que 30,3% de todos os tumores produziram metástases (10/33), com 10% em linfonodos e 90% à distância, sendo o pulmão o principal sítio acometido (77,8%). Além disso, 27,3% dos pacientes tiveram óbito/FPT (9/33). Os dados clinicopatológicos detalhados dos dois tumores encontram-se distribuídos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Dados clinicopatológicos dos pacientes com Adenocarcinoma Polimorfo (ACP) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) de glândulas salivares.

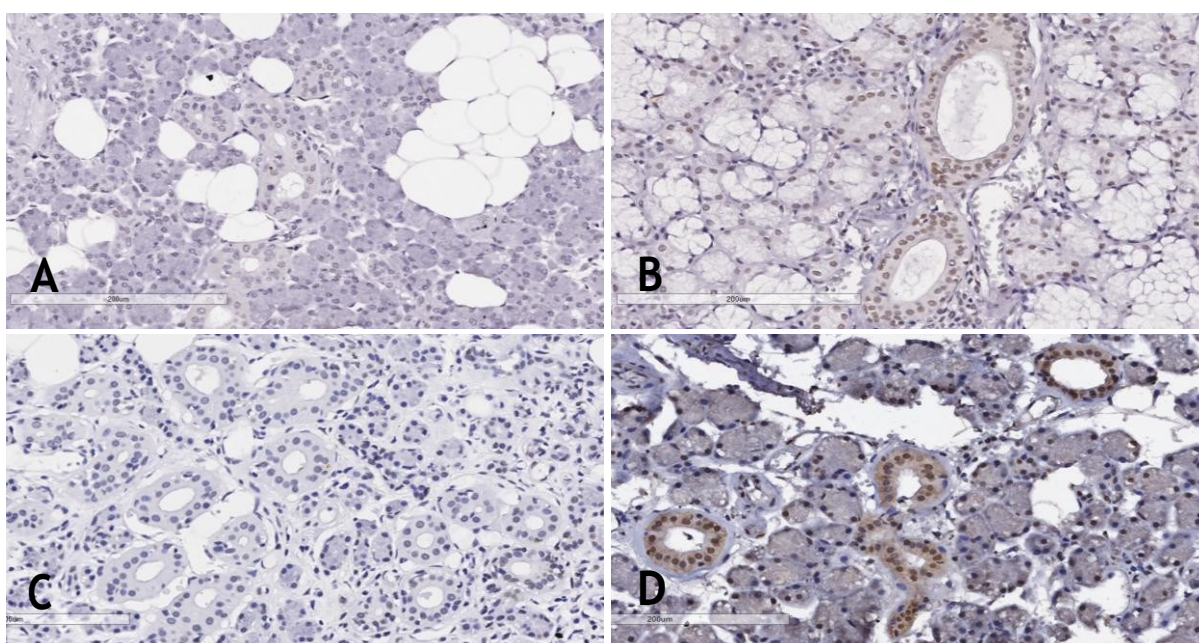
Variáveis <sup>1</sup>		ACP	CAC
<b>Idade</b>	Média ± DP	58,8 (±11,6)	51 (±13,6)
	Variação	39-86	26-80
<b>Sexo</b>	Feminino	14 (52%)	23 (63,9%)
	Masculino	13 (48%)	13 (36,1%)
<b>Localização</b>	Parótida	3 (11,2%)	5 (13,9%)
	Submandibular	-	10 (27,8%)
	Sublingual	-	2 (5,5%)
	Assoalho bucal	2 (7,4%)	2 (5,5%)
	Bochecha	4 (14,8%)	1 (2,8%)
	Gengiva	2 (7,4%)	-
	Lábio	1 (3,7)	1 (2,8%)
	Língua	-	5 (13,9%)
	Mucosa	4 (14,8%)	-
	Palato	11 (40,7%)	9 (25%)
	Trígono	-	1 (2,8%)
<b>Tamanho</b>	≤ 2 cm	7 (27%)	4 (13,8%)
	> 2 - ≤ 4 cm	13 (50%)	16 (55,2%)
	> 4 cm	6 (23%)	9 (31%)
<b>Estadiamento</b>	Inicial	13 (65%)	14 (42,4%)
	Avançada	7 (35%)	19 (57,6%)
<b>Recidiva</b>	Presente	4 (20%)	3 (9,1%)
	Ausente	16 (80%)	30 (90,9%)
<b>Metástase</b>	Presente	3 (15%)	10 (30,3%)
	Ausente	17 (85%)	23 (69,7%)
<b>Óbito/FPT<sup>2</sup></b>	Sim	4 (20%)	9 (27,3%)
	Não	16 (80%)	24 (72,7%)

1. Os percentuais informados na Tabela foram baseados no número de casos para os quais os dados foram obtidos: Idade: ACP: 25, CAC: 36; Sexo: ACP: 27; CAC: 36; Localização: ACP: 27, CAC: 36; Tamanho: ACP: 26, CAC: 29; Estadiamento, recidiva, metástase e óbito/FPT: ACP: 20, CAC: 33.

## 6.2 Análise e avaliação imuno-histoquímica

### 6.2.1 H3K9ac e H4K12ac

A análise das glândulas salivares controles mostrou uma positividade difusa no parênquima, presente em todos os tipos celulares, com intensidades variadas (Figura 15). A análise quantitativa das marcações para MPTH de H3K9ac mostrou variações de intensidade para IOD (0,09 a 0,84), com média de 0,24; enquanto que para H4K12ac o IOD variou de 0,09 a 1,03, com média de 0,27.



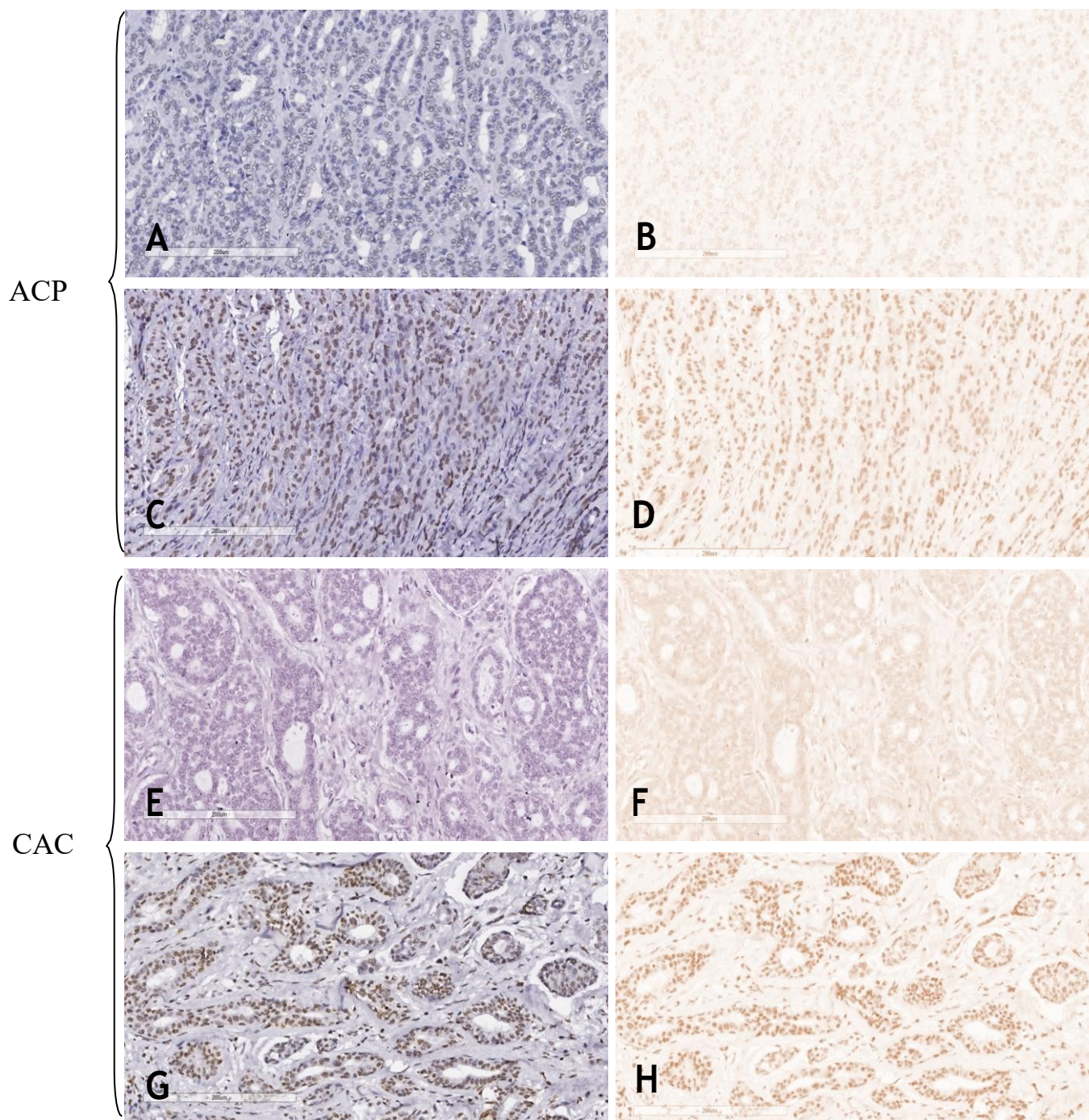
**Figura 15** – Imunomarcacão de H3K9ac e H4K12ac no parênquima das glândulas salivares. Percebe-se que todo o parênquima mostrou evidência do antígeno para H3K9ac, com ampla variação em intensidade e localização celular: marcação mais atenuada em (A) e mais intensa em (B). O mesmo ocorre com H4K12ac: em (C) marcação menos intensa e em (D) mais acentuada. (Método da estreptavidina-Biotina/Hematoxilina de Harris, aumento original: 200x).

### 6.2.2 H3K9ac em amostras tumorais

Para o ACP, não foi possível identificar um tipo celular ou um arranjo mais frequentemente imunomarcado. A intensidade variou, com predominância de casos com marcação leve a moderada, e mais raramente casos com prevalência de intensa positividade. Nos casos de CAC, a maior densidade de imunomarcações foi presenciada nas células com fenótipo mioepitelial (células abluminais, externas, e em contato com estroma tumoral), nos



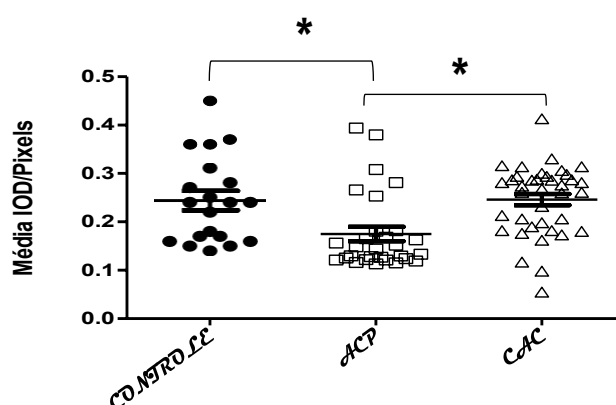
diferentes arranjos arquiteturais do tumor, prevalecendo intensidades fraca e moderada (Figura 16).



**Figura 16** – Imunomarcacão de H3K9ac nos tumores. Para o Adenocarcinoma Polimorfo e Carcinoma Adenoide Cístico, a positividade variou com prevalência das marcações leves (A e E) e moderadas (C e G). Em (A), (C), (E) e (G) os cortes ensaiados para imuno-histoquímica com hematoxilina de Harris; em (B), (D), (F) e (H) aspecto após deconvolução da imagem, mostrando apenas os núcleos marcados. (Método da estreptavidina-Biotina/Hematoxilina de Harris, aumento original: 200x).

Na avaliação da imunomarcção para H3K9ac em ACP, percebeu-se uma variação para valores de IOD, compreendendo de 0,113 a 0,394, com uma intensidade média de 0,144 ( $\pm 0,08$ ). A imunomarcção para os casos de CAC seguiu a mesma tendência, com um espectro de IOD variando de 0,055 a 0,413, com média de 0,27 ( $\pm 0,07$ ). Diferenças significativas foram observadas entre os valores para as amostras de ACP e controle, e entre ACP e CAC ( $p = 0,0001$ ) (Figura 17).

Baseado nos valores mínimos e máximos de IOD para o Grupo Controle constatou-se que nenhum dos casos de ACP mostrou valores de IOD que poderiam ser relacionados à baixa expressão de acetilação. Para os CAC, 5,2% das amostras (2/38 casos) mostraram redução de H3K9ac. Nenhum dos valores de IOD estava além do limite máximo encontrados para as amostras controle.

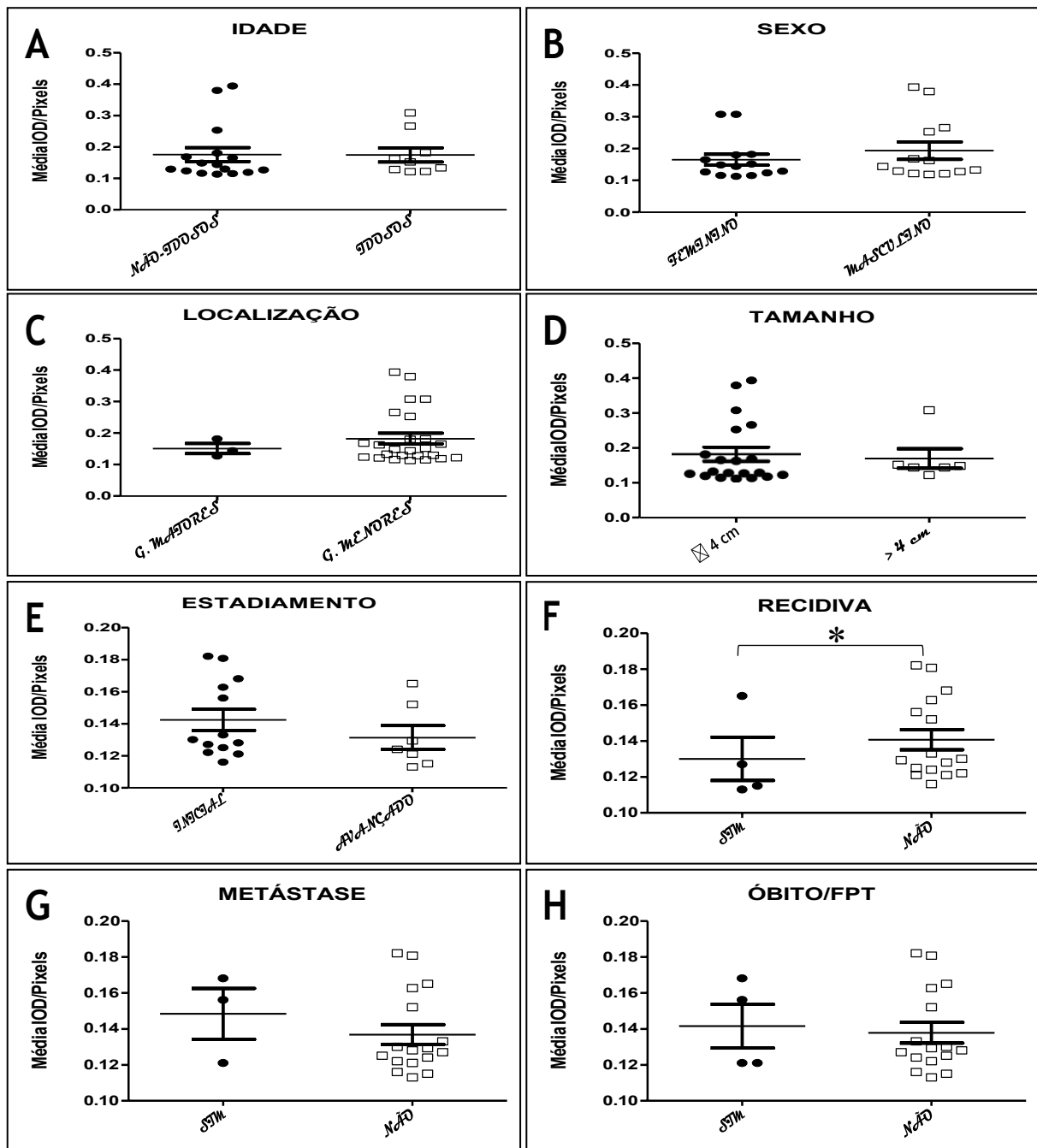


**Figura 17** – Distribuição dos valores de IOD para as amostras do grupo controle, Adenocarcinoma Polimorfo (ACP) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) referentes a imunomarcção para H3K9ac. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e CAC. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os valores de IOD de ACP para o grupo controle e entre ACP para os do CAC (\*). (Teste de Kruskal-Wallis:  $p = 0,0001$ ; pós-teste:  $p < 0,05$ ).

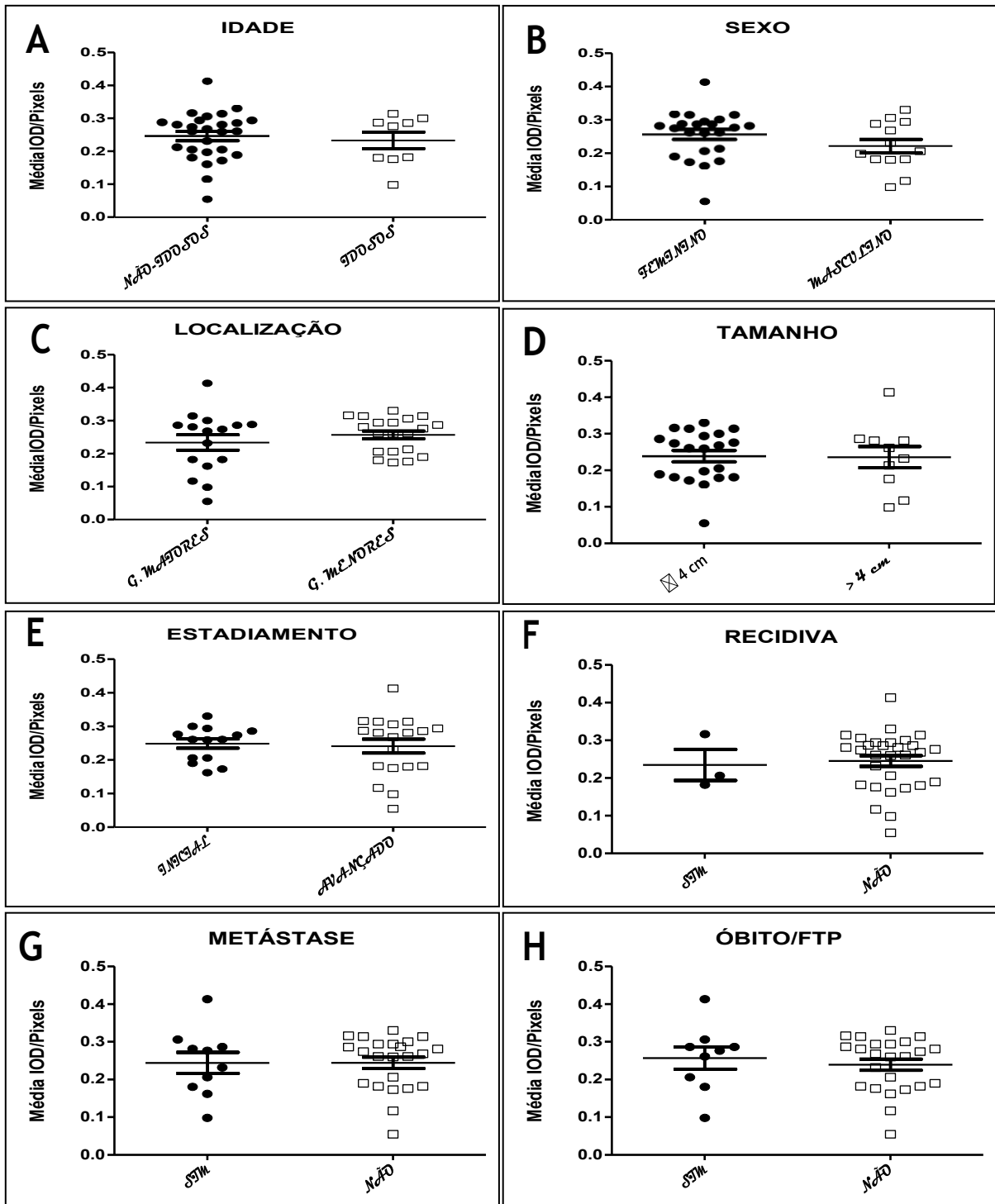
Ao analisar os valores de IOD para os grupos de variáveis clinicopatológicas estratificadas (ver “Análise dos dados”), observou que os valores para casos no sexo masculino; idosos, doença inicial, casos não recidivantes, metastáticos e de óbito/FPT foram maiores que o seu correspondente nos casos de ACP (Figura 18). A única variável que demonstrou diferença estatística significativa foi recidiva (Teste  $t$  de Student,  $p = 0,02$ ).

Análise semelhante conduzida para os casos de CAC evidenciou valores mais altos para as variáveis sexo feminino, não-idosos, doença avançada, casos não recidivantes e não

metastáticos, e de óbito em relação ao seu par correspondente (Figura 19). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores para as variáveis estudadas.



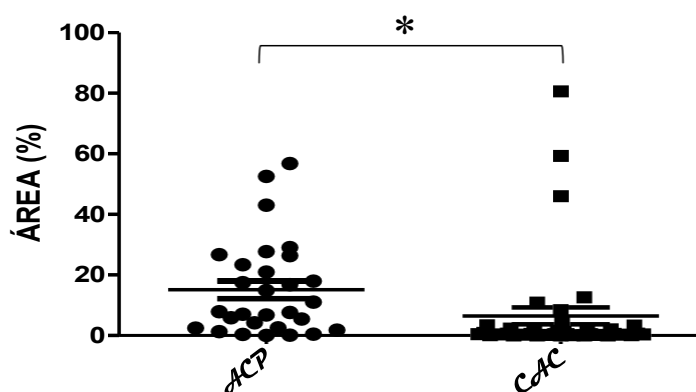
**Figura 18** – Comparação dos valores de IOD de H3K9ac observados nos casos de Adenocarcinoma Polimorfo para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas. (A) Idade (teste *t U* de Mann-Whitney,  $p = 0,552$ ); (B) Sexo (teste *t U* de Mann-Whitney,  $p = 0,520$ ); (C) Localização (teste *t U* de Mann-Whitney,  $p = 1,0$ ); (D) Tamanho (teste *t U* de Mann-Whitney,  $p = 0,715$ ); (E) Estadiamento (teste *t* de Student,  $p = 0,087$ ); (F) Recidiva (teste *t* de Student,  $p = 0,020$ ); (G) Metástase (teste *t* de Student,  $p = 0,847$ ); (H) Óbito/FPT (teste *t* de Student,  $p = 0,865$ ).



**Figura 19** – Comparação dos valores de IOD de H3K9ac observados nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas. (A) Idade (teste *t* de Student,  $p = 0,744$ ); (B) Sexo (teste *t* de Student,  $p = 0,555$ ); (C) Localização (teste *t* de Student,  $p = 0,61$ ); (D) Tamanho (teste *t* de Student,  $p = 0,773$ ); (E) Estadiamento (teste *t* de Student,  $p = 0,185$ ); (F) Recidiva (teste *t* de Student,  $p = 0,318$ ); (G) Metástase (teste *t* de Student,  $p = 0,301$ ); (H) Óbito/FTP (teste *t* de Student,  $p = 0,180$ ).



Utilizando-se o *cut-off* mínimo (IOD: 0,10) foi possível avaliar a percentagem de área hipoacetilada marcada. A área hipoacetilada no ACP variou entre 0,016 a 56,8%, com mediana de 7,85% ( $\pm 15,5$ ). As amostras de CAC apresentaram valores entre 0,02 a 80,65%, mediana de 0,53 ( $\pm 17,2$ ). Nessa análise, observou-se uma diferença estatística significativa, na qual se encontra uma maior percentagem de área hipoacetilada marcada no ACP (Figura 20).

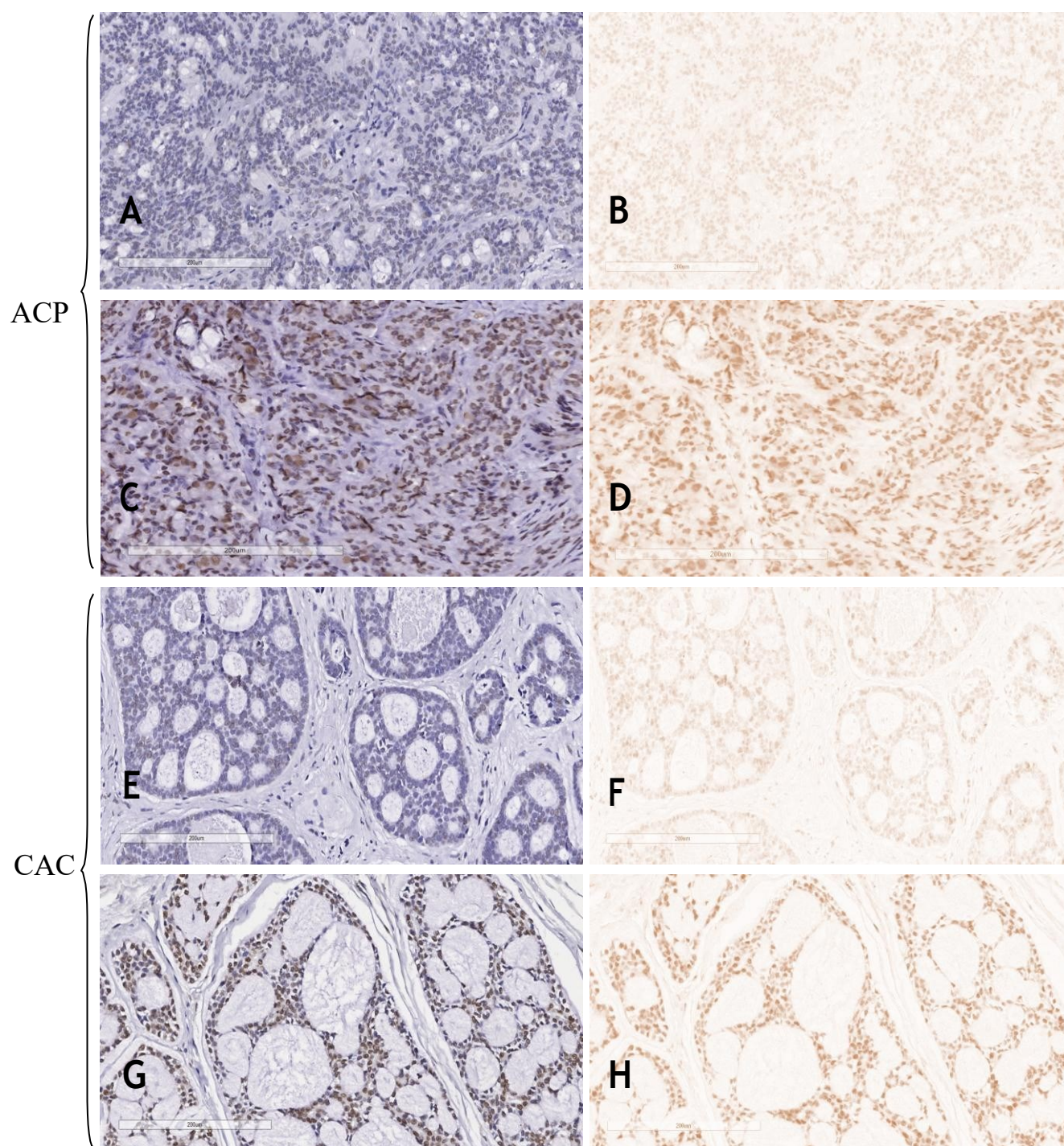


**Figura 20** – Valores de área (%) hipoacetilada marcada para H3K9ac. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras de ACP e CAC (\*). (Teste *t U* de Mann-Whitney,  $p = 0,0001$ ).

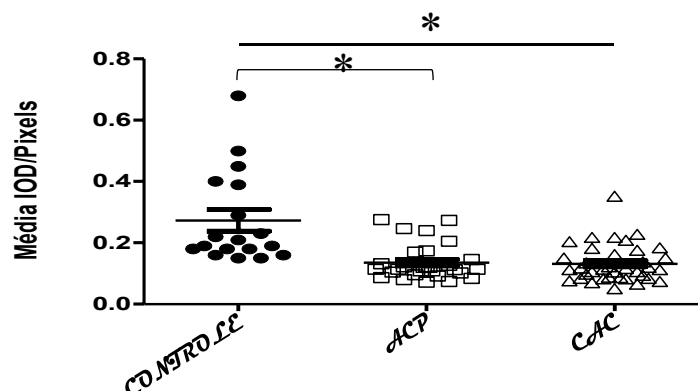
### 6.2.3 H4K12ac em amostras tumorais

As reações para H4K12ac apresentaram marcação de fraca a moderada (Figura 21). Assim, foi observada ampla variação para valores de IOD no ACP, compreendendo o intervalo de 0,072 a 0,276, com uma intensidade média de 0,114 ( $\pm 0,06$ ). A mesma tendência foi observada para imunomarcação nos casos de CAC, com um espectro de IOD variando de 0,05 a 0,352, com média de 0,115 ( $\pm 0,06$ ). Diferenças significativas foram observadas entre os valores de ambas as amostras tumorais para o controle (Figura 22).

Baseado nos valores mínimos e máximos de IOD para o Grupo Controle identificamos que 24% (7/29) das amostras de ACP mostraram valores menores de IOD que poderiam ser relacionados à diminuição de expressão de H4K12ac, enquanto para os CAC este fenômeno ocorreu em 34% das amostras (13/38 casos). Nenhum dos valores de IOD estava além do limite máximo de IOD encontrados para as amostras controle.



**Figura 21** – Imunomarcacão de H4K12ac nos tumores. Para o Adenocarcinoma Polimorfo e Carcinoma Adenoide Cístico, a positividade variou com prevalência das marcações leves (A e E) e moderadas (C e G). Em (A), (C), (E) e (G) os cortes ensaiados para imuno-histoquímica com hematoxilina de Harris; em (B), (D), (F) e (H) aspecto após deconvolução da imagem, mostrando apenas os núcleos marcados. (Método da Estreptavidina-Biotina/Hematoxilina de Harris, aumento original: 200x).

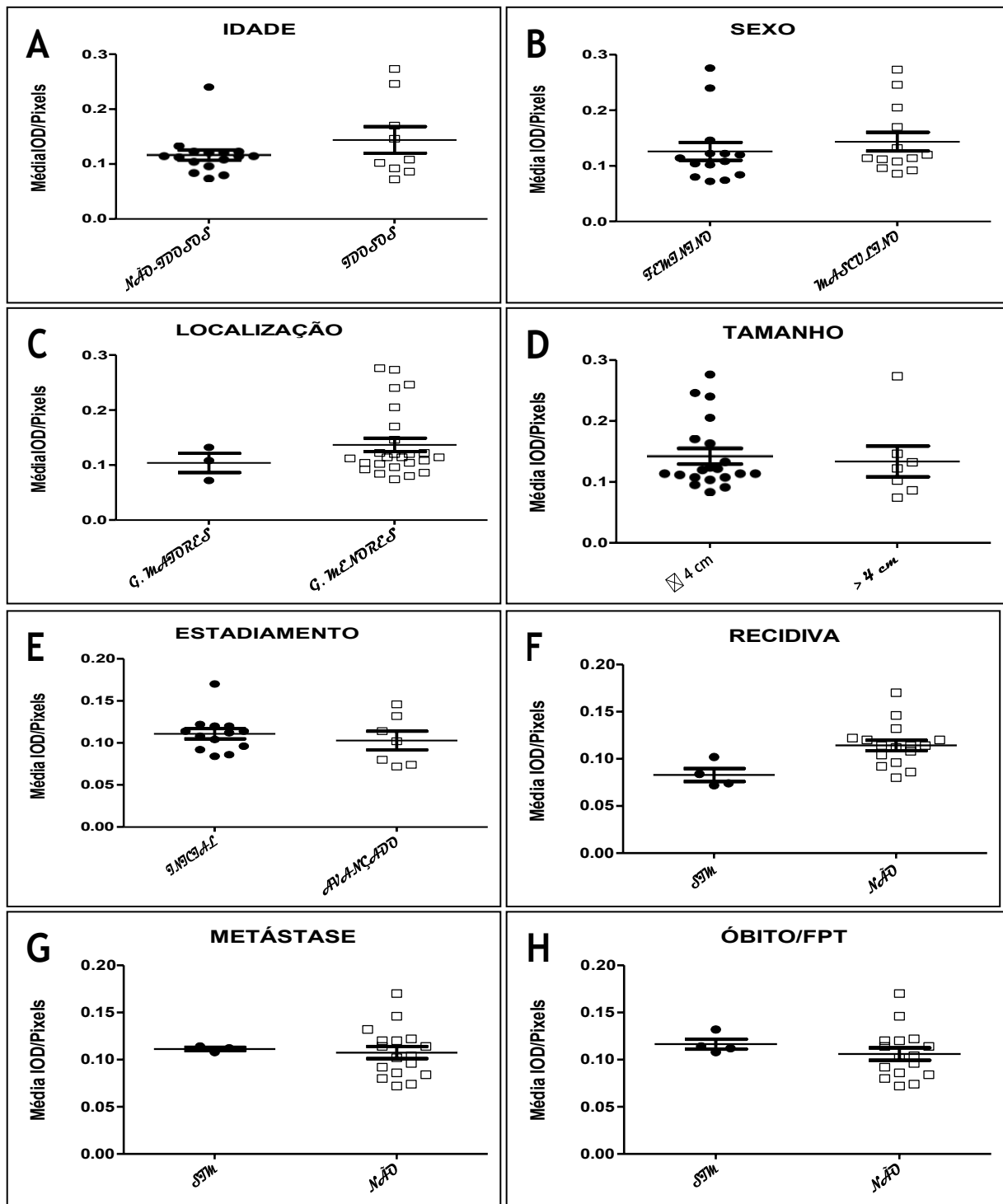


**Figura 22** – Distribuição dos valores de IOD para as amostras do grupo controle, Adenocarcinoma Polimorfo (ACP) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) referentes a imunomarcção para H4K12ac. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ACP e CAC. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os valores de IOD de ACP (\*) para o grupo controle e entre CAC para o controle (\*). Teste de Kruskal-Wallis:  $p < 0,0001$ ; pós-teste:  $p < 0,05$ .

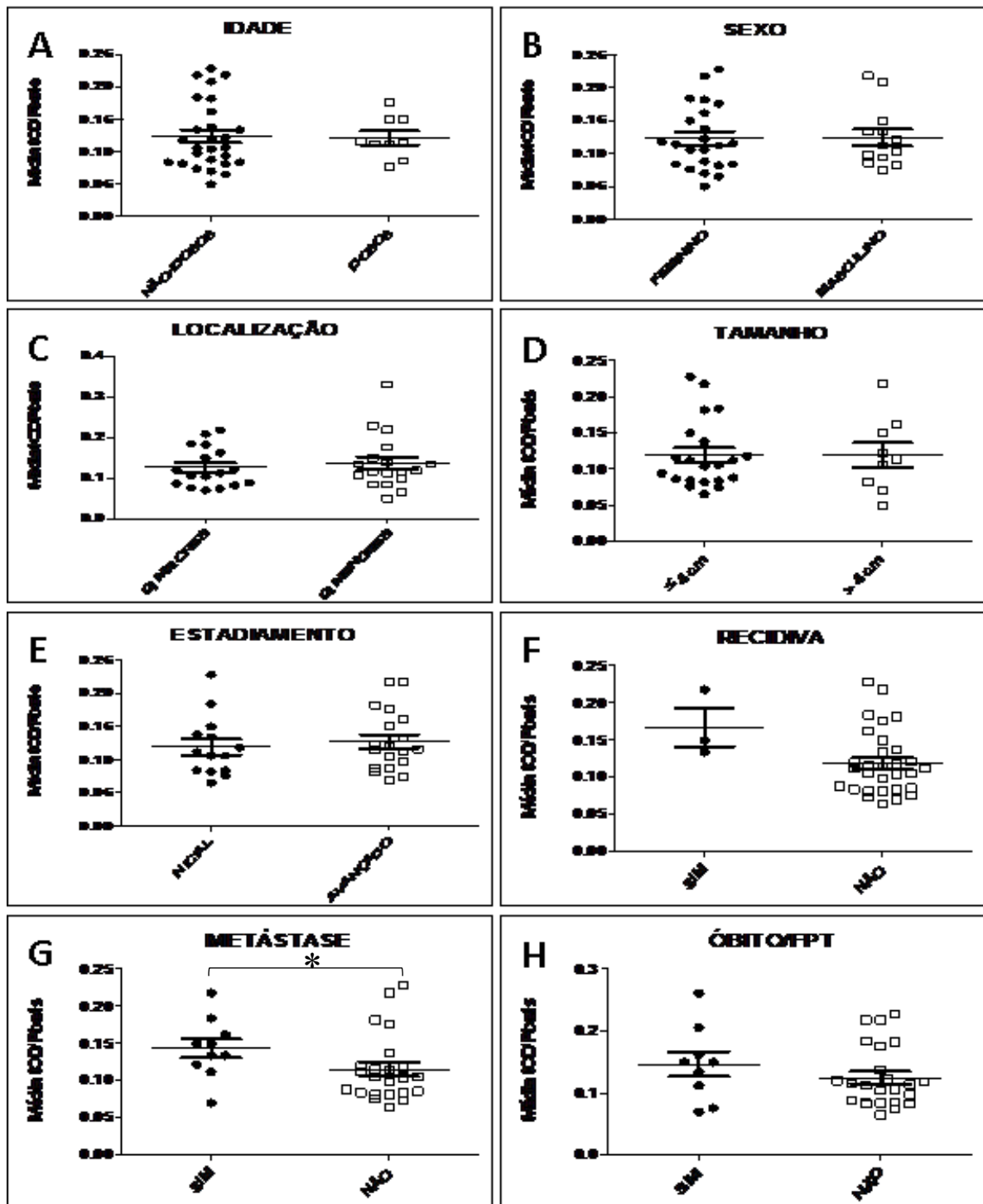
Ao analisar os valores de IOD para os grupos de variáveis clinicopatológicas estratificadas (ver “Análise dos dados”) em H4K12ac, observou-se que os valores para casos no sexo masculino; não-idosos, doença inicial, casos não recidivantes, metastáticos e de óbito foram maiores que o seu correspondente nos casos de ACP (Figura 23); embora não tenha havido diferença estatística significativa.

A análise semelhante conduzida para os casos de CAC evidenciou valores mais altos para as variáveis sexo masculino, não-idosos, doença avançada, casos recidivantes, metastáticos e de óbito em relação ao seu par correspondente (Figura 24). A única variável que apresentou diferença significativa foi metástase (teste  $t$  U de Mann-Whitney,  $p = 0,04$ ).

Na avaliação da percentagem de área hipoacetilada marcada, os valores de ACP variaram de 2,53 a 72%, com média de 34,3% ( $\pm 21,7$ ). As amostras de CAC apresentaram valores entre 1,97 a 91,7%, média de 40,5 ( $\pm 23,0$ ). Esse teste não apresentou diferença estatisticamente significativa (Figura 25).

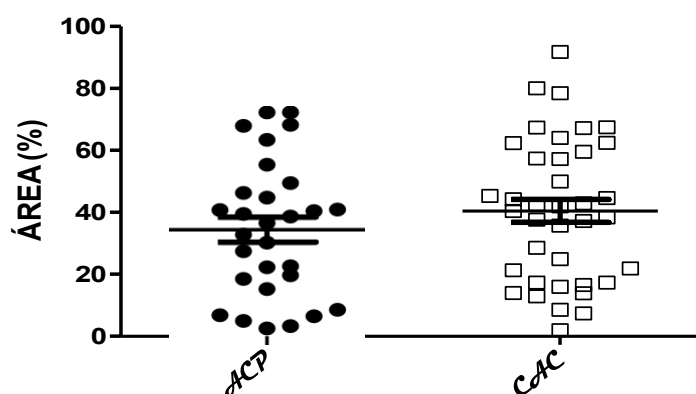


**Figura 23** – Comparação dos valores de IOD de H4K12ac observados nos casos de Adenocarcinoma Polimorfo para os diferentes estratos das variáveis clínicopatológicas analisadas. (A) Idade (teste  $t$  U de Mann-Whitney,  $p = 0,776$ ); (B) Sexo (teste  $t$  U de Mann-Whitney,  $p = 0,368$ ); (C) Localização (teste  $t$  U de Mann-Whitney,  $p = 0,48$ ); (D) Tamanho (teste  $t$  U de Mann-Whitney,  $p = 0,657$ ); (E) Estadiamento (teste  $t$  U de Mann-Whitney,  $p = 0,474$ ); (F) Recidiva (teste  $t$  de Student,  $p = 0,084$ ); (G) Metástase (teste  $t$  de Student,  $p = 0,673$ ); (H) Óbito/FPT (teste  $t$  de Student,  $p = 0,327$ ).



**Figura 24** – Comparação dos valores de IOD de H4K12ac observados nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico para os diferentes estratos das variáveis clinicopatológicas analisadas. (A) Idade (teste *t* de Student,  $p = 0,13$ ); (B) Sexo (teste *t* de Student,  $p = 0,42$ ); (C) Localização (teste *t* U de Mann-Whitney,  $p = 0,70$ ); (D) Tamanho (teste *t* de Student,  $p = 1,0$ ); (E) Estadiamento (teste *t* de Student,  $p = 0,37$ ); (F) Recidiva (teste *t* de Student,  $p = 0,43$ ); (G) Metástase (teste *t* U de Mann-Whitney,  $p = 0,04$ ); (H) Óbito/FPT (teste *t* de Student,  $p = 0,80$ ).

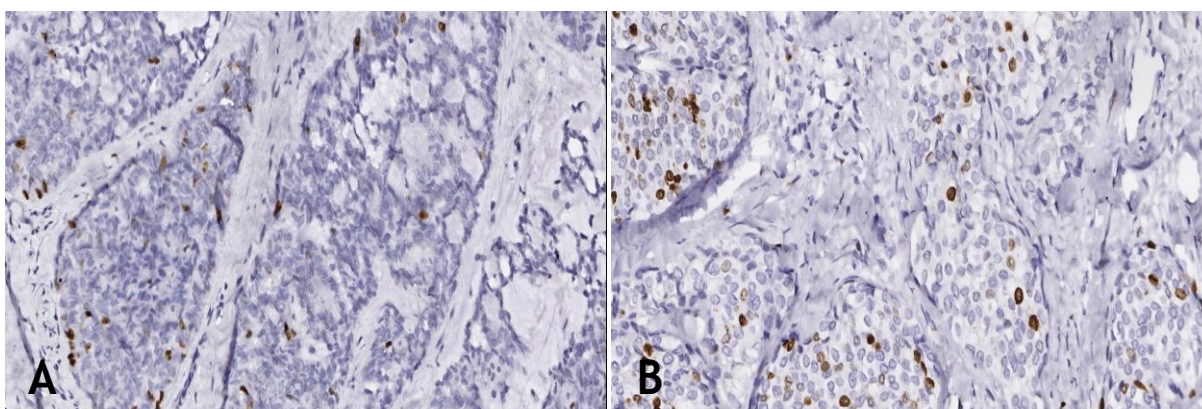




**Figura 25** – Valores de área (%) hipoacetilada marcada para H4K12ac. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras de ACP e CAC. (Teste *t* de Student,  $p = 0,276$ ).

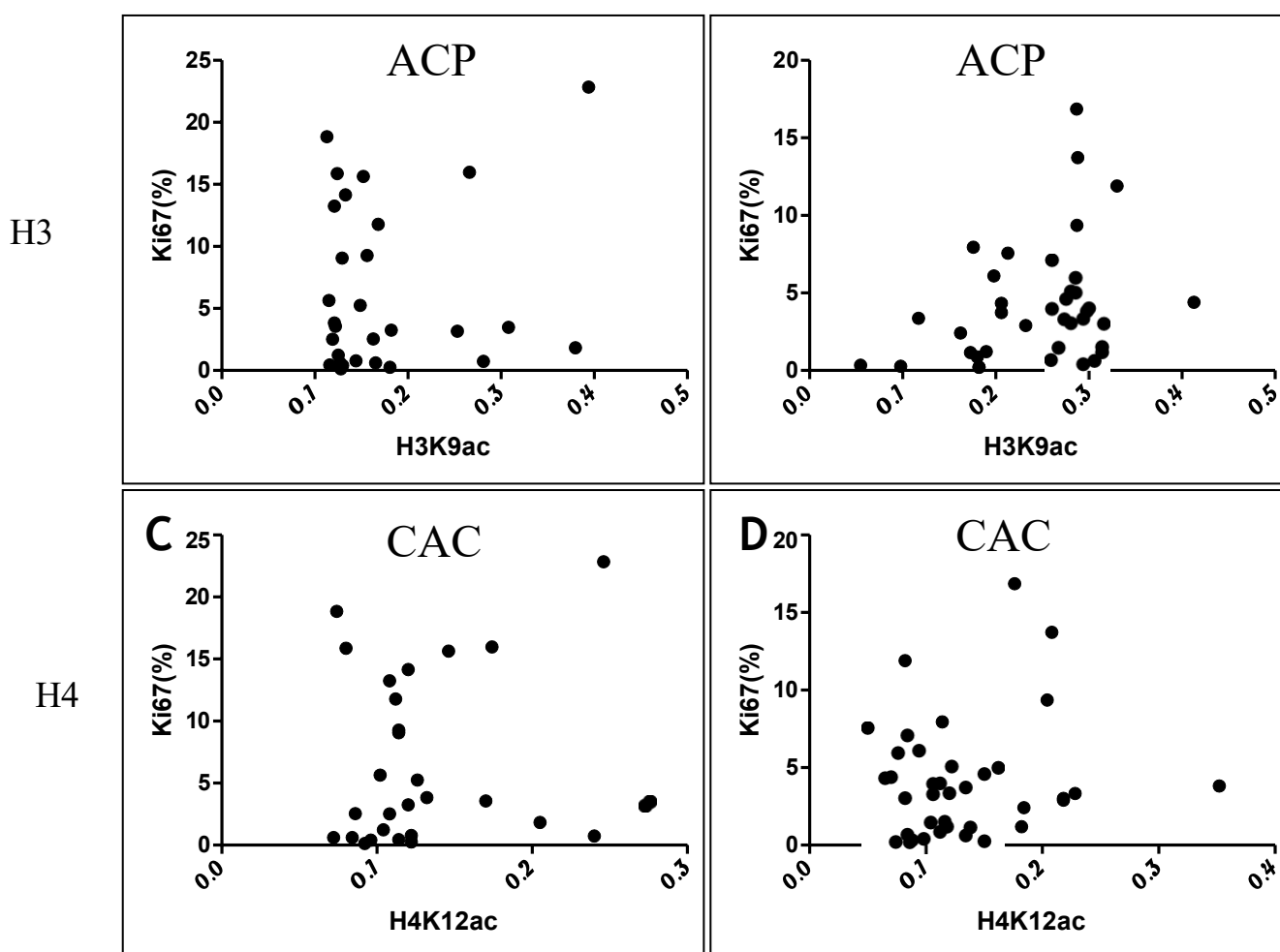
### 6.3 Proliferação celular e MPTHs

Os resultados referentes a atividade proliferativa, dada pela extensão da positividade a Ki67 (Figura 26), mostrou percentual médio 3,46% para ACP e 3,34% para CAC. Estes valores não foram estatisticamente diferentes.



**Figura 26** – Imunomarcção Ki67. Em (A) amostras de ACP marcadas com Ki67, e em (B) a mesma imunomarcção em CAC. (Método da estreptavidina-Biotina/Hematoxilina de Harris, aumento original: 200x).

A análise de correlação entre valores de IOD para H3K9ac e Ki67 mostrou-se fraca e inversa para os casos de ACP e CAC. Em ambas as situações não se mostraram estatisticamente significativas. A correlação também entre Ki67 e H4K12ac não apresentou diferenças estatísticas significantes, embora tenha havido uma correlação fraca, porém positiva (Figura 27).



**Figura 27** – Correlação entre valores de IOD das MPTHs (H3K9ac e H4K12ac) e a extensão da atividade proliferativa a partir de valores obtidos de imunopositividade para Ki67. Correlação entre Ki67 e H3K9ac nas amostras de ACP (A) ( $r = -0,011$ ,  $p = 0,951$ ) e CAC (B) ( $r = -0,019$ ,  $p = 0,057$ ). Correlação entre Ki67 e H4K12ac em ACP (C) ( $r = 0,155$ ,  $p = 0,421$ ) e CAC (D) ( $r = 0,027$ ,  $p = 0,868$ ). Teste de *Spearman*.

## 7. DISCUSSÃO

A epigenética tem ganhado grande importância na compreensão dos tumores e seu comportamento biológico, principalmente devido a reversibilidade inerente dessas alterações, ao contrário das mutações genéticas (BARTKE; BORGEL; DIMAGGIO, 2013). Uma das alterações epigenéticas são as modificações de histonas, às quais podem sofrer ação de diferentes enzimas levando a processos de metilação, fosforilação, ubiquitinação e acetilação, que desencadeiam o relaxamento da cromatina e a transcrição de genes, ou o contrário, a compactação da cromatina e a repressão gênica (PERRI; LONGO; GIULIANO, 2017). Dessa forma, participam de processos como transcrição, replicação e reparo do DNA, e têm sido encontrados nos mais diversos tipos tumorais, como: fígado, pulmão, rim, colorretal, mama, próstata, pâncreas, estômago e esôfago (CHERVONA; COSTA, 2012). Embora haja alguns trabalhos sobre essas alterações nos tumores de glândulas salivares, estes ainda são bastante escassos, em especial no que se refere ao ACP.

A acetilação de certas histonas tem sido associada à ativação transcricional de genes, enquanto que a desacetilação pode silenciar genes supressores tumorais; e o desequilíbrio nesses processos em regiões promotoras contribuem para alterações nas expressões de diversos genes, contribuindo para a carcinogênese e progressão em diferentes tipos de câncer, tornando-se alvo de investigação intensa (JULIANO et al 2016). Levando em consideração essas informações, e com o objetivo de compreender melhor a participação das histonas no surgimento e progressão tumoral do ACP e CAC, avaliamos por imuno-histoquímica os padrões de expressão para H3K9ac e H4K12ac, comparando-os aos valores de imunorreatividade presente nos tecidos glandulares normais.

Ao avaliar a imunomarcagem dos tumores para H3K9ac, observou-se diferença estatística significativa entre ACP com os grupos controle e CAC, sugerindo que essa diminuição na expressão de H3K9ac no ACP pode contribuir para o surgimento deste tumor, e concorda com os baixos níveis também encontrados em câncer de esôfago e carcinomas de células renais, bem como diminuição de níveis de H3 em tumores de glândulas salivares (TZAO et al., 2009; MOSASHVILLI et al, 2010; KISHI, 2005). Também obtiveram o mesmo resultado o estudo em carcinoma oral de células escamosas (COCE), cuja análise de expressão de H3K9ac apresentou-se com valores abaixo dos encontrados no tecido normal da



mucosa oral. Além disso, foi observada no COCE concomitantemente, aumento da reatividade do Ki67 e da vimentina, este último marcador da transição epitélio-mesênquima (TEM) (WEBBER et al, 2017). Pacientes portadores de glioma que apresentaram uma diminuição da porcentagem de marcação nuclear para H3K9ac apresentaram uma menor sobrevida (LIU; CHENG; ZHANG, 2010).

O CAC não apresentou diferenças de reatividade em relação ao controle, demonstrando que a H3K9ac não é importante para o seu aparecimento, ao contrário do que tem sido evidenciado em outros tumores malignos, como os ependimários. Nesses tumores, a diminuição na expressão de H3K9ac está correlacionada com tumores mais recorrentes e proliferativos (EBRAHIMI et al, 2013). Trabalho de Xia et al. (2013) relatam que o aumento de H3K9ac foi compatível a uma melhor expectativa de vida. Em relação às estratificações dos grupos, os casos recidivantes em ACP apresentaram menor expressão quando comparado aos casos não recidivantes, demonstrando que essa diferença pode ser importante para o retorno da neoplasia. Para comparação entre a área hipoacetilada marcada, o ACP demonstrou ter um percentual maior, levantando-se a possibilidade que esse fato possa colaborar para a diferença no perfil de invasão e agressividade dos dois tumores.

Diferentemente do trabalho realizado por Moraes (2014), no qual não foram encontrados resultados relevantes para modificação de H4K12ac no câncer de tireoide, nossas análises para este mesmo marcador resultou em diferenças estatísticas significativas para o ACP e o CAC em relação ao controle, demonstrando que esta MPT de histona pode ser um marcador importante para esses tumores. Concordando com nosso estudo, baixa expressão de H4K12ac também foi encontrada em tumores de mama, queilite actínica, câncer colorretal e pancreático (ELSHEIKH et al., 2009; FREITAS FILHO, 2015; ASHKTORAB et al., 2009; MANUYAKORN et al., 2010).

Contudo, Juliano et al (2016) encontrou altos níveis de expressão tanto de H4K12ac e H3K9ac nos tumores pancreáticos. Paralelamente, essas modificações também foram relatadas em níveis mais elevados nos casos de tumores mais bem diferenciados.

Hiperacetilação H3K9 foi encontrada em adenomas pituitários em comparação com tecido normal correspondente. Esse aumento de acetilação segue juntamente à uma maior gravidade tumoral e proliferação celular, podendo ser considerado um marcador relevante neste tumor (EBRAHIMI; SCHITTENHELM; HONEGGER, 2011). Corroborando com este trabalho, Ribeiro (2017) encontrou expressão mais elevada de H3K12ac e H4k12 em tumores

odontogênicos malignos em comparação aos benignos. Assim como os autores anteriormente citados, S'antana (2014) encontrou um maior aumento de expressão de H3K9ac nos pacientes metastáticos, e esses níveis aumentados se associaram a recidiva e metástase.

Diferença importante na avaliação dos grupos para H4K12ac foi encontrada nos casos de metástase em CAC, na qual os pacientes metastáticos apresentaram valores de IOD maiores que os não-metastáticos. Em relação a avaliação do percentual de área de redução da expressão, não houve diferença entre os tumores, podendo estes dados nos sugerir que a menor expressão de H4K12ac é importante para o surgimento tumoral, mas não para a progressão, uma vez que o ACP e o CAC possuem um padrão de invasão e agressividade diferentes.

Devemos levar em consideração que as modificações encontradas em nosso estudo para H3K9ac e H4K12ac podem ter surgido do desequilíbrio entre as enzimas HATs e HDACs, responsáveis por adicionar e remover o grupo acetil dos resíduos de lisina, alterando o acesso à cromatina, e consequentemente favorecendo ou reprimindo a transcrição de diversos genes. Devido a estas possíveis causas, é de suma importância o estudo das HATs e HDACs nesses tumores, com o objetivo de verificar a possibilidade de essas enzimas contribuírem para o surgimento e progressão do ACP e CAC.

Embora estudo realizado em tumores benignos e malignos de glândulas salivares tenham demonstrado que a imunomarcação de Ki67 é inversamente proporcional a de H3K9ac, nossas análises não encontraram correlação entre os marcadores H3K9ac e H4K12ac com a proliferação celular, sugerindo que nesses tumores, ambas modificações de histonas não estão diretamente relacionadas a esse fenômeno (WAGNER et al; 2017).

Devemos ressaltar que ainda existem dificuldades e limitações inerentes na avaliação e interpretação dos resultados das MPTs. Levando isso em consideração, tentamos buscar uma análise que pudesse ser mais objetiva através da utilização do software *ImageJ*, embora saibamos que como outros métodos ele possa ter características que sejam limitadoras. Além disso, foi fundamental conhecermos o perfil de expressão de H3K9ac e H4K12ac no tecido glandular normal e estabelecermos valores considerados como constitutivos, e a partir disso avaliar a expressão das MPTs nos tumores. Em nosso trabalho também buscamos observar áreas de reduzida expressão de acetilação, uma vez que este achado tem sido associado a um papel importante no surgimento e prognóstico de diversos tumores. Técnicas quantitativas,

como *Western Blotting*, podem ser utilizadas paralelamente ao método de imunohistoquímica, no sentido de tornar os dados obtidos mais densos.

Uma vez que a acetilação está relacionada à transcrição de genes, a diminuição de sua expressão pode levar ao silenciamento de genes supressores de tumor e àqueles responsáveis pelo reparo do DNA, enquanto que altos níveis de sua expressão poderiam levar a transcrição de oncogenes. Em resumo, embora os dados obtidos nesse estudo sejam relevantes, é imprescindível que novos trabalhos sejam desenvolvidos buscando cada vez mais uma melhor compreensão da participação das modificações pós-traducionais de histonas na biologia tumoral do ACP e CAC, uma vez que elas, ao contrário das alterações genéticas, podem ser revertidas e utilizadas para o desenvolvimento de novas terapias que consigam melhores resultados.

## 8. CONCLUSÃO

1. As modificações pós traducionais de histonas acetiladas H3K9ac e H4K12ac foram identificadas nas células glandulares ductais e acinares do adenocarcinoma polimorfo e carcinoma adenoide cístico de glândulas salivares.

2. Considerando os valores médios de IOD para as modificações de histonas testadas, foi possível verificar que predominou baixa expressão de H3K9ac no ACP, comparativamente ao CAC e ao parênquima das glândulas salivares. Este achado foi corroborado pela área maior de valores correspondentes a redução da expressão da acetilação. Esses achados nos sugerem a acetilação H3K9 contribui para o surgimento do ACP, podendo vir a ser um importante marcador diagnóstico para diferencia-lo do CAC.

3. Para ambos os grupos tumorais, houve uma tendência para redução de expressão de H4K12ac, comparativamente aos controles, não havendo diferenças entre os grupos tumorais. Esses resultados nos permitem perceber, que essa modificação está relacionada à carcinogênese dos tumores estudados.

4. Não observamos nenhuma correlação significativa entre os níveis de H3K9ac e H4K12ac e proliferação celular, sugerindo que no ACP e CAC, essas modificações não estão relacionadas a este fenômeno.

5. Níveis de IOD para H3K9ac foram relacionados a recidivas no ACP, enquanto que para H4K12ac diferenças estatísticas significativas foram observadas em relação à metástase no CAC. Os resultados apontam que as modificações pós traducionais de histonas estão envolvidas na tumorigênese do ACP e CAC.

## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Tradução de Ana Letícia de Souza Vanz et al. 5 ed. Porto Alegre, RS, Artmed Editora, 2010, 1268p.

ANDISHEH-TADBIR, A. et al. MTA1 Expression in benign and malignant salivary gland tumors. **Iranian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 28, n. 84, p. 51-59, 2016.

ANIELLO, F. et al. Expression of four histone lysine-methyltransferases in parotid gland tumors. **Anticancer Research**, v. 26, n. 3A, p. 2063-2067, 2006.

ARAUJO V.C. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: An analysis of epidemiological studies and hints for pathologists. **Diagnostic Pathology**, v. 8, p. 6, 2013. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-8-6>

ARAUJO V.C. et al. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. **Oral Oncology**. v. 35, p. 164–172, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1368-8375\(98\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S1368-8375(98)00102-X)

ASHKTORAB, H. et al. Global histone H4 acetylation and HDAC2 expression in colon adenoma and carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, n. 10, p. 2109, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0601-7>

BANERJEE, T.; CHAKRAVARTI, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 24, p. 4858-4873, 2011. <https://doi.org/10.1128/MCB.05631-11>

BARTKE, T.; BORDEL, J.; DIMAGGIO, P.A. Proteomics in epigenetics: new perspectives for cancer research. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 3, p. 205-218, 2013. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt002>

BATSAKIS, J.G. et al. Adenocarcinoma of the oral cavity: A clinicopathologic study of terminal duct carcinomas. **Journal of Laryngology and Otology**.v. 97, p. 825–835, 1983. <https://doi.org/10.1017/S0022215100095062>

BAYAT, S. et al. HDACis (class I), cancer stem cell, and phytochemicals: Cancer therapy and prevention implications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1445-1453, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.065>

BISWAS, S.; RAO, C. Epigenetics in cancer: Fundamentals and beyond. **Pharmacology & Therapeutics**, v.173, p.118-134, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>

CASTLE, J.T. et al. Polymorphous low grade adenocarcinoma: A clinicopathologic study of 164 cases. **Cancer**, v. 86, p. 207–219, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990715\)86:2<207::AID-CNCR4>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990715)86:2<207::AID-CNCR4>3.0.CO;2-Q)

CHATURA, K. R. Polymorphous low grade adenocarcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 19, n. 1, p. 77-82, 2015. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.157206>

CHERVONA, Y.; COSTA, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? **Nature**, v. 403, p. 41-45, 2012.

CHOE, M. K. et al. Functional elements demarcated by histone modifications in breast cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 418, n. 3, p. 475-482, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.042>

COCA-PELAZ, A. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—an update. **Oral Oncology**, v. 51, n. 7, p. 652-661, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.04.005>

COHEN, I. et al. Histone modifiers in cancer: friends or foes? **Genes & Cancer**, v.2, n. 6, p. 631-647, 2011. <https://doi.org/10.1177/1947601911417176>

COLE, A.J.; CLIFTON-BLIGH, R.; MARSH, D.J. Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy. **Endocrine-related Cancer**, v. 22, n. 1, p. T19-T33, 2015. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0185>

COOPER G.M.; HAUSMAN R.E. **The cell: a molecular approach**. 6<sup>a</sup> Ed, Sinauer Associates Inc Publishers, Sunderland, MA, USA, 2013, 832 p.

DAS, D.; SAHA, S.; SATYANARAYANA, V. Histopathologic spectrum of salivary gland neoplasms. **International Journal of Healthcare and Biomedical Research**, v. 4, n. 2, p. 48-55, 2016.

DAI, Wei et al. Ubiquitin-specific peptidase 22, a histone deubiquitinating enzyme, is a novel poor prognostic factor for salivary adenoid cystic carcinoma. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2014.

DAVIS, C.D.; ROSS, S.A. Dietary components impact histone modifications and cancer risk. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 2, p. 88-94, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00285.x>

DAWSON, M.A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, v. 150, n. 1, p. 12-27, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>

DE ARRUDA, Maria de Lourdes Silva et al. Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau: relato de um caso adicional e uma atualização das principais aspectos sobre os seus diagnósticos. **Rev Odontol UNESP**, v.39, n.5, p.311-315, 2010.

DILLON, P.M. et al. Adenoid cystic carcinoma: a review of recent advances, molecular targets, and clinical trials. **Head & Neck**, v. 38, n. 4, p. 620-627, 2016. <https://doi.org/10.1002/hed.23925>

EBRAHIMI, A. et al. Prognostic relevance of global histone 3 lysine 9 acetylation in ependymal tumors. **Journal of Neurosurgery**, v. 119, n. 6, p. 1424-1431, 2013. <https://doi.org/10.3171/2013.9.JNS13511>

EL-NAGDY, S.; SALAMA, N.; MOURAD, M. Immunohistochemical clue for the histological overlap of salivary adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. **Interventional Medicine and Applied Science**, v. 5, n. 3, p. 131-139, 2013. <https://doi.org/10.1556/IMAS.5.2013.3.6>

EL-NAGGAR, A. K. et al. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4<sup>th</sup> Edition, V. 9, Lyon, France: IARC, 2017.

ELHAKIM, Mohammad Talal et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a Danish national study. **Oral Oncology**, v. 55, p. 6-10, 2016.

ELSHEIKH, S.E. et al. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. **Cancer Research**, v. 69, n. 9, p. 3802-3809, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3907>

EVANS H.L.; BATSAKIS, J.G. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands. A study of 14 cases of a distinctive neoplasm. **Cancer**, v. 53, p. 935-942, 1984. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19840215\)53:4<935::AID-CNCR2820530420>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19840215)53:4<935::AID-CNCR2820530420>3.0.CO;2-V)

EVESON, J.W. Salivary tumours. **Periodontology** 2000, v. 57, n. 1, p. 150-159, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00385.x>

FINNERTY, B.M. et al. Epigenetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: A clinicopathologic perspective. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 9, n. 9, p. 341-353, 2017. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v9.i9.341>

FONSECA I. et al. Polymorphous adenocarcinoma. In: EL-NAGGAR, A. K. et al. **WHO classification of head and neck tumours**. 4<sup>th</sup> Edition, v. 9, Lyon, France: IARC, 2017, p. 167-168.

FREITAS FILHO, S. A. J. **Avaliação das modificações de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph em queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio**. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2015).

FREEDMAN, P.D.; LUMERMAN, H. Lobular carcinoma of intraoral minor salivary glands origin. Report of twelve cases. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 56, p. 157-166, 1983.

FÜLLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications. **Oncogene**, v. 30, n. 31, p. 3391-3403, 2011. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.121>

GIL, J.; RAMÍREZ-TORRES, A.; ENCARNACIÓN-GUEVARA, S. Lysine acetylation and cancer: A proteomics perspective. **Journal of Proteomics**, v. 150, p. 297-309, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.003>

HAN, M-J.; KOC, E.C.; KOC, H. Post-translational modification and mitochondrial relocalization of histone H3 during apoptosis induced by staurosporine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 802-807, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.050>

HEALEY, M.A. et al. Association of H3K9me3 and H3K27me3 repressive histone marks with breast cancer subtypes in the Nurses' Health Study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 147, n. 3, p. 639-651, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10549-014-3089-1>

HELIN, K.; DHANAK, D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 480-488, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12751>

HUANG, M. et al. Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, n. 6, p. 435-439, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0901-5027\(97\)80008-2](https://doi.org/10.1016/S0901-5027(97)80008-2)

HOSEOK, I. et al. Association of global levels of histone modifications with recurrence-free survival in stage IIB and III esophageal squamous cell carcinomas. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 19, n. 2, p. 566-573, 2010. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0980>

ISRAEL, Y. et al. Diagnostic and therapeutic modalities for 287 malignant and benign salivary tumors: A cohort study. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 4, p. 585-588, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.01.017>

JAIN, A.K.; BARTON, M.C. Bromodomain Histone Readers and Cancer. **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 13, p. 2003-2010, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.020>

JASO, J.; MALHOTRA, R. Adenoid cystic carcinoma. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, n. 4, p. 511-515, 2011.

JE, H.U. et al. A 10-year clinical outcome of radiotherapy as an adjuvant or definitive treatment for primary tracheal adenoid cystic carcinoma. **Radiation Oncology**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13014-017-0933-6>

JENSEN, E.C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. **The Anatomical Record**, v. 296, n. 3, p. 378-381, 2013. <https://doi.org/10.1002/ar.22641>

JENUWEIN, T.; ALLIS, C.D. Translating the histone code. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1074-1080, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>



JULIANO, C.N. et al. H4K12 and H3K18 acetylation associates with poor prognosis in pancreatic cancer. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 24, n. 5, p. 337-344, 2016. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000194>

KELLY, A.D.; ISSA, J-P.J. The promise of epigenetic therapy: reprogramming the cancer epigenome. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 42, p. 68-77, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.03.015>

KHAN, S.A.; REDDY, D.; GUPTA, S. Global histone post-translational modifications and cancer: Biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment? **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 333-345, 2015. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.333>

KIMPLE, A.J. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: A case series and determination of recurrence. **The Laryngoscope**, v. 124, n. 12, p. 2714-2719, 2014. <https://doi.org/10.1002/lary.24788>

KISHI, M. et al. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. **Oral Oncology**, v. 41, n. 2, p. 161-169, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.08.004>

KRISHNAMURTHY, A.; VAIDHYANATHAN, A.; MAJHI, U. Polymorphous low grade adenocarcinoma of the parotid gland. **Journal of Cancer Research and Therapy**, 2011; v. 7, n. 1, p. 84-87. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.80464>

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

LAGHA, A. et al. Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. **Head & Neck Oncology**, v. 4, n. 1, p. 4-19, 2012. <https://doi.org/10.1186/1758-3284-4-19>

LARSEN, S.R. et al. Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 41, n. 8, p. 598-602, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2012.01148.x>

LEE, J.Y.; LEE, T-H. Effects of DNA methylation on the structure of nucleosomes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 1, p. 173-175, 2011. <https://doi.org/10.1021/ja210273w>

LI, F. et al. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$ . **Cell**, v. 153, n. 3, p. 590-600, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.025>

LI, G-M. Decoding the histone code: role of H3K36me3 in mismatch repair and implications for cancer susceptibility and therapy. **Cancer Research**, v. 73, n. 21, p. 6379-6383, 2013. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1870>

LIU, Bo-lin et al. Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, p. 1055-9965. EPI-10-0454, 2010.

LIU, N. et al. Acetylation and deacetylation in cancer stem-like cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 51, p. 89315-89325, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19167>

LLORETA, J. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma arising in the nasal cavities with an associated undifferentiated carcinoma. **Ultrastructural Pathology**, v. 19, n. 5, p. 635-70, 1995. <https://doi.org/10.3109/01913129509021908>

LOYOLA, A.M. et al. Minor salivary gland tumors. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. **Oral Oncology**, v. 31, n. 3, p. 197-201, 1995.

LUNA, M.A.; WENIG, B.M. Polymorphous low-grade adenocarcinoma. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (Eds.): **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press; p. 167-168, 2005.

LUND, A.H.; VAN LOHUIZEN, M. Epigenetics and cancer. **Genes and Development**, v. 18, n. 19, p. 2315-2335, 2004. <https://doi.org/10.1101/gad.1232504>

MANUYAKORN, A. et al. Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: results from RTOG 9704. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 8, p. 1358-1365, 2010. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.5639>

MEI, L. et al. Phospho-histone H2AX is a diagnostic and prognostic marker for epithelial ovarian cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 5, p. 5597, 2015.

MILLER, R.T. et al. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 7, n. 1, p. 63-65, 1999. <https://doi.org/10.1097/00022744-199903000-00013>

MITANI, Y. et al. Histone H3 acetylation is associated with reduced p21WAF1/CIP1 expression by gastric carcinoma. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 1, p. 65-73, 2005. <https://doi.org/10.1002/path.1684>

MORADIAN, A. et al. The top-down, middle-down, and bottom-up mass spectrometry approaches for characterization of histone variants and their post-translational modifications. **Proteomics**, v. 14, n. 4-5, p. 489-497, 2014. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300256>

MORAES, S. de. **Estudo das histonas H4K12ac e H3K36me3 em neoplasias da tireoide: comparação entre tipos histopatológicos e comportamento metastático**. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014).

MOSASHVILLI, D. et al. Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. **Cancer Science**, v. 101, n. 12, p. 2664-2669, 2010.

MÜLLER-TIDOW, C. et al. Profiling of histone H3 lysine 9 trimethylation levels predicts transcription factor activity and survival in acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 116, n. 18, p. 3564-3571, 2010. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-240978>

NAMBOODIRIPAD, P.C.A. A review: Immunological markers for malignant salivary gland tumors. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 4, n. 2, p. 127-134, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2014.05.003>

OLUSANYA, A. A. et al. Polymorphous low grade adenocarcinoma: Literature review and report of lower lip lesion with suspected lung metastasis. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 10, n. 1, p. 60-63, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12663-011-0185-1>

PALERI, V.; ROBINSON, M.; BRADLEY, P. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the head and neck. **Current Opinion in Otolaryngology and Head and Neck Surgery**, 16:163–169, 2008. <https://doi.org/10.1097/MOO.0b013e3282f70441>

PARK, Y.S. et al. The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 15, n. 7, p. 1968-1976, 2008. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-9927-9>

PATEL, T.D. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the head and neck: A population- based study of 460 cases. **The Laryngoscope**, v. 125, n. 7, p. 1644-1649, 2015. <https://doi.org/10.1002/lary.25266>

PELKEY, T.J.; MILLS, S. Histologic transformation of polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary gland. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 111, p. 785-791, 1999. <https://doi.org/10.1093/ajcp/111.6.785>

PEREIRA, J. M. **Estudo imuno-histoquímico da fosfo-histona-3 (serina 10) em neoplasias de tireoide**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015).

PEREZ-ORDONEZ, B.; LINKOV, I.; HUVOS, A.G. Retrospective study and review of polymorphous low-grade adenocarcinoma. **Histopathology**, v. 32, p. 521-29, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.1998.t01-2-00410.x>

PERRI, F. et al. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 111, p. 166-172, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.020>

PETERSON, C.L.; LANIEL, M-A. Histones and histone modifications. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. R546-R551, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007>

RIBEIRO, C. V. **Avaliação das modificações de histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph em tumores odontogênicos com diferenciação ameloblástica**. 2017. 148 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, 2017).

ROSSETTO, D.; AVVAKUMOV, N.; CÔTÉ, J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. **Epigenetics**, v. 7, n. 10, p. 1098-1108, 2012. <https://doi.org/10.4161/epi.21975>

ROTH, G.S. et al. Lysine methylation signaling in pancreatic cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 30, n. 1, p. 30-37, 2018. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000421>

SANT'ANA, J.M. de A. **Expressão global de histonas ativadoras e repressoras da atividade transcricional de genes em uma amostra de carcinoma epidermoide de cavidade bucal metastático e não metastático e a associação delas com variáveis clinicopatológicas de importância diagnóstica**. 2014. 82f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2014).

SANTIAGO, G.S. et al. Factores pronósticos en el carcinoma adenoide quístico de glándulas salivares. **Acta Otorrinolaringológica Española**, v. 56, n. 8, p. 361-367, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0001-6519\(05\)78630-1](https://doi.org/10.1016/S0001-6519(05)78630-1)

SIDOLI, S.; CHENG, L.; JENSEN, O.N. Proteomics in chromatin biology and epigenetics: Elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3419-3433, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.029>

SIMPSON, R.H.W. et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands with transformation to high-grade carcinoma. **Histopathology**, v. 41, n. 3, p. 250-259, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01439.x>

SKÁLOVÁ, A. et al. The Role of Molecular Testing in the Differential Diagnosis of Salivary Gland Carcinomas. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 42, n. 2, p. 11-27, 2017. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000980>

SOLANKI, G. Tumors of salivary glands. **International Journal of Pharmacological Research**, v. 1, n. 2, p. 56-60, 2011. <https://doi.org/10.7439/ijpr.v1i2.355>

SPEIGHT, P.M.; BARRETT, A.W. Prognostic factors in malignant tumours of the salivary glands. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 8, p. 587-593, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2009.03.017>

TAMAGAWA, H. et al. Global histone modification of H3K27 correlates with the outcomes in patients with metachronous liver metastasis of colorectal cancer. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 39, n. 6, p. 655-661, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2013.02.023>

TANG, B. et al. High USP22 expression indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 14, p. 12654-12667, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3705>

TZAO, C. et al. Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. **Modern Pathology**, v. 22, n. 2, p. 252-260, 2009. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.172>

TO, V.S.H. et al. Review of salivary gland neoplasms. **ISRN Otolaryngology**, v. 2012, p. 1-6, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/872982>

VAN WEERT, S. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period. **Oral Oncology**, v. 49, n. 8, p. 824-829, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.05.004>

XIA, R. et al. High expression of H3K9me3 is a strong predictor of poor survival in patients with salivary adenoid cystic carcinoma. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 137, n. 12, p. 1761-1769, 2013. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0704-OA>

XIA, R-H. et al. Low expression of endothelin receptor B (EDNRB) is related to H3K9me3 binding with the EDNRB promoter region and is associated with the clinical T tumor stage in salivary adenoid cystic carcinoma. **Oral surgery, Oral medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 2, p. 258-268, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.04.015>

WAGNER, V.P. et al. Reduced chromatin acetylation of malignant salivary gland tumors correlates with enhanced proliferation. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 46, p. 792-797, 2017. <https://doi.org/10.1111/jop.12557>

WEBBER, L.P. et al. Hypoacetylation of acetyl- histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathology**, v. 71, p. 278-286, 2017. <https://doi.org/10.1111/his.13218>

WISNIESKI, F. et al. CDKN1A histone acetylation and gene expression relationship in gastric adenocarcinomas. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 17, p. 1-9, 2015.

WYSOCKI, P.T. et al. Adenoid cystic carcinoma: emerging role of translocations and gene fusions. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 66239-66254, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11288>

YANG, X. J.; SETO, E. Y. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v. 26, p. 5310-5318, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210599>

YARBROUGH, W.G. et al. Clinical and molecular insights into adenoid cystic carcinoma: Neural crest-like stemness as a target. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 4, n. 1, p. 60-77, 2016. <https://doi.org/10.1002/liv.2.22>

ZHANG, C. et al. Histone acetylation: novel target for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0151-8>

ZHANG, Chun-Ye et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: clinicopathologic analysis of 218 cases in a Chinese population. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 115, n. 3, p. 368-375, 2013.

ZHANG, Y. et al. Elevated expression of USP22 in correlation with poor prognosis in patients with invasive breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 8, p. 1245-1253, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00432-011-0998-9>



## ANEXOS

### Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa



#### 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:

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 distintos 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

**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: 2.001.481

(leucoplasia, eritroplasia 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, eritroplasia 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 eletivos 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, eritroplasia 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, eritroplasia 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: 2.001.481

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 esta 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@propp.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 2016, 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)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 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: 2.001.481

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_HO.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

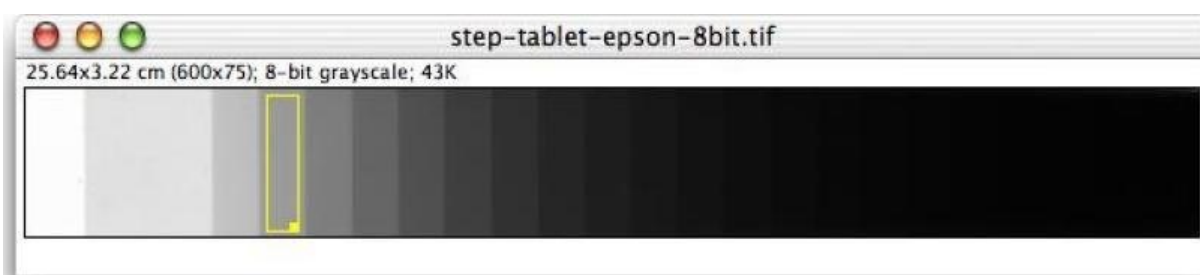
UBERLÂNDIA, 05 de Abril de 2017

---

Assinado por:  
**Sandra Terezinha de Farias Furtado**  
 (Coordenador)

## Anexo 2 – Calibração em níveis de cinza

Para que a escala fosse calibrada, estabeleceu-se primeiramente, a medida dos valores de cinza usando uma barra contendo 21 intervalos de densidades cromáticas (*steps*), representando uma variação de 0,05 a 3,05 (Figura 28). Para isto, mediram-se os primeiros 18 *steps* (os três últimos são indistinguíveis a olho nu; o *ImageJ* limita a leitura em 20 intervalos). Para medir os 18 *steps*, desenhou-se um retângulo amarelo tal qual a sua área não sobrepusesse a área imediatamente ao lado e o mesmo era movimentado da esquerda para a direita e a densidade de cinza registrada (Figura). Para distinguir os últimos *steps* da barra de cinza, o contraste era aumentado usando o menu LUT do *ImageJ*.



**Figura 28** – Barra de calibração da Kodak nº3 usada para calibração do *software ImageJ* empregado na análise de absorvância da marcação antigênica. O retângulo em amarelo indica a área de cada passo com sua respectiva densidade ótica. (Fonte: <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>)