

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**INFLUÊNCIA DAS MODIFICAÇÕES PÓS-  
TRADUCIONAIS DE HISTONAS H3K4ME2, H3K4ME3 E  
H3K14AC NO PROGNÓSTICO E NA SOBREVIVÊNCIA DO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

**Daniella Cristina Borges**

Uberlândia, 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**INFLUÊNCIA DAS MODIFICAÇÕES PÓS-  
TRADUCIONAIS DE HISTONAS H3K4ME2, H3K4ME3 E  
H3K14AC NO PROGNÓSTICO E NA SOBREVIDA DO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do Título de Doutora.

Daniella Cristina Borges  
Orientador: Paulo Rogério de Faria

Uberlândia, 2018



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Daniella Cristina Borges**

“Impacto no prognóstico e na sobrevida das modificações pós traducionais das histonas H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac no carcinoma de células escamosas bucal”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 20 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Helvécio Marangon Júnior  
UNIPAM

Prof. Dr. João Paulo Silva Servato  
UNIUBE

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola  
FO/UFU

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes  
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria – (orientador)  
ICBIM/UFU

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

---

B732i  
2018      Borges, Daniella Cristina, 1978-  
Influência das modificações pós-traducionais de histonas  
H3K4ME2, H3K4ME3 E H3K14AC no prognóstico e na sobrevida do  
carcinoma de células escamosas bucal [recurso eletrônico] / Daniella  
Cristina Borges. - 2018.

Orientador: Paulo Rogério de Faria.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.3>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Histonas. 3. Carcinoma de células escamosas. 4.  
Metástase. 5. Boca - Epitélio. 6. Epigenômica. I. Faria, Paulo Rogério  
de, 1976- (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.017

Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925

*Dedico este trabalho à minha família, em especial a meu esposo Leonardo Biscaro Pereira e a minha filha Sophia Borges Pereira. Sem o apoio de vocês não seria possível conquistar mais esta vitória. Sophia, minha filha, desejo de coração que daqui a alguns anos, quando você estiver adulta, esta tese possa ser um dos muitos exemplos de vitória que pude lhe mostrar durante nossa jornada juntas.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus:*

Por ter me ajudado a encontrar toda sabedoria e aceitação que precisei, para superar os obstáculos que surgiram durante o meu curso de doutorado.

*À Universidade Federal de Uberlândia:*

Que por meio do programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas (PPIPA) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), possibilitou a realização e conclusão do Doutorado.

*À CAPES:*

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)- Código de financiamento 001.

*Aos demais órgãos de fomento:*

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) que também contribuíram com fomento para a realização desta e de outras pesquisas.

*Ao professor Dr. Paulo Rogério de Faria:*

Obrigada por todo conhecimento compartilhado nestes quase 5 anos juntos. Com você aprendi que ainda é possível fazer pesquisa com qualidade e ética neste país, mesmo quando não dispomos de todos os recursos financeiros que seriam necessários. Certamente sua integridade, dedicação ao trabalho e empenho pela docência e pesquisa, me servirão de inspiração para seguir em frente, podendo agora contar com sua amizade e parceria. Agradeço imensamente por ter aceitado me orientar, mesmo sem antes termos trabalhado juntos. Obrigada por toda dedicação, consideração e paciência. e principalmente por ter confiado no meu potencial.

*Ao laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU:*

A todos os seus integrantes, incluindo professores, técnicos e colegas de pós-graduação por todo apoio e auxílio prestados. Apesar de não citar os nomes, agradeço a todos que por algum momento deixaram seus afazeres para me ajudar.

*Outros laboratórios:*

Aos responsáveis pelos laboratórios de Imunoparasitologia, Alergia e Genética, que contribuíram com a estrutura necessária.

*Ao laboratório de Patologia Bucal da faculdade de Odontologia da UFU e todos os seus integrantes:*

Ao professor Dr. Adriano Mota Loyola, pessoa ímpar, que conheço desde a minha graduação. Obrigada pelos quase 20 anos de convivência, pelos ensinamentos e principalmente pelos vários momentos de conversas sempre muito enriquecedoras.

Ao professor Dr. Sérgio Cardoso Vitorino por todo profissionalismo e prestatividade de sempre.

À Lúbia Cristina Fonseca, técnica do laboratório de Patologia, pela ajuda e incentivo nas horas que precisei.

Aos colegas de pós-graduação: João Paulo Servato, Cássio Vinhadeli, Vinícius Juliate e Anaíra Guedes pela ajuda em vários momentos.

`A Marília Ferreira Andrade por todo o aprendizado que compartilhamos, pelas valiosas dicas e pela sólida amizade que construímos.

`A Aline Carla A. S. Andrade, por toda atenção e disponibilidade em me ajudar com esta pesquisa. Obrigada por me ensinar a utilizar o *software* que era necessário nesta pesquisa e por me ajudar a conseguir analisar todas as 1080 imagens. A você minha eterna gratidão e amizade.

`A Roberta Rezende Rosa, por todos os ensinamentos e pelo auxílio, apoio e amizade.

*Aos amigos e professores Dr. Marcelo José Barbosa Silva e Dra. Ana Paula Lima Oliveira:*

Pessoas especiais que a vida me deu de presente. Agradeço pela amizade sólida e sincera que construímos. Com vocês aprendi que o peso das dificuldades e o valor de nossos sonhos, depende muito da maneira que olhamos para eles. Marcelo, obrigada por todos os ensinamentos que me deixaram apta para realizar o processo seletivo de doutorado e por todo auxílio e apoio de sempre. Ana Paula, obrigada pelos conselhos, por tudo que me ensinou e ainda me ensina. Seus exemplos de humildade e amor ao próximo me servem de inspiração todos os dias.

*Ao professor Dr. Morun Bernardino Neto:*

Pela disponibilidade em me ajudar com as análises estatísticas deste estudo. Agradeço pelo seu empenho e pelas ricas sugestões e ensinamentos.

*Ao Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM):*

Instituição de ensino superior da qual tenho orgulho de fazer parte como docente do curso de Odontologia.

Aos professores e amigos do Curso de Odontologia do UNIPAM por todo apoio para que eu concluísse o doutorado. Agradeço também pela ajuda e paciência nos vários momentos que precisei este ano.

*À minha família e aos amigos de vida:*

Agradeço a meus irmãos, sobrinhos, tios e todos da minha família que sempre me incentivaram e torceram por mim.

A meus pais Baltazar Antônio Borges e Maria Helena Pereira Borges pelo amor incondicional e apoio às minhas escolhas. Pai, obrigada por me ensinar a ser persistente e não desistir fácil dos meus sonhos. Mãe, obrigada por estar comigo nos momentos que mais preciso. Sua presença e ajuda foram fundamentais para que eu conseguisse concluir esta etapa.

Aos verdadeiros amigos, sempre presentes nos momentos bons e ruins, os quais não preciso citar nomes, pois sabem quem são e o que significam. A todos, minha eterna gratidão.

Ao meu sogro Antônio Cassiano Pereira e minha sogra Cleide Maria Bísaro Pereira, por todo carinho, apoio de sempre e pela ajuda em cuidar de minha filha nos momentos que precisei.

Ao meu esposo Leonardo Bísaro Pereira, meu amor de vida e de alma, o qual devo todo meu amadurecimento profissional e pessoal. Sou grata por tudo que construímos juntos, por todos os momentos de amor e felicidade que me proporciona, e principalmente, pelo melhor e maior presente de todos, nossa filha Sophia.

*Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.*

— CHICO XAVIER

*Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.*

— Ayrton Senna



## RESUMO

Os estudos sobre epigenética no carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) são raros. As modificações pós-traducionais de histonas (MPTHs) são reguladores essenciais da expressão gênica e estão desreguladas nos cânceres. Nesse estudo, objetivou-se avaliar a expressão de demetilação de H3K4 (H3K4me2), trimetilação de H3K4 (H3K4me3) e acetilação de H3K14 (H3K14ac) no CCEB e a relação delas com metástase e sobrevida. Amostras parafinadas de 90 casos de CCEB foram obtidas e submetidas à marcação imunohistoquímica com os anticorpos anti-H3K4me2, anti-H3K4me3 e anti-H3K14ac. Para determinar seu papel na metástase, os pacientes foram divididos em tumores primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM). Todas as imunomarcações foram avaliadas usando o software Image J e as expressões nucleares aferidas de acordo com o índice de densidade ótica integrada (IOD). A expressão de cada MPTH foi comparada entre PNM e PM, análises de correlação entre elas e as características clinicopatológicas foram investigadas. Testes de sensibilidade e especificidade foram estabelecidos para cada MPTH através da curva ROC; sendo a curva também usada para estabelecer o *cut off* de cada modificação e distinguir entre tumores com alta e baixa expressão. Curvas de sobrevida e análises univariada e multivariada também foram empregadas. A positividade das células tumorais foi nuclear. A mediana da expressão de H3K14ac foi significativamente maior no grupo PM. O aumento de H3K4me3 foi correlacionado com tabagismo, diferenciação tumoral e sobrevida. Além disso, alta expressão de H3K4me3 tiveram um impacto negativo na sobrevivência dos pacientes. A curva ROC mostrou que a H3K14ac apresentou a maior sensibilidade (81,3%), sugerindo o uso desta como ferramenta de triagem de pacientes com potencial de desenvolver metástases (N0). Nenhuma das MPTHs mostrou ser um fator de prognóstico independente pela análise multivariada. A avaliação conjunta dos níveis de expressão das MPTHs mostrou que a combinação de baixos níveis de H3K4me2, altos H3K4me3 e altos H3K14ac afetaram significativamente a sobrevivência do grupo PM. Em conclusão, nossos achados mostraram que H3K14ac estava altamente expressa no grupo PM. Altos níveis de H3K4me3 diminuíram a sobrevida dos pacientes, além do aumento desta estar correlacionado aos pacientes tabagistas e também com tumores menos diferenciados.

**Palavras chave:** Modificações de histonas, metilação de H3K4, acetilação de H3K14, prognóstico, metástase, carcinoma de células escamosas, cavidade bucal.

## ABSTRACT

Studies on epigenetics in oral squamous cell carcinoma (OSCC) are rare. Post-translational histone modifications (MPTHs) are essential regulators of gene expression and are deregulated in cancers. In this research we investigated the expression of demethylation of H3K4 (H3K4me2), trimethylation of H3K4 (H3K4me3) and acetylation of H3K14 (H3K14ac) in OSCC and their relationship with metastasis and survival. Paraffin-embedded tissue samples of 90 OSCC patients were raised and submitted to immunohistochemical staining with the antibodies against H3K4me2, H3K4me3 and H3K14ac. To determine their role in metastasis, OSCC patients were divided into two groups: primary non-metastatic tumors (PNM) and primary metastatic ones (PM). The nuclear MPTHs expression was measured according to the integrated optical density index (IOD) by using the software Image J. The expression of each MPTH was compared between the PNM and PM groups; correlation analyzes between them and the clinicopathological characteristics were also investigated. Sensitivity and specificity tests were established for each MPTH through the ROC curve; The ROC curve was also used to establish the cutoff point for each MPTH in order to distinguish high and low-expressing MPHT tumors. Survival curves and univariate and multivariate analyzes were also employed. All tumor cells were positive in the nucleus. Median H3K14ac expression was significantly higher in the PM group. An increased H3K4me3 expression was correlated with smoking, tumor differentiation and reduced survival. In addition, high levels of H3K4me3 had a negative impact on patient's survival. The ROC curve showed that H3K14ac had the highest sensitivity (81.3%), suggesting that it might be used as a screening test for detecting N0 OSCC patients with great potential to develop metastasis during the course of their diseases. None of the MPTHs showed to be an independent prognostic factor in the multivariate analysis. A combination of MPTHs expression levels showed that low H3K4me2, high H3K4me3 and high H3k14ac expression significantly affected the patients' survival from the PM group. In conclusion, our findings showed that H3K14ac was highly expressed in the PM group. High levels of H3K4me3 decreased the survival of patients and were correlated with tobacco use and less differentiated tumors.

**Keywords:** Histone modifications, H3K4 methylation, H3K14 acetylation, prognosis, metastasis, oral squamous cell carcinoma.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MPTHs	modificação pós-traducional de histonas
CCEB	carcinoma de células escamosas bucal
CCE	carcinoma de células escamosas
H3K4	lisina 4 da histona H3
H3K4me2	dimetilação da lisina 4 da histona H3
H3K4me3	trimetilação da lisina 4 da histona H3
H3K14	lisina 14 da histona H3
H3K14ac	acetilação da lisina 14 da histona H3
PNM	primários metastáticos
PM	primários metastáticos
IOD	<i>optical density index</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
N0	metástase locorregional
OSCC	oral squamous cell carcinoma
DNA	ácido desoxirribonucleico
ac	acetilação
me	metilação
P	fosforilação
INCA	Instituto Nacional do Câncer
HPV	papiloma vírus humano
TNM	classificação de estadiamento dos tumores malignos
MiRNAs	microRNAs
Nm	nanômetro
HMTs	histona metil-transferases
HCTs	histona acetil-transferase
HDACs	histona desacetilases
HDMs	histona demetilases
H2A	histona 2A
H2B	histona 2B
H3K27me3	trimetilação da lisina 27 da histona H3
HaCa t	queratinócitos humanos imortalizados
HSC3	célula tumoral de carcinoma de células escamosas de língua
TEM	transição epitélio mesenquimal
QA	queilite actínica
H3K9ac	acetilação da lisina 9 da histona H3
H3K4ac	acetilação da lisina 4 da histona H3
H3K18ac	acetilação da lisina 18 da histona H3
H4K12ac	acetilação da lisina 12 da histona H4
H3S10ph	fosforilação da serina 10 da histona H3

P300	tipo de enzima histona acetil-transferase
4NQO 4	nitroquinolina 1-óxido
AJCC	American Join Committeeon Cancer
UICC	Union for International Cancer Control
ATP	adenosina trifosfato
CEP–UFU	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia
CQR	tratamento trimodal: cirurgia, quimioterapia e radioterapia
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
FAMMM	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma
FOUFU	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia
H&E	hematoxilina e eosina
TMA	tissue microarray
TRIS-HCL	cloridrato de Tris (hidroximetil) aminometano
DAB	diamino-benzidina-tetrahidrocloreto
CQR	cirurgia-quimioterapia e radioterapia
VSD	vivo sem doença
VCDP	vivo com doença primária
VCDM	vivo com doença metastática

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Partícula central do nucleossomo	24
FIGURA 2	Arquitetura de cromatina	27
FIGURA 3	Esquema ilustrando a técnica de montagem do TMA	40
FIGURA 4	Mapa do TMA mostrando a posição de cada amostra tumoral na lâmina	40
FIGURA 5	Imagem ilustrativa evidenciando a forma como foram capturadas as imagens para posterior análise no <i>software</i> ImageJ	43
FIGURA 6	Tela inicial do <i>ImageJ</i> contendo diferentes ícones relativos às ferramentas utilizadas em morfometria	44
FIGURA 7	Calibração da distância e escala de cinza	44
FIGURA 8	Conversão da intensidade da marcação em IOD	45
FIGURA 9	Deconvolução da imagem: imagem parcial de CCEB	46
FIGURA 10	Seleção dos núcleos	46
FIGURA 11	Cálculo do valor médio de IOD	47
FIGURA 12	Distribuição de casos do grupo PNM e PM de acordo com a expressão das MPTHs H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac nos grupos PNM e PM	52
FIGURA 13	Cortes histológicos dos <i>spots</i> do TMA corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas no grupo PNM para as MPTHs H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac	53
FIGURA 14	Cortes histológicos dos <i>spots</i> do TMA corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas do grupo PM para as MPTHs H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac	53
FIGURA 15	Curvas ROC ( <i>Receiver operating characteristic</i> ) para cada MPTHs envolvida	64
FIGURA 16	Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida dos 90 pacientes com CCEB de acordo com a alta e baixa expressão das MPTHs	66
FIGURA 17	Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida dos 90 pacientes com CCEB de acordo com as combinações de alta e baixa expressão das MPTHs	67

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Estadiamento clínico tumoral segundo os critérios estabelecidos pela <i>Union Internationale Contre le Cancer</i> (UICC) e da <i>American Committee on Cancer</i> (AJCC)	39
QUADRO 2	Anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Análise descritiva dos dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos 90 pacientes com CCEB	50
TABELA 2	Cálculo da expressão das MPTHs investigadas entre os grupos PNM e PM	52
TABELA 3	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis sociodemográficas em todos os pacientes	54
TABELA 4	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis sociodemográficas para o grupo PNM	55
TABELA 5	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis sociodemográficas para o grupo PM	55
TABELA 6	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis clinicopatológicas dos 90 pacientes	57
TABELA 7	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis clinicopatológicas para o grupo PNM	58
TABELA 8	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis clinicopatológicas para o grupo PM	59
TABELA 9	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com os tipos de tratamentos, condição clínica e sobrevida, para os 90 pacientes	61
TABELA 10	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com os tipos de tratamentos, condição clínica e sobrevida, para o grupo PNM	62
TABELA 11	Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com os tipos de tratamentos, condição clínica e sobrevida, para o grupo PM	63
TABELA 12	Valores preditivos da curva ROC para cada MPTHs	65
TABELA 13	Regressão de risco proporcional de Cox para análises univariada e multivariada	65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Carcinoma de células escamosas</b>	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Epigenética</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Regulação da cromatina pelas MPTHs</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Papel das MPTHs no câncer</b>	<b>28</b>
2.4.1	<i>Metilação</i>	29
2.4.1.2	Di e trimetilação em H3K4	30
2.4.2	<i>Acetilação</i>	32
2.4.2.1	Acetilação em H3K14	34
2.4.3	<i>Acetilação de K14 se correlaciona com a metilação em H3K4</i>	34
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Casuística</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Tissue Microarray (TMA)</b>	<b>39</b>
<b>5.3</b>	<b>Ensaio imuno-histoquímico</b>	<b>41</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise da imuno-histoquímica</b>	<b>42</b>
5.4.1	<i>Calibração do ImageJ</i>	44
<b>5.5</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
<b>6.1</b>	<b>Dados sociodemográficos e clinicopatológicos</b>	<b>49</b>
<b>6.2</b>	<b>Expressão imuno-histoquímica de H3k4me2, H3K4me3 e H3K14ac no CCEB</b>	<b>51</b>
<b>6.3</b>	<b>Análises de correlação das MPTHs com os dados sociodemográficos e clinicopatológicos</b>	<b>54</b>
<b>6.4</b>	<b>Envolvimento de H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac com metástase Locorregional de CCEB</b>	<b>64</b>
<b>6.5</b>	<b>Análises univariada e multivariada</b>	<b>65</b>
<b>6.6</b>	<b>Impacto das MPTHs na sobrevida</b>	<b>66</b>
6.6.1	<i>Relação da expressão de H3K4me2, H3k4me3 e H3k14ac com sobrevida</i>	66
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>73</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>74</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma células escamosas de boca (CCEB) é uma neoplasia epitelial com diferentes graus de diferenciação escamosa e com alta propensão para desenvolver metástases linfonodais (NG *et al.*, 2017). Por ser o tipo mais comum de câncer na cavidade bucal, o CCEB representa 90% das neoplasias malignas, sendo o quinto tipo de tumor mais frequente em homens (INCA, 2018). Acomete indivíduos, mais prevalentemente com idade entre 50 e 60 anos, sendo a borda lateral de língua, lábio inferior, assoalho de boca e mucosa jugal as regiões mais afetadas (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Devido à ausência de sintomas na fase inicial e a demora dos pacientes com CCEB para procurar tratamento, esta neoplasia maligna é freqüentemente diagnosticada em fase tardia, diminuindo as chances de cura e de possibilidade terapêutica, o que vem a culminar com a piora do prognóstico (FARIA *et al.*, 2003). O planejamento terapêutico e o prognóstico do CCEB estão diretamente relacionados ao estadiamento do tumor, recorrência e a presença de metástase locorregional, sendo esta considerada um fator independente de prognóstico, diminuindo em 50% a sobrevida dos pacientes (AMIT *et al.*, 2013; MATSUO *et al.*, 2018). Apesar dos avanços feitos nos últimos anos quanto a sua detecção precoce e tratamento, infelizmente as taxas de sucesso são ainda baixas (NI *et al.*, 2015). Deste modo, a busca por outros potenciais fatores de prognósticos é de suma importância para melhorar a sobrevida do CCEB (CAMPOS-FERNANDES *et al.*, 2018).

De modo geral, sabe-se que a indução e o desenvolvimento do CCEB se devem a uma soma de alterações genéticas combinadas com fatores de risco ambientais (principalmente tabaco e consumo de álcool, mas também infecções virais) que levam a alterações na atividade de oncogenes e genes supressores de tumor (IRIMIE *et al.*, 2018). O nível de complexidade que leva a expressão anormal desses genes é extremamente alto e alterações epigenéticas têm sido colocadas em posição de destaque nesse processo, pois se mostram importantes reguladoras das funções gênicas (CHEN *et al.*, 2013). Atualmente, vários estudos têm desvendado os complexos mecanismos epigenéticos e a maneira como eles podem interferir no desenvolvimento e progressão do tumor, além disso, esses estudos têm mostrado como eles cooperam com as alterações genéticas no desenvolvimento tumoral através de regulação de genes, incluindo os proto-oncogenes, genes supressores de tumores, genes apoptóticos e genes de reparo do DNA (GASCHE; GOEL *et al.*, 2012).

Os principais eventos epigenéticos estão relacionados à metilação do DNA, a modificação pós traducional de histonas (MPTHs) e os microRNAs (KHAN; REDDY;

GUPTA, 2015). Alterações nos padrões de histona estão presentes no câncer em determinados genes e também níveis globais (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). As projeções das caudas de histonas são passíveis de sofrer várias modificações covalentes pós-traducionais envolvendo a adição de grupos químicos, como os grupos metila, acetila e fosfato (CASTILHO, SQUARIZE, ALMEIDA, 2017). Essas MPTHs ocorrem simultaneamente de várias formas e em vários resíduos de aminoácidos, além de poderem ocorrer em locais isolados ou combinados a outras MPTHs, repercutindo funcionalmente de forma específica e variada na estrutura da cromatina (BANERJEE; CHAKRAVARTI, 2011).

Evidências crescentes sugerem que tanto a desregulação dos mecanismos de controle das MPTHs quanto o aumento da expressão delas são condições que estão intimamente associadas com os eventos da carcinogênese, incluindo o crescimento, diferenciação e morte celular (TZAIO *et al.*, 2009). Uma vez que as MPTHs têm sido encontradas em diversos tumores de forma reversível, o conhecimento de sua participação na oncogênese potencializa a perspectiva da construção novas abordagens terapêuticas, ou mesmo complementares aquelas classicamente já utilizadas (IRIMIE *et al.*, 2018). A literatura recente descreve MPTHs sendo usadas inclusive na previsão do prognóstico de alguns tipos de câncer e na sobrevida dos pacientes. Além disso, os níveis celulares de MPTHs também podem prever respostas a certos agentes quimioterápicos, servindo como biomarcadores preditivos que poderiam ser usados para tomar decisões clínicas sobre a escolha e o curso da terapia (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017).

Os resíduos de histona estão sujeitos a uma variedade de modificações, sendo a metilação e acetilação dos resíduos de lisina na histona H3 bastante explorados no estudo da biologia tumoral. Tanto a acetilação (ac) como a metilação (me) das lisinas podem ativar ou inativar a cromatina e, subsequentemente, o status transcricional dos genes (KHAN *et al.*, 2016). A metilação dos resíduos de lisina da histona H3 participa da regulação da estrutura da cromatina, sendo a modificação que ocorre em K4 associada à eucromatina em atividade transcricional, podendo estar voltada tanto para a ativação como para repressão. A trimetilação (me3) em H3K4 é frequentemente observada em sítios promotores e estão associadas ao aumento da transcrição gênica, enquanto que a dimetilação (me2) em H3K4 tende a estar presente na região 3' (downstream) de genes ativos (KIMURA, 2013). A presença de di e trimetilação em H3K4 no CCEB ainda é pouco explorada como biomarcador diagnóstico e prognóstico, ou como possível alvo molecular para novos agentes quimioterápicos (GASCHE; GOEL, 2012; GONZÁLEZ-RAMIREZ *et al.*, 2014).

Quanto à acetilação da lisina, trata-se da modificação mais importante associada à transcrição gênica, arquitetura da cromatina e reparo do DNA (KOUZARIDES, 2007). Os resíduos de lisina das histonas H3 e H4 são particularmente susceptíveis a acetilação, sendo os resíduos K (3, 9, 14 e 27) da histona H3 tipicamente associados à expressão gênica (URVALEK; GUDAS, 2014). A acetilação em H3K14 ainda é pouco explorada no câncer, mas já existem relatos de que seus níveis são significativamente maiores em alguns tumores quando comparados ao tecido normal, incluindo o CCEB (ARIF *et al.*, 2010; URVALEK *et al.*, 2015).

Até o momento, as pesquisas que abordam os papéis das MPTHs H3K4me2-3 e H3K14ac na patogênese do CCEB apresentam resultados contraditórios, e os padrões de expressão e a associação delas com as variáveis clinicopatológicas são ainda muito pouco exploradas. Com isso em mente, entende-se a necessidade de se investigar essas MPTHs para melhor compreender a biologia do CCEB. Nossa hipótese inicial foi de que esses três tipos de MPTHs poderiam ser usados como fatores preditivos de prognóstico, ocorrência de metástases e sobrevida para os pacientes com CCEB. Para responder a isso, os níveis de expressão delas foram investigados em pacientes com CCEB não metastáticos e metastáticos e os achados correlacionados com as variáveis clinicopatológicas dos pacientes e tempo de sobrevida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA.

### 2.1 Carcinoma de células escamosas

O carcinoma de células escamosas (CCE) é uma neoplasia maligna de origem epitelial muito comum na região de cabeça e pescoço, sendo inferior em termos de incidência apenas em relação aos tumores de pele não melanoma (CHI; DAY; NEVILLE, 2015). Em geral, o CCE de cabeça e pescoço é o sexto tumor mais frequente no mundo, apresentando incidência de 560.000 novos casos e 300.000 mortes por ano (VAN MONSJOU *et al.*, 2013; IRIMIE *et al.*, 2018). Na cavidade bucal, o CCE representa aproximadamente 90% de todas as malignidades, sendo o quinto tumor mais frequente em homens e o décimo segundo em mulheres no Brasil, com uma incidência estimada de 14.700 novos casos para o biênio 2018-2019 (INCA, 2018). O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) constitui um problema significativo de saúde pública, com < 60% dos pacientes sobrevivendo por mais de cinco anos (AMIT *et al.*, 2013).

O CCEB é um tumor com diferenciação escamosa que surge do epitélio de revestimento da mucosa bucal, acometendo, mais frequentemente, borda lateral de língua, lábio inferior, assoalho de boca e mucosa jugal de indivíduos na quinta ou sexta década de vida, com predileção pelo gênero masculino (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado uma incidência crescente deste tumor em adultos jovens, abaixo dos 45 anos de idade e do sexo feminino, cujo prognóstico é considerado desfavorável por alguns autores em comparação com a forma convencional (LIU *et al.*, 2016; NG *et al.*, 2017).

O surgimento do CCEB tem sido associado à presença de diferentes fatores de risco, tanto extrínsecos quanto intrínsecos. Os fatores extrínsecos incluem o consumo de álcool e tabaco, exposição crônica à radiação actínica e infecção pelo papilomavírus humano (HPV) (IRIMIE *et al.*, 2016). A presença de alterações genéticas na forma de quadros sindrômicos, como a anemia de Fanconi, síndrome de FAMMM (do inglês *familial atypical multiple mole melanoma*), síndrome de Bloom, xeroderma pigmentoso, ataxia telangiectasia e síndrome de Li-Fraumeni constituem fatores de risco intrínsecos (VAN MONSJOU *et al.*, 2013). Com relação à influência de vírus oncogênicos, a infecção pelo HPV (subtipos 16 e 18) está associada ao desenvolvimento de CCE de orofaringe, sendo que mais de 50% deles abrigam DNA viral integrado ao genoma das células tumorais enquanto que o número de pacientes com CCEB positivos para HPV-16 se aproxima dos 20% (RIVERA, 2015). Entretanto, o fumo e o álcool são ainda os fatores de risco mais associados ao

desenvolvimento de CCEB (CHATURVEDI *et al.*, 2008), com risco aumentado de três vezes em pacientes fumantes quando comparado aos não fumantes (GANDINI *et al.*, 2008), havendo redução significativa após 10 anos de suspensão do hábito, mas com equivalência de risco ao de pacientes não fumantes somente após 20 anos (JABER, 2010). Embora o consumo exclusivo de álcool não seja um fator preditivo para o surgimento desse tumor, a associação entre etilismo e tabagismo implica em maior risco de desenvolvimento da doença em função do forte sinergismo entre eles (CHAITANYA *et al.*, 2016).

Embora ainda controversa, a má higiene bucal também tem sido sugerida como mais um fator de risco para o CCEB. Vários microrganismos, incluindo bactérias do biofilme bucal, podem estar associados ao processo de tumorigênese através da indução de diferentes mecanismos, incluindo inflamação crônica, imunossupressão e metabolismo de substâncias potencialmente carcinogênicas (PUSHALKAR *et al.*, 2011). Há na literatura alguns estudos relatando alterações na microbiota oral de pacientes com CCEB (HOOPER *et al.*, 2006; 2007; METGUD; GUPTA; GUPTA, 2014). Um estudo mostrou que a pobre higiene bucal, baixa frequência de profilaxia profissional, ausências dentárias, presença de bolsa periodontal e aumento de microrganismos patogênicos (*Streptococcus sp.* e *Staphylococcus sp.*) são alguns dos parâmetros mais frequentemente observados em pacientes com a doença em comparação com indivíduos saudáveis (NARAYAN *et al.*, 2014).

Com relação à localização do CCEB na cavidade bucal, essa neoplasia maligna pode ocorrer em qualquer região, sendo que os sítios mais frequentemente acometidos são os dois terços posteriores da língua (incluindo face ventral e borda lateral), assoalho da boca, mucosa jugal, gengiva inferior e superior e palato (SLOOTWEG; EVESON, 2005; NG *et al.*, 2017). A localização do tumor também varia segundo a faixa etária. Em pacientes jovens, a língua é o sítio de acometimento mais frequente, enquanto que em indivíduos de meia-idade o assoalho de boca e idosos a gengiva (TROELTZSCH *et al.*, 2014). Além disso, localização do tumor pode estar relacionada a algum tipo específico de fator de risco para o CCEB, como é o caso dos tumores de lábio, cujo mecanismo de carcinogênese principal é a exposição crônica à radiação ultravioleta (JOHNSON *et al.*, 2005) e os tumores associados ao HPV na orofaringe, (RIVERA, 2015). No Brasil, o assoalho bucal e a borda lateral da língua são os locais mais afetados (DANTAS *et al.*, 2016).

A intensidade e frequência de exposição aos fatores de risco, bem como a susceptibilidade genética de cada indivíduo, são responsáveis pela distribuição temporal e espacial variada em relação à incidência deste tumor segundo parâmetros clínicos, tais como

sexo, idade e raça (MAJCHRZAK *et al.*, 2014). Além de refletir a presença de fatores de risco variados, a localização do tumor primário também implica em diferenças no comportamento tumoral, prognóstico e, consequentemente, na resposta ao tratamento (TRIVEDI *et al.*, 2011). Pacientes com CCEB em região posterior de língua possuem maior risco de recidiva local e menor taxa de sobrevida (GONTARZ; WYSZYNSKA-PAWALEC; ZAPALA, 2013).

O diagnóstico precoce do CCEB aumenta consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes. Taxas de sobrevida entre 80-90% podem ser alcançadas caso o diagnóstico seja realizado nos estágios iniciais da doença, contudo a precocidade no diagnóstico é ainda um grande desafio (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Embora a cavidade bucal seja potencialmente acessível para exame, mais de 50% dos casos não são detectados até que a doença esteja em estágio avançada, o que dificulta o tratamento e reduz a taxa de sobrevida dos pacientes (FARIA *et al.*, 2003). Infelizmente, a detecção do CCEB só é realizada em estágios avançados devido, em parte, à ausência de sintomatologia nos estágios iniciais, o que pode estar relacionado à heterogeneidade tumoral, tornando variável o comportamento desse tumor entre os pacientes (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011). A falta de informação tanto do paciente como do profissional é um fator que pode contribuir para o atraso no diagnóstico da lesão. Um diagnóstico precoce pode ser alcançado com orientações sobre consultas odontológicas periódicas, especialmente em pacientes que fazem uso do tabaco e álcool, bem como a realização por parte do profissional de uma correta anamnese acompanhada de um cuidadoso exame clínico das mucosas pelo cirurgião dentista (FARIA *et al.*, 2003). A biópsia seguida de exame anatomopatológico é mandatória para confirmação do diagnóstico de CCEB (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010).

Quanto à patogenia da doença, o CCEB surge, segundo sua história natural, a partir de queratinócitos do epitélio de revestimento da mucosa bucal submetidos à exposição crônica aos diversos fatores citados anteriormente, os quais rompem o equilíbrio homeostático e promovem alterações iniciais não-neoplásicas. Geralmente a doença surge como resultado de da progressão de um quadro de hiperplasia epitelial, passando por diferentes graus de displasia, carcinoma *in situ* e carcinoma propriamente dito com invasão dos tecidos adjacentes, até a ocorrência de metástases locorregionais e à distância (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011).

Condições intermediárias do processo de carcinogênese podem se manifestar muitas vezes na forma de desordens potencialmente malignas, as quais são reconhecidas como um grupo de lesões da mucosa que possuem elevado risco de transformação maligna (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Estima-se que a prevalência global das desordens potencialmente

malignas varie de 1 e 5%, sendo a leucoplasia bucal a lesão mais comum. Outras condições potencialmente malignas incluem eritroplasia, eritroleucoplasia, fibrose submucosa e, menos frequentemente, disqueratose congênita, lúpus eritematoso discoide, líquen plano e queilite actínica (MÜLLER, 2018). Em geral, estudos apontam que entre 5 e 18% das desordens potencialmente malignas sofrem transformação maligna, possuindo maior propensão aquelas que apresentam displasia moderada e grave (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015). A identificação precoce das lesões potencialmente malignas e do CCEB é fundamental para aumentar a taxa de sobrevida e reduzir a morbidade dos pacientes (MATSUO *et al.*, 2018). No entanto, lesões pré-malignas iniciais podem ser indistinguíveis de lesões benignas. Além disso, prever o risco de progressão destas alterações com base no exame anatomopatológico pode ser um desafio para o profissional, ao mesmo tempo em que alguns pacientes podem desenvolver CCEB mesmo na ausência delas (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011).

O aspecto clínico do CCEB pode variar de acordo com a localização do tumor primário e estágio da doença. As lesões podem se apresentar brancacentas, eritematosas ou heterogêneas, de aspecto nodular ou ulcerado, com margens elevadas e endurecidas; sinais e sintomas podem estar ausentes a princípio, havendo dor, mau cheiro, hemorragia, disfagia, odinofagia e disfonia em pacientes com tumores mais avançados (MATSUO *et al.*, 2018). A maioria dos pacientes com lesões avançadas apresenta crescimentos ulcerativos com áreas de necrose e com invasão das estruturas circundantes, tais como o osso, músculo e pele. Nas fases terminais, os doentes podem desenvolver fístula oro-cutânea, hemorragia intratável, anemia grave e caquexia (JOHNSON *et al.*, 2011).

Quanto ao aspecto histológico, o CCEB é classificado em bem, moderadamente e pobremente diferenciado de acordo com o grau de diferenciação das células tumorais (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Nos casos classificados como bem diferenciados, as células neoplásicas se assemelham muito ao tecido epitelial de origem, formando ninhos, cordões ou lençóis de células neoplásicas que apresentam certo grau de pleomorfismo nuclear (anisocariose) e citoplasmático (anisocitose), nucléolos evidentes e algumas figuras de mitoses. A queratinização abundante é um dos aspectos clássicos nos tumores com esse fenótipo. Por outro lado, em tumores classificados como moderadamente diferenciados, observa-se um maior grau de anisocariose e anisocitose nas células neoplásicas, exibindo nucléolos grandes e múltiplos, maior taxa de mitoses típicas e atípicas e menor grau de queratinização. Por fim, os tumores classificados como pobremente diferenciados são compostos por células anaplásicas, mostrando numerosas figuras de mitoses típicas e atípicas,

e queratinização mínima ou ausente (JOHNSON *et al.*, 2011). A maioria dos CCEB constitui lesões moderadamente diferenciadas, de modo que essa classificação histológica tem pouco valor prognóstico quando comparado com outros critérios histológicos como a profundidade, padrão de invasão e presença de invasão angiolinfática e/ou neural (SLOOTWEG; EVESON, 2005).

O planejamento terapêutico e o prognóstico do CCEB estão diretamente relacionados ao estadiamento clínico do tumor. O estadiamento clínico do CCEB é feito de acordo com a classificação desenvolvida pela UICC (do inglês *Union for International Cancer Control*) e AJCC (do inglês *American Joint Committee on Cancer*), denominada classificação TNM (T: tamanho; N: presença e extensão de metástase; M: ausência ou presença de metástase à distância). A partir dessa classificação, os tumores são separados em lesões iniciais (Estádio I e II) e avançadas (Estádio III e IV), o que auxilia na escolha do tipo de tratamento (SLOOTWEG; EVESON, 2005). Quanto maior o estágio, pior é o prognóstico, sendo que o diagnóstico precoce em estágios iniciais ainda é o fator chave no aumento de sobrevida do paciente (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). A maioria dos casos de CCEB é diagnosticada em estágios avançados, podendo chegar a 70% dos casos, sendo que o fato das lesões serem descobertas tardiamente implica em diminuição da sobrevida (MATUSUO *et al.*, 2018). O tamanho do tumor e o envolvimento dos linfonodos cervicais estão entre os principais fatores de prognóstico (CAMPOS-FERNADES *et al.*, 2018). Contudo, a presença de metástase locorregional é considerada um dos fatores mais importantes para a sua determinação, influenciando diretamente na sobrevida (CORTESINA; MARTONE, 2006). A metástase pode ser interpretada como um processo dinâmico em que clones de células adquirem a capacidade de invadir e disseminar para outros órgãos. Estima-se que 40% dos pacientes com CCEB desenvolvem metástases, com apenas 25% a 40% deles sobrevivendo em 5 anos, uma taxa baixa se comparado aos 90% dos pacientes sem lesões metastáticas (NOGUTI *et al.*, 2012). Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa evidenciaram taxas de metástases de 50% em pacientes com CCEB (CAMPOS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2018). Apesar de alguns indicadores prognósticos serem, por vezes, preditivos de desenvolvimento da metástase, como, por exemplo, o tamanho do tumor primário, estágio, sítio acometido, grau de diferenciação e profundidade de invasão, tais parâmetros prognósticos podem subestimar a presença da metástase cervical, já que encontramos na literatura taxas altas de metástases ocultas (NOGUTI *et al.* 2012; CORTESINA; MARTONE, 2006).



Até o momento não existe um protocolo padrão específico de tratamento do CCEB, mas todos os esforços da equipe de saúde multidisciplinar giram em torno do controle locorregional da doença, objetivando um mínimo de dano funcional (MATSUO *et al.*, 2018). As modalidades terapêuticas envolvem ressecção cirúrgica e radioterapia isolada ou associada à quimioterapia, sendo que a escolha da terapia local definitiva se baseia na avaliação do grau de disseminação tumoral de acordo com o estadiamento clínico e deve levar em conta o resultado funcional do tratamento, remoção cirúrgica do tumor e condição médica geral do paciente (CAMPOS-FERNADES *et al.*, 2018). Tumores em estágios iniciais são tratados com apenas uma modalidade terapêutica, geralmente cirurgia ou radioterapia. Em contrapartida, tumores avançados são tratados com ressecção cirúrgica e radioterapia, e, às vezes, quimioterapia (MATSUO *et al.* 2018).

Além dos parâmetros clínicos e histológicos citados anteriormente, o potencial prognóstico de uma série de biomarcadores moleculares têm sido alvo de extensa investigação para o CCEB (TAGHAVI; YAZDI, 2015). A carcinogênese é um processo que se desenvolve em múltiplas etapas através da aquisição progressiva de características celulares vantajosas em direção ao fenótipo maligno, possibilitada por alterações genéticas e epigenéticas que interferem em diferentes circuitos celulares (HANAHA; WEINBERG, 2011; CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017). Uma maior compreensão da biologia molecular responsável pelo surgimento e progressão do CCEB pode revelar novos mecanismos e fornecer biomarcadores com aplicação potencial de diagnóstico, determinação do prognóstico, monitoramento da evolução e tratamento da doença (NI *et al.*, 2015). Vários biomarcadores associados aos mais variados processos celulares, como proliferação, apoptose, adesão e migração têm sido estudados com aplicação prognóstica, entre outros (TAGHAVI; YAZDI, 2015). Somado a isso, na última década, a epigenética se tornou alvo principal de várias pesquisas, revelando mecanismos antes não conhecidos na etiologia do CCEB e possibilitando a investigação de novos marcadores prognósticos e alvos terapêuticos (GASCHE; GOEL, 2012; KHAN *et al.*, 2016; IRIMIE *et al.*, 2018).

## 2.2 Epigenética

Em 2008, uma definição consensual de epigenética foi estabelecida como um fenótipo hereditário estável resultante de alterações em um cromossomo sem modificações na sequência do DNA (BERGER *et al.*, 2009). Este conceito é genericamente utilizado para

definir as mudanças que ocorrem na expressão gênica, mas sem que ocorra nenhuma alteração da sequência do código genético, significando uma forma de herança genética baseada no DNA, mas sem mudanças na estrutura deste (CHERVONA; COSTA, 2012; BLANCAFORT, JYN; FRYE, 2013).

O conjunto de modificações epigenéticas, denominado *epigenoma*, é característico de cada tipo celular e fornece as bases moleculares da diferenciação celular, através da regulação da acessibilidade da informação genética pela maquinaria celular de transcrição (OLIVEIRA, 2010). O epigenoma é dinâmico, variando de uma célula para outra dentro de um mesmo organismo, além de poder ser transmitido às células descendentes, mantendo um padrão epigenético específico dentro das diferentes linhagens celulares (BISWAS; RAO, 2017). Desse modo, o fenótipo passa a ser resultado não apenas do genótipo, mas também do epigenótipo, o qual permite um segundo nível de controle da expressão gênica e que se mostra tão plástico quanto o genótipo (BEDI *et al.*, 2014).

Cada tipo de célula no corpo é geneticamente idêntico, ou seja, elas compartilham o mesmo conjunto de genes, mas precisam diferenciar-se fenotipicamente em diversos tipos de células e tecidos para suportar um funcionamento normal do corpo humano, sendo isto controlado por mecanismos reguladores altamente sincronizados, os quais envolvem os fenômenos epigenéticos (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011; BISWAS; RAO, 2017).

A maneira pela qual a estrutura da cromatina é preservada e ordenada é crucial para entender a origem das alterações epigenéticas. Essas modificações regulam a expressão gênica na medida em que modificam molecularmente não apenas o DNA, mas toda a cromatina. Apesar de não haver uma alteração na sequência de DNA, o que muda é a forma de como as células “leem” os genes (KHAN *et al.*, 2016).

Todas as etapas relacionadas com a regulação, proliferação, diferenciação celular e apoptose sofrem influência dos processos epigenéticos, (XIA *et al.*, 2013; KELLY; ISSA, 2017). As falhas no estabelecimento ou a permanência descontrolada desses eventos poderão resultar na ativação ou inibição inadequada de vários genes alterando a fisiologia celular normal e, conseqüentemente, ocasionar o desenvolvimento de doenças, como síndromes neurológicas e de desenvolvimento motor, doenças autoimunes e o câncer (ROGENHOFER, *et.*, 2013).

A natureza reversível das mudanças epigenéticas tem chamado a atenção da comunidade científica para o estudo dos mecanismos moleculares reguladores destas alterações. Os principais mecanismos epigenéticos são a metilação do DNA, os micro-RNAs e as modificações pós-traducionais de histonas (MPTHs) (CHERVONA; COSTA, 2012).

Juntos, esses mecanismos alteram o funcionamento do genoma na medida em que modificam a dinâmica estrutural local da cromatina, modulando assim a acessibilidade e compacidade (BISWAS; RAO, 2017).

### 2.3 Regulação da cromatina pelas MPTHs

A cromatina é dividida em duas conformações distintas: a heterocromatina, que é densamente compactada e transcricionalmente inativa, e a eucromatina, que é menos condensada e transcricionalmente ativa. O status estrutural da cromatina acaba resultando na posição transcricional do gene (LI; SETO, 2016). A cromatina não é uma estrutura inerte, mas sim um arcabouço de DNA instrutivo que pode responder a estímulos externos para regular a expressão de muitos genes. Um componente principal da cromatina e que desempenha um papel fundamental nesta regulação é a modificação das histonas (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

Os primeiros estudos a relatar que as histonas são modificadas pós-traducionalmente datam do início dos anos 1960 (ALLFREY; FAULKNER; MIRSKY, 1964), mas uma visão de como essas modificações poderia afetar a estrutura da cromatina surgiu apenas em 1997, quando os pesquisadores puderam descrever a estrutura cristalina da partícula central do nucleossomo a partir de raios-X de alta resolução (FIG. 1) (LUGER *et al.*, 1997).

FIGURA 1. Partícula central do nucleossomo:

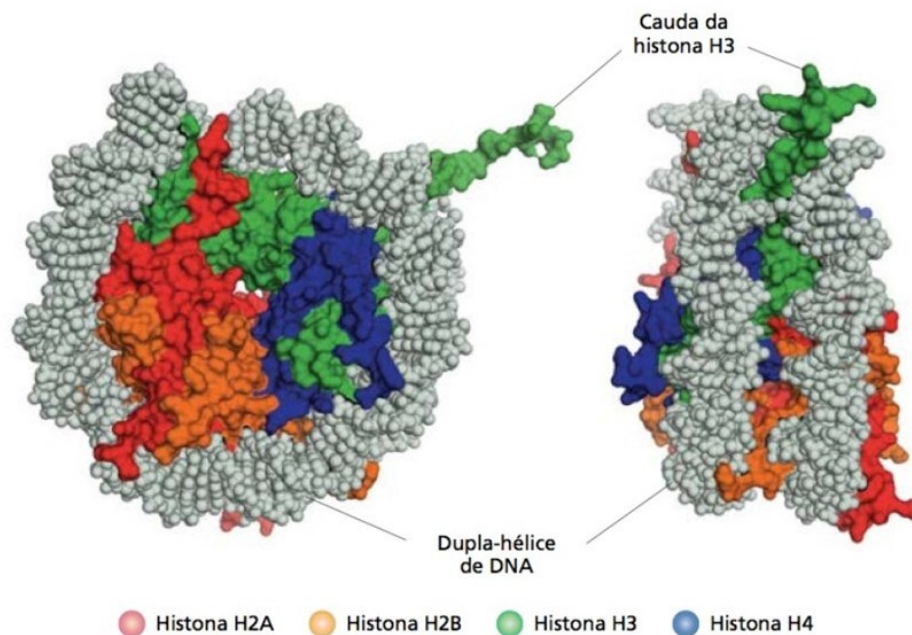


Imagem determinada conforme análise de difração de raios X, onde nota-se uma porção da cauda da histona H3 (verde) prolongando-se a partir do cerne do nucleossomo (LUGER *et al.*, 1997).

Fonte: Alberts *et al.* (2017, p. 186).

As histonas são responsáveis pelo primeiro nível fundamental de compactação da cromatina, o nucleossomo (WEBBER *et al.*, 2017). O nucleossomo é formado pelo conjunto de proteínas histonas, e DNA, apresentando uma estrutura organizacional no qual 147 pares de nucleotídeos, dispostos em um formato helicoidal, fazem aproximadamente 1,7 volta em torno de um octâmero de histonas. Este octâmero é composto por dois dímeros (H2A/H2B) e um tetrâmero (H3/H4). Além destes 4 pares de histonas, uma quinta histona (H1) é imprescindível para que os complexos histonas-DNA originem uma fibra de 30 nm de espessura, estando ela ligada ao DNA no momento de sua entrada no nucleossomo (KOUZERIDES, 2007; DESJARLAIS; TUMMINO, 2016).

As histonas apresentam um domínio globular e uma cauda amino-terminal (n-terminal) que contém diversos resíduos de aminoácidos conservados, principalmente lisina, serina, treonina e arginina. Esses agrupamentos N-terminal projetam-se para fora do nucleossomo estando assim sujeitos a vários tipos MPTHs (LI *et al.*, 2017). As caudas amino-terminais das histonas, que são altamente básicas, se projetam para fora do nucleossomo e entraram em contato com nucleossomos adjacentes, contribuindo para que várias MPTHs aconteçam simultaneamente e em diferentes regiões da cromatina (LI *et al.*, 2018). O padrão pelo qual o DNA é enrolado em torno do nucleossomo e a forma pela qual cada nucleossomo é posicionado ajudam a compreender o quanto essas MPTHs são capazes de interferir na regulação da cromatina (KHAN *et al.*, 2016; BISWAS; RAO, 2017).

Além dos outros eventos epigenéticos (metilação de DNA e micro-RNAs), as MPTHs são consideradas eventos críticos para a modulação da dinâmica da cromatina, na medida em que alteram o seu grau de compactação comprometendo ou facilitando o acesso da maquinaria de transcrição aos sítios promotores gênicos (MARTINS; CASTILHO, 2013; BISWAS; RAO, 2017). O principal efeito das MPTHs é atrair proteínas específicas para a região de cromatina modificada, as quais determinarão como e quando os genes serão expressos. Essas modificações não apenas regulam a estrutura da cromatina simplesmente por estarem lá, mas também recrutam enzimas de remodelação que utilizam a energia derivada da hidrólise do ATP para reposicionar os nucleossomos (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

O mecanismo por trás da regulação das principais MPTHs não é totalmente compreendido, mas pode, no entanto, ser explicado de duas formas. Em primeiro lugar, a adição de qualquer MPTH afeta as interações inter e intranucleossomais e, por consequência, a interação com o DNA, seja por impedimento alostérico ou interações de carga. Em

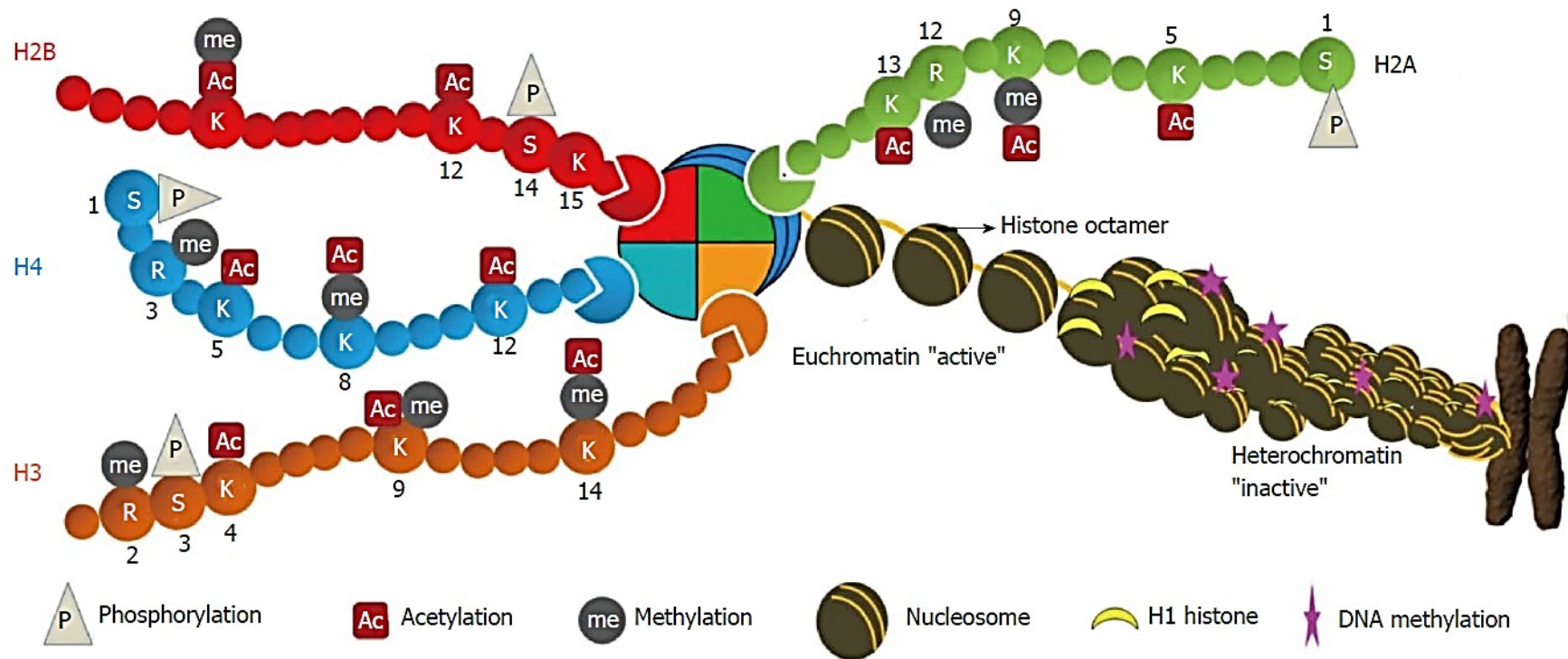
segundo lugar, a adição destes MPTHs inibe ou facilita a ligação de várias proteínas à cromatina. Assim, estes dois mecanismos permitem que ocorra um vasto número de processos bioquímicos, influenciando na regulação da cromatina e consequentemente interferindo na expressão gênica (KOUZARIDES, 2007).

A grande diversidade dessas MPTHs demonstra a notável complexidade estrutural e funcional destas moléculas, apresentando diferentes significados para a célula, na medida em que são capazes de gerar mudanças estruturais secundárias em pontos específicos e também ter a capacidade de atingir locais distantes, afetando inclusive a função de outros genes. Os processos de acetilação, metilação e fosforilação das histonas são as MPTHs mais estudadas na literatura (FIG. 2) (PORTELA; ESTELLER, 2010; DAWSON; KOUZARIDES, 2012; CHEN *et al.*, 2013; KHAN, REDDY; GUPTA, 2015).

As MPTHs são realizadas por enzimas denominadas “*writers*” e “*erasers*”. As enzimas capazes de adicionar os grupos acetil, metil e fosforil são chamadas histonas acetiltransferases (HATs), metiltransferases (HMTs) e quinases, respectivamente. Este grupo é identificado por outras proteínas chamadas de proteínas de leitura, ou “*readers*”, as quais contêm domínios específicos denominados de bromodomínios e cromodomínios. Já as enzimas com função de remover esses grupos recebem a denominação desacetilases (HDACs), demetilases (HDMs) e fosfatases de histonas, respectivamente (KHAN; REDDY; GUPTA, 2015). Os processos de MPTHs são de natureza reversível e podem servir como locais de ancoragem na cauda das histonas para que outras inúmeras proteínas de leitura (“*readers*”) sejam capazes de influenciar na condensação da cromatina, enquanto outras atuam de forma contrária, afrouxando a cromatina e facilitando o acesso ao DNA. A dinâmica deste processo nos leva a compreensão de que eventos como transcrição, reparação e replicação podem ser regulados e modulados diferentemente, podendo ou não favorecer a estabilidade genômica (DESJARLAIS; TUMMINO, 2016).

Atualmente as MPTHs são consideradas como marcadores específicos (*histonemarks*). Esses processos ocorrem simultaneamente de várias formas e em vários resíduos de aminoácidos, além de poderem ocorrer em locais isolados ou combinados a outras MPTHs, repercutindo funcionalmente de forma específica e variada na estrutura da cromatina, desempenhando assim importantes papéis na regulação de várias atividades do genoma (BANERJEE; CHAKRAVARTI, 2011).

FIGURA 2. Arquitetura de cromatina



O DNA é envolvido em duas voltas em torno de octâmeros de histona (nucleossomos) em intervalos de cerca de 200 pb ao longo do DNA. As histonas no interior do nucleossomo (duas de H2A, H2B, H3 e H4) sofrem numerosas MPTs nas suas caudas N-terminais que se projetam a partir do nucleossomo. A dobragem adicional do nucleossomo com a histona ligante H1 cria uma estrutura espiral, a heterocromatina levando ao cromossomo metafásico. Estas MPTs regulam diretamente a estrutura da cromatina e, assim, os processos celulares mediados por DNA. O diagrama indica algumas modificações em resíduos específicos: (Me) metilação, (AC) acetilação e (P): fosforilação. Diversas modificações nos diferentes resíduos da cauda das histonas estão sendo mostradas, onde S, K e R representam serina, lisina e arginina, respectivamente. Outras possíveis modificações existem, mas não estão representadas.

Fonte: Khan, Reddy e Gupta (2015).

## 2.4 Papel das MPTHs no câncer

Embora os mecanismos epigenéticos sejam essenciais para sustentar o desenvolvimento e a homeostase tecidual específica do organismo, uma desregulação nesses processos pode levar à instalação de estados patológicos, incluindo o câncer. Com o maior entendimento sobre a etiologia multifatorial do câncer atribuída pelos rápidos avanços no campo da biologia molecular, agora está bem estabelecido que as células tumorais abrigam alterações epigenéticas globais ao lado dos vários tipos de eventos genéticos, havendo uma interação complexa e circunstancial entre esses dois fenômenos (IRIMIE *et al.*, 2018). Assim, os mecanismos epigenéticos também cooperam com a alteração genética no desenvolvimento do câncer em todos os estágios, afetando vários tipos de genes como, por exemplo, proto-oncogenes, genes supressores de tumores, genes apoptóticos e genes de reparo do DNA (KHAN; REDDY; GUPTA, 2015).

Evidências crescentes sugerem que tanto a desregulação dos mecanismos de controle das MPTHs quanto o aumento desordenado destes, são condições que estão intimamente associadas com os eventos da carcinogênese, incluindo crescimento celular, diferenciação, desregulação e morte celular (TZAO *et al.*, 2009). O fato de as MPTHs serem parâmetros flexíveis do genoma capazes de sofrer aumento e /ou alteração frente aos estímulos externos facilita a compreensão do mecanismo pelo qual hábitos como fumar, beber, dieta, meio ambiente e infecções podem afetar o DNA das células em um padrão tecido-específico (IRIMIE *et al.*, 2018). A presença constante desses estímulos nocivos poderá levar a um direcionamento inadequado e/ou aumento excessivo de enzimas modificadoras de histonas, levando à expressão ou repressão inadequada de genes individuais que desempenham papéis importantes na tumorigênese (KHAN *et al.*, 2016). O padrão de MPTHs poderá ser diferente, dependendo do tipo de influência externa e do contexto celular em que se encontra, sendo que essas diferenças contribuem para o surgimento de comportamentos celulares característicos e que já não possuem mais seu padrão epigenético homeostático. Esse padrão é coordenado pela atividade de enzimas que são capazes de adicionar ou remover, por exemplo, grupos metil e acetil e também interagir funcionalmente para estabelecer um perfil epigenético favorável ao aparecimento do câncer (CHEN *et al.*, 2013).

A literatura atual conta com a descrição de MPTHs em praticamente todos os tipos tumorais (PORTELA; ESTELLER, 2010). Em muitos tipos de câncer, o nível global de algumas MPTHs já pode ser considerado um marcador em potencial, podendo estar associado

com o diagnóstico e/ou prognóstico da doença (SELIGSSON *et al.*, 2009; KURDISTANI *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013). Os níveis celulares de MPTHs também podem prever respostas a certos agentes quimioterápicos, servindo como biomarcadores preditivos que poderiam ser usados para tomar decisões clínicas sobre a escolha e o curso da terapia (PORTELA; ESTELLER, 2010; CHEN *et al.*, 2012).

#### 2.4.1 Metilação

A metilação de histonas constitui um dos principais tipos de MPTHs capaz de interferir na atividade transcricional através da remodelação da cromatina (LE *et al.*, 2014). A adição ou remoção de grupamentos metil em aminoácidos presentes nas caudas amino-terminais de histonas pode tanto promover quanto impedir a atividade transcricional (KOUZARIDES, 2007; VERDE *et al.*, 2017). Outro ponto importante é o fato de que estas duas funções podem variar segundo a isoforma da histona modificada, a posição do resíduo na cauda, a quantidade de sítios metilados e a forma de metilação do resíduo (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). As histonas são metiladas nas cadeias laterais dos resíduos de lisina, arginina e histidina de forma covalente. Diferentemente do que ocorre nos processos de acetilação e fosforilação, a metilação não altera a carga elétrica global da molécula (DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

As histonas metiltransferases (HMT) de lisina consistem em duas classes de enzimas principais, a saber: a família que contém o domínio *Set* e a família *Dot*. Todas as HMT que metilam as lisinas na porção N-terminal contêm o chamado domínio *SET*, o qual abriga a atividade enzimática. Além disso, essas HMTs catalisam a transferência de um grupo metil de *S*-adenosilmetionina para um grupo  $\epsilon$ -amino de lisina (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). A quantidade de ligações e os padrões de ligação dos resíduos do local ativo determinarão se a enzima realiza mono-, di- ou trimetilação do seu resíduo de lisina alvo (VERDE *et al.*, 2017). Cada tipo de enzima HMT atuará de forma diferente e com resultados variados, estando na dependência do tipo de resíduo de aminoácido que irá atuar, bem como da posição em que ele se encontra na cauda de uma determinada histona (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). Por exemplo, quando as HMTs EZH1 e EZH2 atuam na H3K27 trimetilada, ocorre compactação da cromatina e repressão transcricional (DESJARLAIS; TUMINO, 2016).

##### 2.4.1.2 Di e trimetilação em H3K4



Diferentes estudos já demonstraram que a metilação de resíduos de lisina da histona H3 participa da regulação da estrutura da cromatina, sendo a modificação em K4 associada à eucromatina em atividade transcricional. A trimetilação (me3) em H3K4 é frequentemente observada em sítios promotores, sendo, portanto, associada ao aumento da transcrição gênica enquanto a dimetilação (me2) em H3K4 tende a estar presente na região 3' (*downstream*) de genes ativos (KIMURA, 2013).

A literatura traz poucos estudos analisando a presença de di e trimetilação em H3K4 no CCEB, tampouco explora o potencial deste fenômeno epigenético como biomarcador diagnóstico e prognóstico, ou, ainda, como possível alvo molecular para novos agentes quimioterápicos (GASCHE; GOEL, 2012; GONZÁLEZ-RAMIREZ *et al.*, 2014). Os fenômenos de metilação em H3K4 relatados apresentaram, de modo geral, expressão diferencial em amostras de tecido epitelial bucal normal, displásico e neoplásico, com destaque para o aumento de me2 e redução de me3 ao longo das etapas de progressão neoplásica. Piyathilake *et al.* (2001) identificaram, através de ensaio imuno-histoquímico, um percentual significativamente maior de células positivas para H3K4me2 em amostras de epitélio oral displásico e de CCEB quando comparados ao tecido não afetado. Mancuso *et al.* (2009) identificaram por *western blotting* diferentes padrões de metilação em H3K4 em amostras de CCEB, leucoplasia bucal e mucosa normal. Nesse estudo, os níveis de H3K4me2 e H3K4me3 foram significativamente diferentes nessas lesões quando comparados ao tecido normal, estando os níveis de H3K4me2 maiores do que H3K4me3 no tecido tumoral. No entanto, apesar destes autores ressaltarem a participação do aumento dessas MPTHs no processo de transformação maligna do epitélio oral, o papel da H3K4me3 ainda foi inconclusivo. Em outro estudo, a imunomarcagem para H3K4me3 também foi identificada em diferentes estágios do CCEB, porém nenhuma correlação com variáveis clinicopatológicas foi observada (CHEN *et al.*, 2013). Este mesmo estudo apontou, entretanto, que combinações de diferentes MPTHs podem influenciar no prognóstico e na sobrevida dos pacientes.

Essas diferenças na expressão de H3K4me2 e me3 nos tecidos neoplásicos da cavidade oral sugerem que elas podem ter papéis distintos no processo de tumorigênese, considerando que os tipos de genes e suas respectivas funções são afetados de acordo com o nível de expressão da metilação. Análises de imunoprecipitação de cromatina revelaram níveis elevados de H3K4me3 associados à alta expressão de mRNA do gene *KRT13* em linhagens de células de CCEB bem diferenciado (HaCaT e HSC4), e diminuição da expressão de H3K4me3 no sítio promotor desse gene em linhagens de células pobremente diferenciadas deste tumor (HSC3 e SAS), sugerindo um mecanismo de silenciamento deste gene, o qual é

responsável pela diferenciação do epitélio estratificado escamoso em células epiteliais malignas (NAGANUMA *et al.*, 2014).

Em carcinomas localizados fora da região da cabeça e pescoço, o grau da metilação em H3K4 também foi capaz de gerar respostas celulares diferentes. A expressão de H3K4me2 foi associada aos processos de proliferação, angiogênese e adesão celular através da modulação da expressão dos genes *MYC*, *HOX* e *BRCA1*, enquanto H3K4me3 foi associada à proliferação, invasão e apoptose por meio da regulação dos genes *N-MYC*, *CRKL*, *WNT10B*, *RIZ*, *hTERT*, *ciclina G1* e *CDK2* (FÜLLGRABE; KAVANAGH; JOSEPH, 2011).

De modo geral, uma baixa expressão de H3K4me2 tem sido associada com um pior prognóstico. Li *et al.* (2017) analisaram a expressão imuno-histoquímica da metilação em H3K4 em células epiteliais e glandulares do endométrio, identificando níveis diferentes de H3K4me2 e H3K4me3 nas células epiteliais de carcinomas e lesões pré-cancerosas. Uma menor expressão de H3K4me2 no epitélio glandular neoplásico apresentou uma associação significativa com o estadiamento clínico, indicando que a H3K4me2 poderia não somente ter influenciado na transformação do câncer de endométrio, mas também em uma maior invasividade do tumor. Baixos níveis de H3K4me2 também foram observados em amostras de carcinoma de mama, apresentando prognóstico mais desfavorável nos pacientes portadores de carcinoma de células basais e tumores positivos para HER-2 (ELSHEIKH *et al.*, 2009).

Lin *et al.* (2010) mostraram que a perda de H3K4me2 mediada pela desmetilase de histona do gene KDM1A está associada à transição epitélio-mesênquima (TEM) em células de câncer de mama humano. Os níveis celulares de H3K4me2 também foram avaliados para prever o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de pulmão e carcinoma de rim, sendo que uma reduzida expressão foi associada com menor sobrevida (SELIGSON *et al.*, 2009). Em amostras de câncer colorretal metastático, uma correlação entre a expressão de H3K4me2 e gradação histológica tumoral também foi observada, onde uma maior expressão foi identificada nos tumores bem ou moderadamente diferenciados. Já os baixos níveis desta modificação foram associados à menor taxa de sobrevida, sendo que esta MPTH foi considerada um fator preditivo de sobrevida (TAMAGAWA *et al.*, 2012). A baixa expressão de H3K4me2 foi associada à presença de invasão perineural e menor taxa de sobrevida de pacientes com câncer pancreático (WATANABE *et al.*, 2012). Um padrão de marcação intensa para H3K4me2 foi observado nos *fronts* de invasão de amostras de melanoma, havendo, contudo, uma redução de sua expressão em tumores metastáticos quando comparados aos tumores primários (KAMPILAFKOS *et al.*, 2015).

A hipótese de que padrões diferentes de metilação em H3K4 podem influenciar no prognóstico dos pacientes oncológicos foi confirmada recentemente a partir de um estudo de meta-análise realizado por Li, Shen e Chen (2018). As diferenças de expressão de H3K4me2 e H3K4me3 foram consideradas um fator preditivo de prognóstico para câncer de pulmão, cólon, pâncreas, fígado, esôfago e cervical, uma vez que pacientes com menor expressão de H3K4me2 e maior expressão de H3K4me3 tiveram sobrevida geral reduzida, respectivamente. Corroborando este achado, Beyer *et al.* (2017) identificaram correlação entre elevada expressão nuclear de H3K4me3 e reduzida sobrevida geral dos pacientes com câncer cervical. Em carcinoma de células renais, maiores níveis de H3K4me2 e H3K4me3 foram correlacionados com diferentes variáveis clinicopatológicas, como metástase linfonodal e infiltração da vesícula seminal (ELLINGER *et al.*, 2010). No carcinoma hepatocelular, níveis elevados de H3K4me3 correlacionaram com menores taxa de sobrevida em pacientes com tumores em estágios I e II, sendo considerada, portanto, um marcador de prognóstico desfavorável (HE *et al.*, 2012).

#### 2.4.2 Acetilação

Dentre todas as MPTHs, a acetilação da lisina é a modificação mais importante associada à transcrição, arquitetura da cromatina e reparo do DNA (KOUZARIDES, 2007). As mudanças estruturais que ocorrem na cromatina (eucromatina e heterocromatina) são movidas principalmente pelos eventos de acetilação e desacetilação, os quais são rregulados pela ação oposta de duas famílias de enzimas: acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) de histonas (LI; SETO, 2016). As HATs são responsáveis por catalisar a transferência de acetil-coenzima A ao grupo amino-terminal dos resíduos de lisina, enquanto que as HDACs agem no sentido contrário (LIU *et al.*, 2017). Os grupos acetil adicionam cargas negativas às lisinas com carga positiva, levando a uma diminuição da interação entre DNA e histonas e também diminuindo as interações entre as caudas de histonas de nucleossomos vizinhos, fato que contribui ainda mais com descompactação, já que permite ao nucleossomo compactado se abrir e dar acesso a maquinaria de transcrição ao sítio promotor gênico. Quando o DNA local é exposto, aumenta-se o acesso aos fatores de transcrição, promovendo aumento significativo na transcrição do DNA (CASTILHO; SQUARIZE; ALMEIDA, 2017). Já a remoção do grupo acetil pelas HDACs permite que as histonas interajam mais fortemente ao DNA para promover a compactação dos nucleossomos, o que pode efetivamente silenciar a transcrição gênica (ZHANG *et al.*, 2015; WEBBER *et al.*,

2017). Assim, a acetilação pode afetar a função dos cromossomos através de dois mecanismos distintos: (1) alterando a carga eletrostática das histonas e mudando as suas propriedades estruturais e ligantes do DNA, ou (2) podendo criar, estabilizar, romper ou ocluir os domínios de interação na cromatina, os bromodomínios, nos quais as proteínas de leitura poderão atuar. Os bromodomínios agem como um andaime para a montagem de complexos macromoleculares dos vários componentes que regulam a acessibilidade da cromatina e para o recrutamento de proteínas transcricionais chave como a RNA polimerase. As proteínas contendo bromodomínios são consideradas “*readers*” do código de histonas (GIL; TORRES; ENCARNACIÓN-GUEVARA, 2017).

O fenômeno de acetilação de histonas nas neoplasias tem sido associado tanto com a ativação de oncogenes e inativação dos genes de reparo de DNA e de *checkpoints*, respectivamente. Além disso, a alteração do padrão de acetilação foi identificada como marcador comum para vários tumores humanos (MASCOLO *et al.*, 2012).

Os padrões de acetilação e desacetilação em H3 e a relação destes com fatores clinicopatológicos já foram descritos em vários tipos de cânceres, sendo que os resultados relacionados ao impacto na sobrevida dos pacientes são bastante variados. Expressões menores dos níveis globais de acetilação em H3 foram correlacionados com estágio tumoral avançado, metástase à distância e progressão tumoral nos carcinomas de células renais (MOSASHVILLI *et al.*, 2010). Outros resultados semelhantes também foram encontrados em tumores pancreáticos, os quais baixos níveis de expressão de histonas acetiladas apresentaram uma menor taxa de sobrevida (MANUYAKORN *et al.*, 2010). Em câncer de mama, níveis baixos a moderados de acetilação de H3K9 e H3K18 também demonstraram ser marcadores de bom prognóstico; em carcinoma de esôfago essas alterações estavam associadas com melhor taxa de sobrevida, principalmente para os tumores em estágios iniciais (TZAO *et al.*, 2009).

Em relação ao CCEB, a literatura conta com poucos estudos, os quais descreveram alterações na acetilação de resíduos de lisina em H3, sendo que a associação desta MPTH com os fatores de prognóstico e sobrevida não está clara (CHEN *et al.*, 2013; WEBBER *et al.*, 2017; CASTILHO, SQUARIZE, ALMEIDA, 2017). A redução de H3K9ac está associada com o aumento da proliferação celular e ativação da transição epitelial-mesênquima, durante a carcinogênese oral, sugerindo o envolvimento do H3K9ac na progressão tumoral do CCEB (WEBBER, 2017). Além disso, baixos níveis de H3K4ac e altos níveis de H3K18ac estão associados à progressão e mau prognóstico do CCEB (CHEN *et al.*, 2013). Freitas Filho (2018) pesquisou as MPTHs em queilite actínica (QA) e no carcinoma epidermoide de lábio

para as seguintes histonas H3K36me3, H3K9ac, H4K12ac e H3S10ph. As análises concluíram que nas duas lesões H3K36me3 e H3S10ph apresentaram menores valores de expressão em relação ao tecido labial normal. Além disso, também houve diminuições das expressões de H3K9ac e H4K12ac no grupo de QA.

#### 2.4.2.1 Acetilação em H3K14.

A expressão de H3K14ac é ainda pouco explorada em câncer. Em carcinoma de tireoide, os níveis de H3K14ac foram significativamente maiores quando comparado ao tecido normal (PUPPIN *et al.*, 2012). Em câncer de próstata avançado também foi observado um aumento de H3K14ac (LEE; YANG; LINDAHL *et al.*, 2017). De forma similar, a relação de H3K14c com o CCEB é também pouco explorada. A expressão diferencial da acetilação de H3K14ac pode ser observada em tumores avançados (estágio II) comparado com os tecidos normais (ARIF *et al.*, 2010). Neste estudo, os autores relataram um aumento da acetilação de H3K14 mediado por p300, a uma das principais HATs, sugerindo que a inibição desta enzima poderia inclusive ser considerada um alvo terapêutico. Em modelos experimentais de carcinogênese oral, maiores níveis de H3K14ac também foram identificados na língua de camundongos tratados com etanol e 4-NQO, sugerindo um mecanismo epigenético de indução de carcinoma mediado por estes carcinógenos (URVALEK *et al.*, 2015).

#### 2.4.3 Acetilação de K14 se correlaciona com a metilação em H3K4

A identificação de uma infinidade de MPTHs, algumas correlacionadas com a ativação, outras com repressão, levaram à proposta de que as modificações constituem um código de histonas, na qual um conjunto dessas modificações pode executar funções específicas, mas dependentes umas das outras. Assim, cenários mais complexos surgem quando as modificações das histonas atuam de forma combinatória e de um modo dependente do contexto para facilitar ou reprimir a transcrição mediada pela cromatina (LEE; SMITH; SHILATIFARD, 2010).

Acredita-se que essas combinações possam gerar resultados funcionais diferentes, provavelmente devido ao recrutamento das proteínas de suporte como bromo e cromodomínios, que são capazes de reconhecer especificamente resíduos de lisina acetilada e metilada, respectivamente (BEDI *et al.*, 2014). Dessa forma, em um mesmo ambiente celular, a acetilação da lisina está majoritariamente associada à acessibilidade do maquinário de transcrição à cromatina, enquanto que a lisina não segue necessariamente

este mesmo padrão e, dependendo da localização do aminoácido onde ocorrerá a metilação e também do seu grau (bi ou trimetilação), poderá ocorrer tanto a ativação como a repressão da transcrição gênica (TAVERNA *et al.*, 2006).

Um exemplo disso foi reportado por Nakanishi *et al.* (2008), nesse estudo, eles demonstraram que os níveis de acetilação do H3K14 poderiam afetar a metilação do H3K4. Os pesquisadores descobriram que H3K14ac mutada era capaz de anular a trimetilação de H3K4me3 de forma global, resultando na perda específica de trimetilação em H3K4, mas não da (mono ou di) metilação dela. Tanto a acetilação de H3K14 como os padrões de metilação globais de H3K4 mostraram uma localização semelhante às extremidades 5' dos genes ativamente transcritos, e a presença de trimetilação H3K4 pôde ser correlacionada com a hiperacetilação da histona H3K14. Além disso, os autores descreveram dois complexos enzimáticos, *GCN5-SAGA* e *Sas3-NuA3*, capazes de acetilarem K14, sendo a subunidade *NuA3* (*Yng1*) responsável por se ligar também em H3K4me3, sugerindo-se que essas duas MPTHs se estabilizam mutuamente.

A partir desta revisão de literatura foi possível descrever o que as pesquisas atuais relatam sobre o impacto das MPTHs no desenvolvimento, progressão e tratamento do câncer, observando-se inclusive que alguns padrões já estão sendo sugeridos como preditores de diagnóstico e prognóstico em vários tipos de tumores. Entretanto, com relação ao CCEB, ainda não houve relatos significativos, principalmente relacionando as modificações H3K4me2-3 e H3K14ac a este tipo de tumor. Observando-se que estes três tipos de MPTH apresentam características importantes relacionadas aos eventos de ativação e inibição da transcrição gênica, nossa proposta é avaliar a expressão destas MPTHs em um grupo de pacientes com CCEB, na tentativa de encontrar resultados relacionados com o comportamento biológico deste tumor, que possam contribuir para melhora do prognóstico e sobrevida dos pacientes.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar as expressões das MPTHs H3k4me2, H3K4me3 e H3K14ac interferem no comportamento biológico tumoral do CCEB.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Analisar a existência entre a expressão das MPTHs estudadas e fatores sociodemográficos e clinicopatológicos de indivíduos com CCEB primários não metastáticos (PNM) e metastáticos.
- Avaliar a existência de correlação entre a expressão destas MPTHs e metástases em pacientes com CCEB.
- Avaliar a existência de marcadores moleculares que possam influenciar no diagnóstico e prognóstico dos pacientes (PNM) e (PM) acometidos por CCEB.
- Avaliar a existência de associação entre a expressão das MPTHs afeta a sobrevida geral dos pacientes com CCEB.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

O CCEB é um tumor maligno que apresenta etiologia multifatorial e prognóstico ominoso. Embora haja um esforço da comunidade científica para identificar marcadores diagnóstico e prognóstico dos pacientes acometidos por neoplasias malignas, não existe nenhum estudo com CCEB que tenha encontrado um biomarcador que possa ser usado rotineiramente para essas finalidades. Em algumas neoplasias malignas, o papel da epigenética como um fator determinante para o desenvolvimento e progressão tumoral já está bem estabelecido, fato que ainda não é possível em relação ao CCEB. Recentes estudos desenvolvidos pelo nosso grupo têm contribuído para o melhor entendimento dos fenômenos epigenéticos no CCEB, mas ainda há muito que aprender sobre a relação entre epigenética e desenvolvimento e progressão tumoral. Nesse sentido, estudos que buscam identificar o padrão de MPTHs em células tumorais são fundamentais num primeiro momento, pois, a partir disso, pode-se desenvolver drogas modificadoras do perfil epigenético de células tumorais de um determinado tumor, tal que a sua biologia possa ser alterada em benefício do paciente. Portanto, o estudo das MPTHs pode ser um caminho promissor na identificação de marcadores de CCEB.



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU), sob CAAE: 52906815.7.0000.5152.

### 5.1 Casuística

As amostras selecionadas para esta pesquisa consistiram de 90 casos de CCEB obtidos, retrospectivamente, do Hospital de Clínicas, Hospital do Câncer e Hospital Odontológico da Universidade Federal de Uberlândia durante o período de 2006 a 2013. Os critérios de inclusão no estudo foram os seguintes: (1) período mínimo de dois anos de acompanhamento, (2) dados sócio-demográfico e clinicopatológico completos e (3) confirmação da presença ou não de metástase linfonodal. Já os critérios de exclusão de casos no estudo foram (1) a ausência de material suficiente para investigação antigênica, (2) pacientes portadores de tumores primários de orofaringe por apresentar patogenia diferente dos tumores primários de cavidade bucal e (3) ausência de menção nos prontuários médicos quanto a presença ou não de metástase. Todos os casos elegíveis para o estudo foram revistos histologicamente para confirmação de seus diagnósticos usando os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde de 2005. A revisão de todos os casos foi feita por dois patologistas experientes que usaram as lâminas originais de cada paciente coradas em H&E.

Os dados sociodemográficos e clinicopatológicos levantados nos prontuários médicos dos pacientes selecionados foram: idade, gênero, consumo de álcool, tabagismo, sintomatologia, história familiar de câncer, progressão do câncer, localização primária do tumor, dimensões do tumor (<4 cm e >4 cm), estadiamento (inicial [I e II] e avançado [III e IV]), gradação histológica, tempo de evolução (<3 meses e >3 meses), condição clínica e sobrevida. O estadiamento dos pacientes foi definido de acordo com o sistema TNM estabelecido pela *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (NI *et al.*, 2015), conforme ilustrado na Quadro 1. A gradação histológica dos tumores foi determinada de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (EL NAGGAR *et al.*, 2005), a qual estabelece a classificação em três categorias: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. Para confirmação da ocorrência de metástase locorregional, utilizou-se exames radiográficos e/ou tomografia computadorizada, seguida de confirmação por exame histopatológico dos linfonodos coletados durante a remoção cirúrgica do tumor. A partir da confirmação das metástases, os

pacientes foram estratificados em primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM) para fins comparativos da expressão das MPTHs e outras análises estatísticas.

QUADRO 1. Estadiamento clínico tumoral segundo os critérios estabelecidos pela *Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e da *American Committee on Cancer* (AJCC)

ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO
I	T1N0M0
II	T2N0M0
III	T3N0M0, ou T1, T2, T3 com N1
VI	T3N0M0 ou qualquer T com N2, N3, ou qualquer lesão com M

Legenda: (T) tumor, (N) metástase locorregional, (M) metástase a distância

Fonte: dados da pesquisa

## 5.2 Tissue Microarray (TMA)

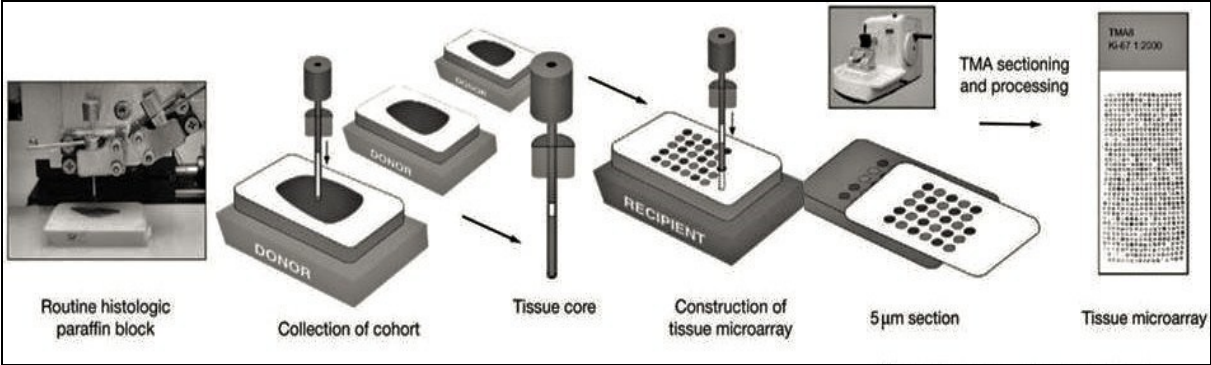
Para o estudo da expressão das MPTHsH3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac, realizou-se a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (TMA) (BATTIFORA, 1986). Esta técnica consiste na agregação de diferentes amostras de tecidos em um bloco parafinado normal, denominado “bloco receptor”, permitindo assim a realização do teste de imunohistoquímica de várias amostras, simultaneamente, em uma única lâmina e com uma pequena dose de anticorpo.

Inicialmente, os blocos parafinados dos casos selecionados e suas respectivas lâminas coradas em H&E foram usados para selecionar as áreas de interesse. Para os casos com mais de um bloco, decidiu-se por usar o bloco contendo maior quantidade de tecido tumoral. A seleção das duas áreas de interesse foi realizada com auxílio de microscópio de luz (Nikon) em aumento de 10x, optando-se por regiões situadas lateralmente e contendo a maior quantidade de células neoplásicas. As áreas selecionadas foram, então, marcadas na lâmina com caneta preta e depois no bloco correspondente por sobreposição.

Para confecção do TMA (FIG. 3), utilizou-se o *core facillite* do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA). Primeiro, uma agulha de captura de 1 mm de diâmetro foi introduzida no bloco doador e, em seguida, transferida para o bloco receptor obedecendo um padrão de matriz espaçado de precisão com núcleos de um milímetro de diâmetro. A localização de cada amostra tumoral no TMA em duplicata foi devidamente identificada no mapa, ilustrado na Figura 4. A partir do

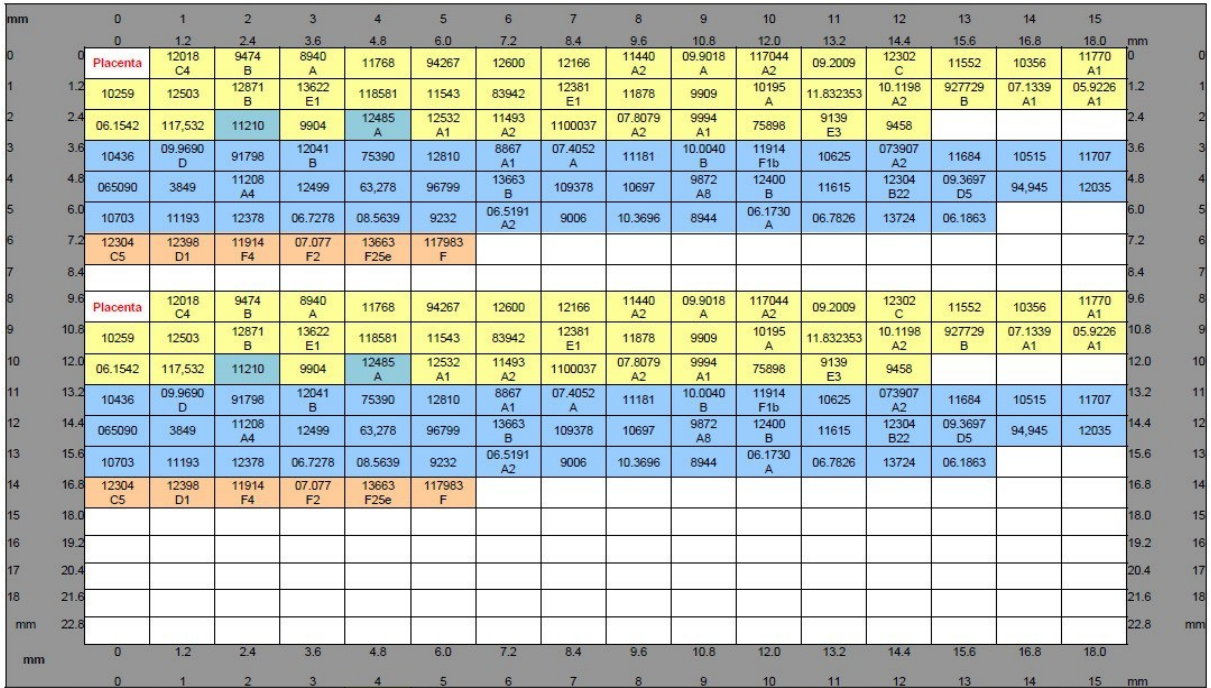
bloco receptor foram obtidos vários cortes, sendo o primeiro e o último corados com H&E e os demais submetidos ao ensaio imuno-histoquímico.

FIGURA 3. Esquema ilustrando a técnica de montagem do TMA



A área pré-definida é retirada do bloco doador e o fragmento é recolocado no bloco receptor. Depois da adaptação de todos os fragmentos, bloco é cortado em micrótomo e processado.  
Fonte: Giltnane e Rimm (2004)

FIGURA 4. Mapa do TMA mostrando a posição de cada amostra tumoral na lâmina



As amostras de tumores PNM e PM estão identificadas em amarelo e azul, respectivamente. Os casos em laranja representam as lesões metastáticas.  
Fonte: dados da pesquisa

### 5.3 Ensaio imuno-histoquímico

Os ensaios imuno-histoquímicos para detecção de H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac foram realizados aplicando-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase seguindo as recomendações do fabricante. Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos a partir do bloco receptor do TMA e montados em lâminas polarizadas StarFrost (Knittel Glaser, Brunsquive, BS, Alemanha).

Os cortes foram inicialmente submetidos a dois banhos em xilol para desparafinação, o primeiro em estufa a 56°C durante 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 15 minutos. Procedeu-se a hidratação dos cortes em concentrações decrescentes de etanol, com dois banhos em etanol a 100% e um banho em etanol a 95% e 80%, durante cinco minutos cada. A remoção do pigmento formólico foi realizada com solução de hidróxido de amônio a 10% e etanol a 95% por 10 minutos, seguida de sete banhos em água destilada.

Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em EDTA a 1mM, tamponado com hidróxido de sódio, até atingir pH 8,0. Os cortes foram, em seguida, aquecidos em panela de pressão por 67 minutos e resfriados em 10 banhos de água destilada. O bloqueio da atividade da biotina endógena foi realizado com a imersão dos cortes em solução filtrada contendo duas claras de ovo dissolvidas em 200 mL de água deionizada (15 minutos à temperatura ambiente), seguida de 10 banhos em água destilada. Para bloqueio da avidina endógena, os cortes foram imersos em solução preparada com 30g de leite em pó desnatado e 180 mL de água deionizada (15 minutos à temperatura ambiente), com 10 banhos subsequentes em água destilada. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi obtido com três banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio a 10V. Após 5 banhos em água destilada, os cortes foram submetidos a três banhos de cinco minutos em solução de Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) à temperatura ambiente. Após três banhos de cinco minutos em água destilada, os cortes foram incubados por 15 minutos na solução Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Em seguida os cortes foram incubados por duas horas em câmara úmida e à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos primários: (ab:8580; ab:52946; ab: 2039-52, Abcam, Cambridge, UK) (QUADRO 2).

Os cortes foram então lavados com Tris-HCl em dois banhos de dois minutos cada. Procedeu-se a incubação dos cortes com anticorpo secundário através da imersão deles na solução Trekkie Universal Link (Biocare Medical, Concord, CA, EUA), por 20 minutos em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram submetidos a dois banhos de dois minutos em Tris-HCl e incubados com complexo terciário à base de estreptavidina conjugada à peroxidase

(Trekkie Avidin-HRP Label, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) durante 10 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, seguido de dois banhos de dois minutos em Tris-HCl.

Para revelação da reação, foi aplicado cromógeno 3,3'-tetrahidroclorato de diaminobenzidina (Betazoid DAB Chromogen Solution, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por cinco minutos, com subsequente lavagem em água corrente por mais cinco minutos. Por último, os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris, lavados em água corrente, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70% a 100%) durante 10 minutos, submetidas em secagem em estufa a 60°C e montadas com lamínulas de vidro e resina histológica (Permout, Fisher Scientific International, Pittsburgh PA, EUA). Os controles negativos foram obtidos através da omissão dos anticorpos primários, enquanto que os controles positivos consistiram em amostras teciduais de osteossarcoma para H3K4me2, câncer de testículo para H3K4me3 e câncer cervical para H3K14ac.

QUADRO 2. Anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos

ANTICORPO	ORIGEM	CÓDIGO	FONTE	DILUIÇÃO	CONTROLE POSITIVO
Anti-histona H3 (di-metil-K4)	Policlonal coelho	Ab-7766	Abcam	1:1000	Osteosarcoma
Anti-histona H3 (tri-metil-K4)	Policlonal coelho	Ab-8580	Abcam	1:1000	Câncer testículo
Anti-histona H3 (acetil-K14)	Monoclonal - coelho	Ab-2039-52	Abcam	1:500	Câncer cervical

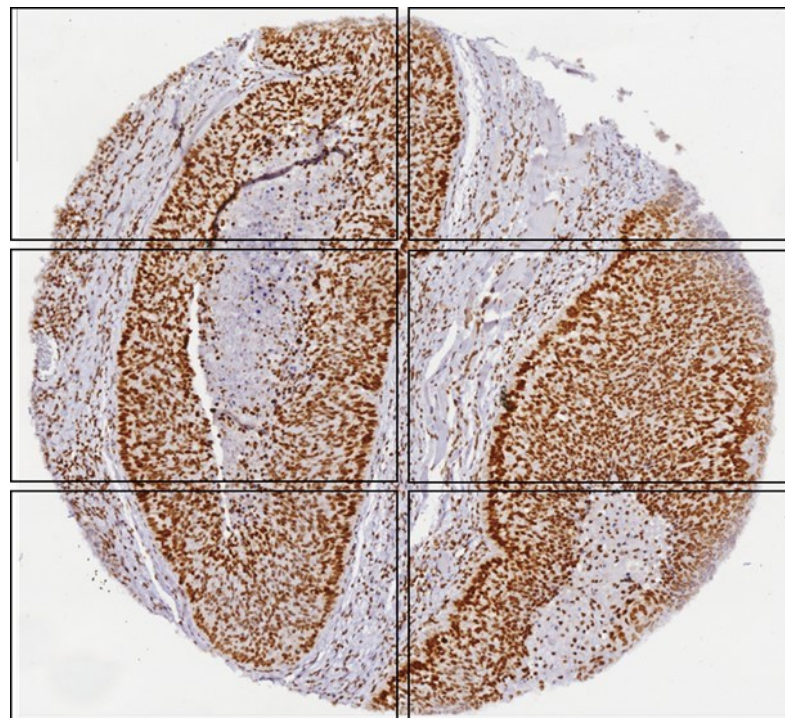
Fonte: dados da pesquisa

#### 5.4 Análise da imuno-histoquímica

Inicialmente, as lâminas contendo os *spots* de TMA dos 90 casos de CCEB foram escaneadas em aumento de 200x usando o *Slide Scanner Aperio AT2* (Leica Biosystems Imaging, Inc., Nussloch, Alemanha) acoplado a um computador (Dell Precision T3600). Posteriormente, cada “spot” foi fotografado individualmente, mantendo-se o mesmo aumento. Para que toda a amostra tumoral fosse analisada, cada “spot” foi dividido em 6 quadrantes, sendo que novas imagens (agora segmentadas) foram capturadas, percorrendo-se toda a amostra conforme ilustrado na figura 5. Caso houvesse dúvidas em relação à presença ou não de CCEB antes da captura da imagem, o mesmo local era previamente analisado no *spot* correspondente corado em H&E. Os locais sem tecido tumoral ou que apresentaram falhas no TMA não foram selecionados.

Para análise de imunomarcação de cada histona, dois grupos foram separados a partir do mapa do TMA, sendo 42 casos do grupo PNM e 48 casos do grupo PM. Dessa forma, foram feitas de 4 a 6 capturas de imagens em cada "spot", totalizado em média 252 campos para o grupo PNM e 288 campos do grupo PM, sendo isso feito para cada uma das 3 histonas separadamente.

FIGURA 5. Imagem ilustrativa evidenciando a forma como foram capturadas as imagens para posterior análise no *software* ImageJ

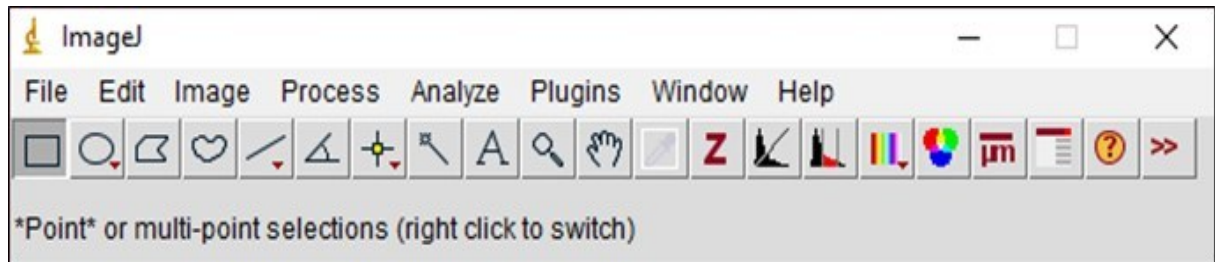


O exemplo acima corresponde a um *spot* de TMA do grupo PM marcado para a histona H3K14ac  
 Fonte: elaboração para a tese

Para a análise da imunomarcação, foi utilizado o *software* ImageJ (*Image Processing and Analysis in Java*, versão 1.38e/Java 1.5.0\_09) (FIG. 6). A intensidade nuclear de cada um dos anticorpos foi obtida com o uso da ferramenta do índice nuclear de densidade óptica integrada (*integrated optical density*, IOD), conforme descrito anteriormente (RASBAND, 2018).



FIGURA 6. Tela inicial do *ImageJ* contendo diferentes ícones relativos às ferramentas utilizadas em morfometria



Fonte: ImageJ Features (2018)

#### 5.4.1 Calibração do *ImageJ*

Previamente à análise propriamente dita, foi realizada a calibração da distância e da escala de cinza, selecionando-se a aba *Set scale*. A calibração da distância foi realizada com o objetivo de determinar o número de *pixels* presentes em uma distância conhecida, permitindo o estabelecimento da relação entre intensidade da marcação e a quantidade de *pixels* na área avaliada. Para tanto, foi mensurada a distância em pixels (398) da barra de escala, utilizando-se uma das fotomicrografias. Em seguida, os valores referentes à *known distance* (200) e *unit of length* ( $\mu\text{m}$ ), sendo também marcado o item *Global*, necessário para que esta configuração fosse aplicada à todas imagens analisadas subsequentemente (FIG. 7).

FIGURA 7. Calibração da distância e escala de cinza

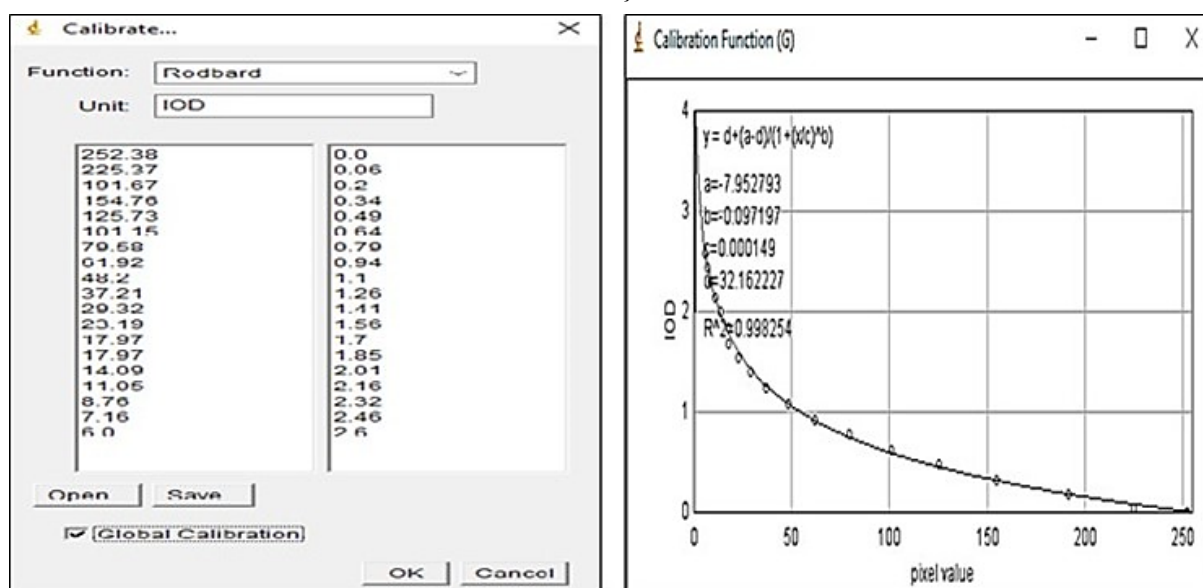


Em (A) a seta indica a barra de medida em  $\mu\text{m}$  (200) utilizada para calibração. Em (B) janela de inserção de dados para calibração de dimensão, sendo que o dado *Distance in Pixels* (398) aparece automaticamente. Os valores para *Known Distance* (200) e *Unit of Length* ( $\mu\text{m}$ ) são inseridos como mostrado.

Fonte: dados da pesquisa

Para a quantificação da intensidade de marcação, realizou-se a calibração da escala de cinza, permitindo a conversão desses valores em densidade óptica integrada (IOD) que, por sua vez, representa a relação entre área e valores médios de cinza. Nesta etapa, foram inseridos os valores relativos aos intervalos de densidade de cinza fornecidos por uma escala previamente calibrada (Kodak nº 3), acessando-se na barra de ferramentas do ImageJ o item *Analyze* e *Calibrate*. Em seguida, foi selecionada a *Rodbard*, tendo como unidade o IOD. Os valores da escala de cinza foram inseridos conforme o protocolo disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration>. A relação entre os valores de *pixel* e de IOD foi obtida, então, através de um gráfico contendo uma curva exponencial. Para que a mesma calibração fosse atribuída a todas as imagens, selecionou-se o item *Global Calibration* (FIG. 8).

FIGURA 8. Conversão da intensidade da marcação em IOD



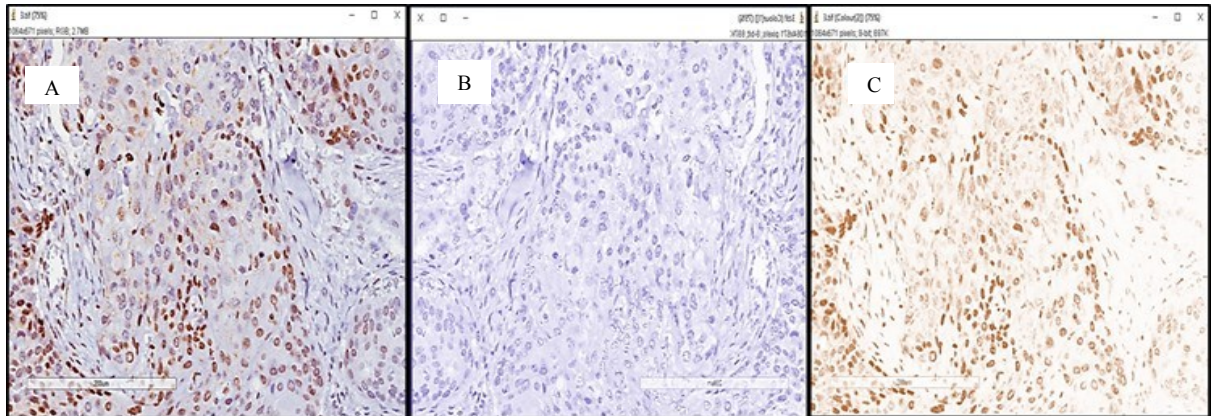
Em (A) Janela de inserção de dados para calibração de absorvância, relativos aos valores de densidade de cinza.  
Em (B) Janela de inserção de dados para calibração de absorvância, relativos aos valores de densidade de cinza.  
Fonte: elaboração para a tese

Finalizadas as etapas de calibração, procedeu-se à análise quantitativa da imunomarcação para H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac. As fotomicrografias com a marcação dos anticorpos, obtidas de cada quadrante dos *spots* foram, primeiramente, convertidas em imagens binárias por meio da seleção da opção *Image, Type 8-bit* na barra de ferramentas. As regiões contendo áreas sem tecido (extremidades laterais do *spot*) e também locais contendo apenas estroma foram apagadas utilizando a ferramenta *Eraser* na seção *Draw Tools*. Em seguida, as imagens foram submetidas à deconvolução de cor, selecionando as



opções *Plugins*, *Colour functions* e *Colour de convolution*, optando-se pelo vetor HDAB. A deconvolução da imagem original resultou na imagem contendo marcação de hematoxilina de Harris e outra mostrando a marcação em DAB (FIG. 9).

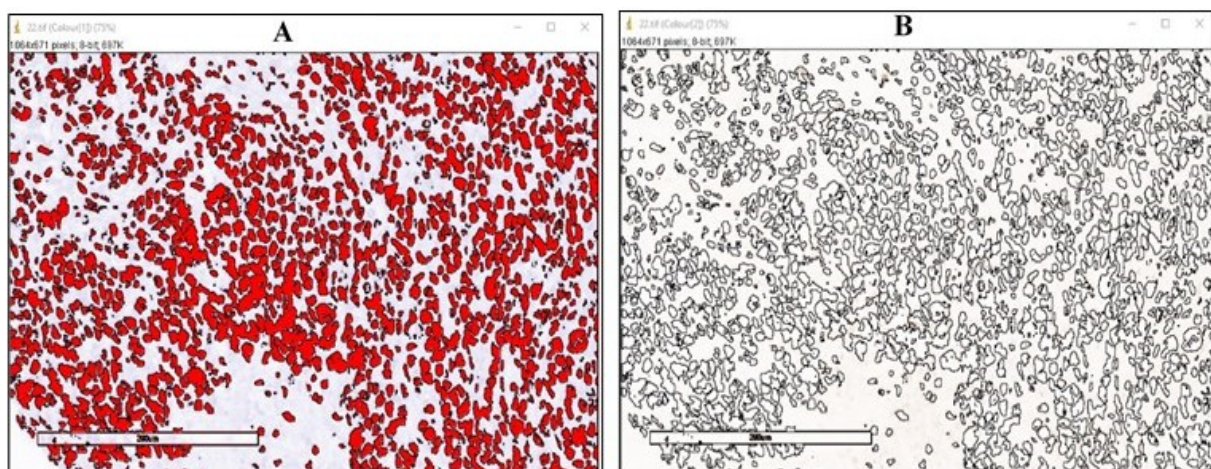
FIGURA 9. Deconvolução da imagem: imagem parcial de CCEB



A) imagem original após imunomarcacão; (B) área mostrada em (A) após a deconvolução, revelando apenas o parênquima corado por hematoxilina; (C) área ilustrada em (A) mostrando imunomarcacão em DAB. Aumento original 200 x (Fonte: Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial- FOUFU)

A partir da imagem de hematoxilina, foi criada uma seleção envolvendo apenas os núcleos das células tumorais clicando-se no item *Edit* na barra de ferramentas do ImageJ, seguido de *Selection* e *Create Selection*. A aplicação desta seleção na imagem de DAB tem a finalidade de criar uma máscara que possibilita a quantificação da imunomarcacão restrita à área nuclear (FIG. 10)

FIGURA 10. Seleção dos núcleos



(A) Seleção de núcleos a partir da imagem de hematoxilina para criação da máscara que será utilizada na imagem de DAB. (B) Imagem de DAB com a máscara aplicada proveniente da imagem de hematoxilina, demonstrando que somente os núcleos marcados são selecionados para mensuração.

Fonte: Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial – FOUFU

FIGURA 11. Cálculo do valor médio de IOD

	A	B	C	D	E	F	G
1		Label	Area	Mean	StdDev	IntDen	%Area
2		1 3849.1.tif	38355.85	0.59	0.36	22731.14	100
3		2 3849.2.tif	31114.87	0.69	0.39	21607.10	100
4		3 3849.3.tif	46931.90	0.79	0.41	37154.23	100
5		4 3849.4.tif	55770.31	0.83	0.43	46148.83	100
6		5 3849.5.tif	27315.22	0.71	0.41	19479.03	100
7		6 3849.6.tif	27191.74	0.69	0.39	18660.04	100
8							
9	Mean		37779.98	0.72	0.40	27630.06	100
10	SD		11608.50	0.08	0.03	11321.05	0
11	Min		27191.74	0.59	0.36	18660.04	100
12	Max		55770.31	0.83	0.43	46148.83	100
13							

Em vermelho, média obtida após análises de todos os seis spots obtidos de um dos casos avaliados

Fonte: dados da pesquisa

Com isso, foi possível obter os valores médios de IOD para as MPTHs estudadas. O IOD foi calculado para cada uma das imagens pertencentes ao spot, sendo que posteriormente uma média de IOD total foi considerada para cada caso (FIG. 11).

## 5.5 Análise estatística

A edição dos dados e análises estatísticas foram processada a partir da avaliação de medidas de centro, variação e forma de distribuição dos dados para cada variável. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi usado para testar a hipótese de normalidade. Para as variáveis medidas em escala intervalar ou de razão, as comparações entre os grupos PM e PNM foram feitas por meio do teste de Mann-Whitney-Wilcoxon. O teste de Mann-Whitney, também conhecido como Teste U de Wilcoxon-Mann-Whitney, é uma prova não-paramétrica capaz de comparar por meio da estatística de teste U, com média  $\mu_U$  e desvio padrão  $\sigma_U$ , duas amostras independentes do mesmo tamanho ou desiguais, cujos escores tenham sido medidos em escala minimamente ordinal.

As variáveis medidas em escala nominal foram comparadas por meio do coeficiente de contingência quadrático médio ( $\phi^2$ ). O coeficiente de contingência quadrático médio usa o valor da estatística  $Q^2$ . No entanto, o  $\phi^2$  corrige a dependência crescente dos valores de  $Q^2$  com o n-amostral para que essa medida não seja influenciada pela dimensão da amostra.

A busca de correlações entre as variáveis foi processada por meio do teste de correlação de Spearman ( $\rho$ ) e os resultados foram organizados em matrizes de correlação. O teste de correlações de Spearman é um teste livre de distribuição e tem o objetivo de avaliar o grau de associação linear entre duas variáveis sendo ainda capaz de considerar ligeiras fugas da linearidade. Por meio do coeficiente Rhô ( $\rho$ ) de Spearman é possível avaliar a existência de associação entre as variáveis bem como a força e o sentido dessa associação.

As avaliações dos efeitos de variáveis externas moduladoras foram feitas por análises multivariadas usando o modelo de riscos proporcionais de Cox. Essa análise consiste em uma análise de regressão múltipla aplicada à análise de sobrevida e adequada quando se precisa avaliar a independência de variáveis ao agir como fator multiplicativo do risco. Nesse afã, além do método ‘enter’, o método ‘Stepwise’ para as variáveis que mostraram p-valor  $\leq 0,25$  nas regressões bivariadas de Cox foram testados.

A análise de sobrevida foi feita pelo método não paramétrico de Kaplan-Meier e os grupos foram comparados por meio dos testes de Log Rank (Mantel-Cox), Breslow (Generalized Wilcoxon) e Tarone-Ware. Para as análises de sobrevida a população foi categorizada em valores de expressão de cada histona acima (altos) e abaixo (baixos) do *cut off point* obtido por meio da análise de sensibilidade e especificidade em curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). A análise em curva ROC também objetivou avaliar cada histona como bioindicador de metástase.

Os testes foram feitos por meio dos softwares Origin ® 9.0, PASW Statistics ® 17 e Bioestat 5.3. Em todos os testes foram considerados os resultados como significantes quando  $\alpha \leq 0.05$  e considerados com significância limítrofe quando  $0.05 \leq \alpha \leq 0.10$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Dados sociodemográficos e clinicopatológicos

A partir dos prontuários médicos, foram coletadas as principais características sociodemográficas e clinicopatológicas dos 90 casos de CCEB (TAB. 1). A maioria dos pacientes eram do sexo masculino (75,5%) com mais de 55 anos (52,3%), média de 60 anos (variação de 34 a 99 anos). Com relação ao tabagismo e etilismo, quase todos os pacientes apresentavam estes hábitos, sendo 90% e 79% respectivamente. Quanto à história familiar, a maioria tinha casos de câncer na família (45,6%). O sítio anatômico mais acometido foi a língua (41,1%). Lesões com aspecto ulcerativo foram as mais observadas (84,4%). Mais da metade dos nossos pacientes relataram algum tipo de sintoma (83,3%), sendo dor (35,5%) e disfagia (31,9%) os mais frequentemente observados. Para a maioria dos pacientes, o tempo de evolução foi superior a 3 meses (64,4%). Lesões em estágio avançado foram as mais comuns (67,7%). Quarenta e oito pacientes (53,3%) desenvolveram metástases locorregionais, dos quais apenas dois (4,2%) tinham metástases à distância, enquanto os outros 42 não apresentaram doença metastática até o último atendimento ambulatorial. Quanto à classificação histológica, dos casos com informações registradas, a maioria dos tumores foi classificada como bem diferenciada (27,7%), seguido de moderadamente/pobremamente diferenciado (22,9%). Apesar de a maioria dos casos ter sido diagnosticada com a doença em estágio avançado, a recorrência foi de apenas 22,2%. Para os tipos de tratamento empregados, o tratamento trimodal (cirurgia, quimioterapia e radioterapia-CQR) foi o mais empregado (34,4%).

Para comparar os dados clinicopatológicos entre os grupos PMN e PM, foi aplicado o teste de contingência quadrático médio ( $\phi^2$ ). Com esse teste, observou-se uma associação, com diferenças significantes, para as variáveis tamanho do tumor ( $p=0,01$ ) e estadiamento ( $p<0,0001$ ). De forma similar, uma diferença estatística entre eles foi observada quanto ao tipo de tratamento, no caso, cirurgia ( $p=0,002$ ). No grupo PMN, houve um número maior de pacientes que foram tratados apenas com cirurgia, provavelmente pelo fato deles apresentarem lesões em estágio inicial.

TABELA 1. Análise descritiva dos dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos 90 pacientes com CCEB

VARIÁVEIS	PACIENTES	PNM	PM	P VALOR *
<b>Gênero</b>				
<i>Masculino</i>	68(75,5%)	29 (69%)	39 (81,2%)	
<i>Feminino</i>	22 (24%)	13 (31%)	9 (18,8%)	
<b>Idade</b>				
<i>≤ 55 anos</i>	43 (44,7%)	18 (42,8%)	25 (52,1%)	
<i>&gt; 55 anos</i>	47(52,3%)	24 (57,2%)	23 (47,9%)	
<b>Tabagismo</b>				
<i>Sim</i>	81 (90%)	36 (85,8%)	45 (93,7%)	
<i>Não</i>	7 (7,7%)	4 (9,5%)	3 (6,3%)	
<i>NI</i>	2 (2,35)	2 (4,7%)	0 (0%)	
<b>Etilismo</b>				
<i>Sim</i>	71 (79%)	32 (76,2%)	39 (81,2%)	
<i>Não</i>	16 (17,7%)	8 (19%)	8 (16,7%)	
<i>NI</i>	3 (3,3 %)	2 (4,8%)	1 (2,1%)	
<b>História familiar de câncer</b>				
<i>Sim</i>	41 (45,6%)	18 (42,9%)	23 (47,9%)	
<i>Não</i>	40 (44,5%)	17 (40,4%)	23 (47,9%)	
<i>NI</i>	9 (10%)	7 (16,7%)	2 (4,2%)	
<b>Sintomatologia</b>				
<i>Presente</i>	75 (83,3%)	32 (76,2%)	43 (89,6%)	
<i>Ausente</i>	11 (12,2%)	7 (16,7%)	4 (8,3%)	
<i>NI</i>	4 (4,5%)	3 (7,1%)	1 (2,1%)	
<b>Evolução</b>				
<i>≤ 3 meses</i>	28 (31,1%)	17 (40,5%)	11 (22,9%)	
<i>&gt; 3 meses</i>	58 (64,4%)	24 (57,1%)	34 (70,8%)	
<i>NI</i>	4 (4,5%)	1 (2,4%)	3 (6,3%)	
<b>Localização</b>				
<i>Língua</i>	37 (41,1%)	15 (35,7%)	22 (45,8%)	
<i>Assoalho bucal</i>	25 (27,8%)	14 (33,3%)	11 (22,9%)	
<i>Outro local</i>	28 (31,1%)	13 (31%)	15 (31,3%)	
<b>Tamanho</b>				
<i>≤ 4 cm</i>	39(43,3%)	23(54,8%)	16 (33,3%)	0,01
<i>&gt; 4 cm</i>	37 (41,1%)	11 (26,2%)	26 (54,2%)	
<i>NI</i>	14(15,6%)	8 (19%)	6 (12,5%)	
<b>Estágio clínico</b>				
<i>Inicial</i>	27 (30%)	22 (52,4%)	5 (10,4%)	< 0,0001
<i>Avançado</i>	61 (67,7%)	19 (45,2%)	42 (87,5%)	
<i>NI</i>	2 (2,3%)	1 (2,4%)	1 (2,1%)	
<b>Metástase</b>				
<i>Presente</i>	48 (53,3%)	0	48 (53,3%)	
<i>Ausente</i>	42 (46,7%)	42 (100%)	0 (0%)	

NI: não informado; PNM: grupo primário não metastático; PM: grupo primário metastático

\* Análise comparativa pelo teste de contingência quadrático médio ( $\Phi^2$ ), com  $\alpha < 0,05$ .

Fonte: dados da pesquisa

[Continua...]

Continuação da Tabela 1

VARIÁVEIS	PACIENTES	PNM	PM	P VALOR *
<b>Classificação histológica</b>				
Bem diferenciado	25 (27,7%)	11 (26,2%)	14 (29,2%)	
Moderadamente/pobremente diferenciado	18 (20%)	7 (16,7%)	11 (22,9%)	
NI	47 (52,3%)	24 (57,1%)	23 (47,9%)	
<b>Recidiva</b>				
Presente	20 (22,2%)	12 (28,6%)	8 (16,7%)	
Ausente	48 (53,3%)	18 (42,8%)	30 (62,5%)	
NI	22 (24,5%)	12 (28,6%)	10 (20,8%)	
<b>Tratamento</b>				
Cirurgia	13 (14,5%)	11 (26,2%)	2 (4,2%)	0,002
Radioterapia	10 (11,1%)	3 (7,1%)	7 (14,6%)	
Cirurgia + radioterapia	13 (14,5%)	7 (16,7%)	6 (12,5%)	
Quimioterapia + radioterapia	21 (23,35)	7 (16,7%)	14 (29,2%)	
Trimodal	31 (34,3%)	12 (28,5%)	19 (39,5%)	
NI	2 (2,2%)	2 (4,8%)	0 (0%)	
<b>Condição clínica</b>				
Vivo com doença primária	22 (24,4%)	11 (26,2%)	11 (22,9%)	
Vivo sem doença	31 (34,5%)	20 (47,6%)	11 (22,9%)	
<b>Óbito</b>	37 (41,1%)	11 (26,2%)	26 (54,2%)	

NI: não informado; PNM, grupo primário não metastático; PM, grupo primário metastático

\* Análise comparativa pelo teste de contingência quadrático médio ( $\Phi^2$ ), com  $\alpha < 0,05$ .

Fonte: dados da pesquisa

## 6.2 Expressão imuno-histoquímica de H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac no CCEB.

Todas as amostras de tumores foram positivas para os três MPTHs investigadas e suas intensidades variaram entre os grupos (FIG. 13 e 14). Em geral a expressão foi nuclear, embora algumas células tumorais tenham exibido imunorreatividade no citoplasma, o que foi interpretado como inespecífico e não foi considerado na análise. Da mesma forma, as células estromais também revelaram positividade nuclear, mas de intensidade variável. A figura 12 apresenta a distribuição dos valores de IOD para cada modificação de histonas nos grupos PNM e PM. Além disso, observou-se que a mediana da expressão de H3K4me3 foi maior que as demais, permanecendo também a mais alta no grupo PM quando comparado com o grupo PNM.

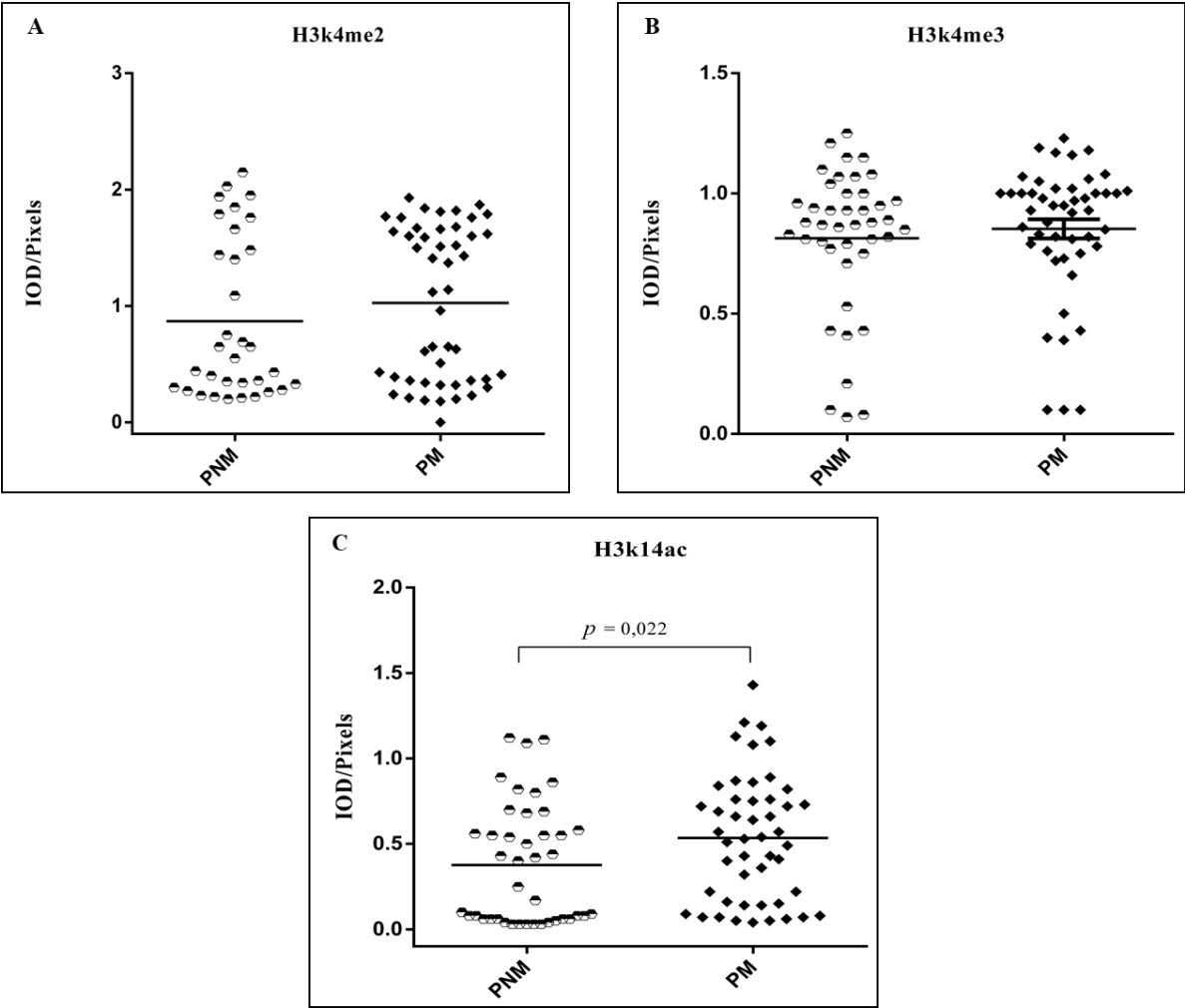
Comparando a expressão das MPTHs entre os dois grupos, observou-se uma expressão significativamente maior de H3K14ac no grupo PM do que no grupo PNM ( $p=0,022$ ) (TAB. 2). Este resultado sugere que H3K14ac pode desempenhar algum papel na ocorrência de metástases no CCEB.

TABELA 2. Cálculo da expressão das MPTHs investigadas entre os grupos PNM e PM

MPTH	N	POSTO MÉDIO	SOMA DOS POSTOS	Z	<i>p</i> *
H3K4me2	PNM=42	42.81	1798.00	-914	0.361
	PM=48	47.85	2297.00		
	Total=90				
H3K4me3	PM=42	42.92	1802.50	-878	0.380
	PM=48	47.76	2292.50		
	Total=90				
H3K14ac	PNM=42	38.76	1628.00	-2290	<b>0.022</b>
	PM=48	51.40	2467.00		
	Total=90				

\* Teste U Mann-Whitney com valores de  $\alpha < 0,05$ .  
Fonte: dados da pesquisa

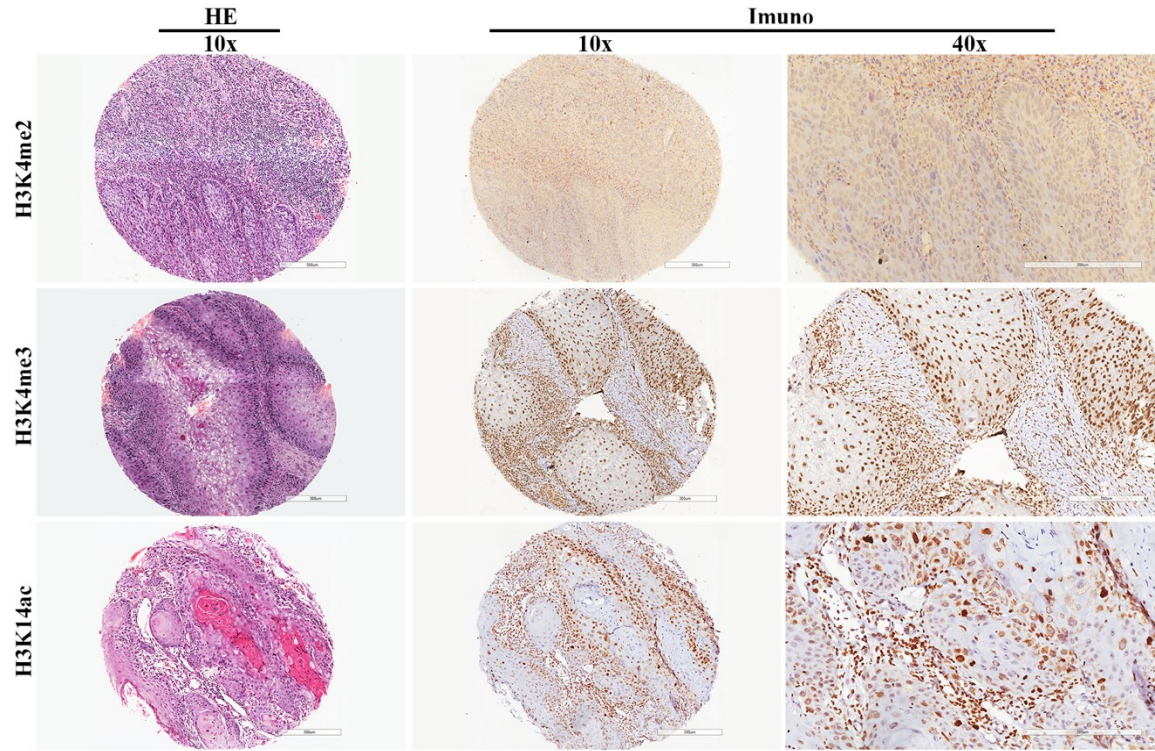
FIGURA 12. Distribuição de casos do grupo PNM e PM de acordo com a expressão das MPTHs H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac nos grupos PNM e PM



(IOD) índice de densidade ótica integrada, (PNM) pacientes não metastáticos, (PM) pacientes metastáticos.  
Teste U Mann-Whitney com valores de  $\alpha < 0,05$   
Fonte: dados da pesquisa

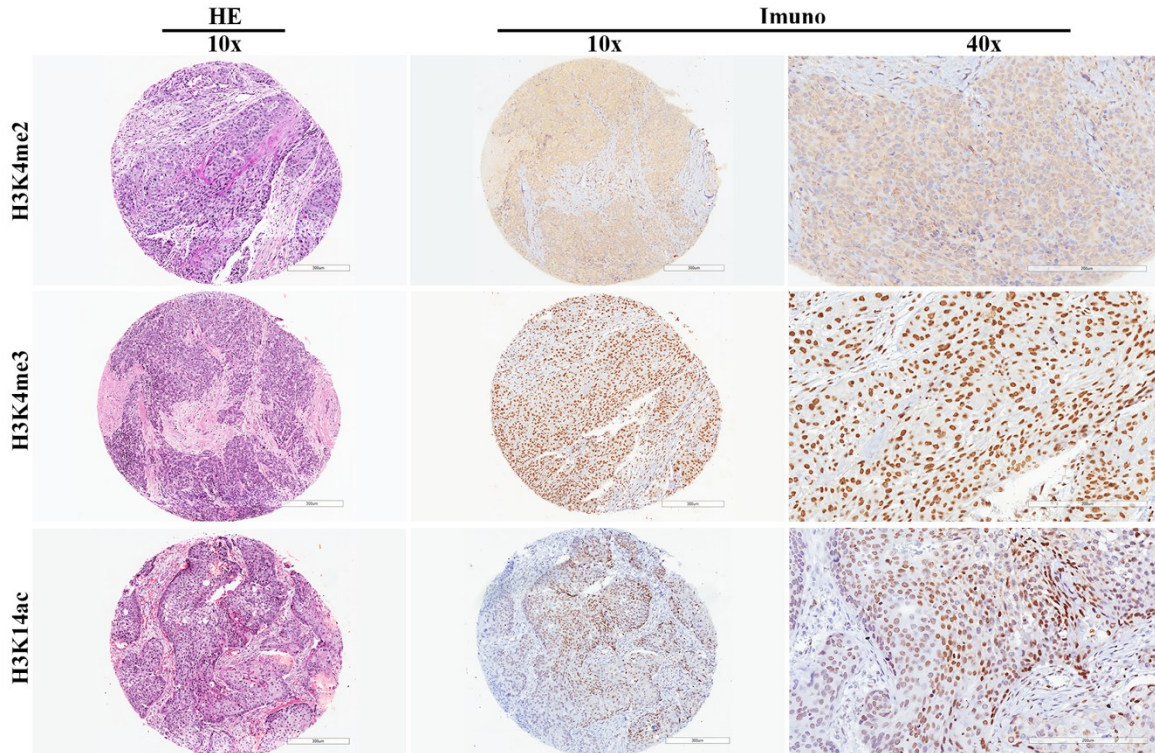


FIGURA 13. Cortes histológicos dos *spots* do TMA corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas no grupo PNM para as MPTHs H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac



Fonte: dados da pesquisa

FIGURA 14. Cortes histológicos dos *spots* do TMA corados em H&E e as respectivas reações imuno-histoquímicas do grupo PM para as MPTHs H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac



Fonte: dados da pesquisa



### 6.3 Análises de correlação das MPTHs com os dados sociodemográficos e clinicopatológicos

Para analisar as prováveis associações das MPTHs estudadas com as características sociodemográficas e clinicopatológicas, foram realizadas análises de correlação de Spearman. As análises foram realizadas no grupo de 90 pacientes e também em nos grupos PNM e PM separadamente. As correlações diretas (valores de  $\rho$  positivos) estão demonstradas pelas barras azuis e as correlações indiretas (valores de  $\rho$  negativos) em vermelho. Os valores de  $p$  significantes estão destacados em amarelo. Para todas as 3 situações (90 pacientes, PNM e PM), houve correlações positivas e significantes entre as três MPTHs estudadas ( $p < 0,001$ ).

Buscando-se uma melhor compreensão das MPTHs com todas as variáveis, as matrizes foram didaticamente divididas, agrupando-se as variáveis da seguinte maneira: correlação das MPTHs com os dados sociodemográficos (TAB. 3, 4 e 5), correlação das MPTHs com os dados clinicopatológicos (TAB. 6, 7 e 8) e, por fim, correlação das MPTHs com as modalidades de tratamento, condição clínica após o tratamento e sobrevida (TAB. 9, 10 e 11).

Na análise de correlação entre as MPTHs e os dados sociodemográficos, observou-se para o grupo dos 90 pacientes uma correlação direta entre H3K4me3 e tabagismo ( $p < 0,05$ ). Outras correlações diretas significantes foram observadas entre etilismo, gênero masculino ( $p < 0,001$ ) e tabagismo ( $p < 0,01$ ), e correlação indireta significativa entre idade e etilismo ( $p < 0,05$ ) (TAB. 3).

TABELA 3. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis sociodemográficas em todos os pacientes

Todos os pacientes		H3K4me2	H3K4me3	H3K14ac	sexo	idade	tabagismo	etilismo	história familiar de câncer
H3K4me2	Spearman ( $\rho$ )	1.0000	0.4139	0.6170					
	p-valor	--	< 0.001	< 0.001					
H3K4me3	Spearman ( $\rho$ )	0.4139	1.0000	0.4698					
	p-valor	< 0.001	--	< 0.001					
H3K14ac	Spearman ( $\rho$ )	0.6170	0.4698	1.0000					
	p-valor	< 0.001	< 0.001	--					
sexo	Spearman ( $\rho$ )	0.0089	0.0100	0.0188	1.0000				
	p-valor	0.9351	0.9200	0.8620	--				
idade	Spearman ( $\rho$ )	0.0958	0.0900	-0.0201	-0.1091	1.0000			
	p-valor	0.3747	0.4040	0.8520	0.3203	--			
tabagismo	Spearman ( $\rho$ )	0.0099	0.2490	0.0207	0.2942	-0.1276	1.0000		
	p-valor	0.9269	< 0.05	0.8480	< 0.01	0.2418	--		
etilismo	Spearman ( $\rho$ )	-0.0123	0.0789	0.1054	0.6848	-0.2373	0.4968	1.0000	
	p-valor	0.9112	0.4720	0.3370	< 0.001	< 0.05	< 0.01	--	
história familiar de câncer	Spearman ( $\rho$ )	-0.0634	-0.0845	-0.0581	0.1880	0.0750	0.1356	0.1080	1.0000
	p-valor	0.5740	0.4530	0.6063	0.0972	0.5084	0.2274	0.3432	--

FONTE dados da pesquisa

No grupo PNM, as variáveis gênero-etilismo e etilismo-tabagismo mantiveram uma significância, ambas com ( $p < 0,001$ ) (TAB. 4). No grupo PM, H3K4me3 e tabagismo voltaram a apresentar significância direta ( $p < 0,05$ ) e apenas a variável gênero masculino manteve-se significativa com correlação direta com etilismo ( $p < 0,001$ ) e indireta com idade ( $p < 0,01$ ) (TAB. 5). Este resultado sugere a presença de indivíduos etilistas mais jovens no grupo PM.

TABELA 4. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis sociodemográficas para o grupo PNM

	PNM	H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	sexo	idade	tabagismo	etilismo	história familiar de cancer
H3k4me2	Spearman (p)	1,0000	0,5128	0,7077					
	p-valor	--	< 0,001	< 0,001					
H3K4me3	Spearman (p)	0,5128	1,0000	0,5471					
	p-valor	< 0,001	--	< 0,001					
H3K14ac	Spearman (p)	0,7077	0,5471	1,0000					
	p-valor	< 0,001	< 0,001	--					
sexo	Spearman (p)	-0,0026	0,1018	-0,0654	1,0000				
	p-valor	0,9874	0,5375	0,6920	--				
idade	Spearman (p)	0,0653	0,0523	-0,0807	0,2357	1,0000			
	p-valor	0,6889	0,7488	0,6200	0,1602	--			
tabagismo	Spearman (p)	0,0722	0,1481	-0,0905	0,4899	-0,1537	1,0000		
	p-valor	0,6579	0,3619	0,5780	< 0,01	0,3570	--		
etilismo	Spearman (p)	-0,0217	0,1842	-0,0787	0,6410	-0,1789	0,6667	1,0000	
	p-valor	0,8945	0,2550	0,6290	< 0,001	0,2826	< 0,001	--	
história familiar de câncer	Spearman (p)	-0,1727	0,0680	0,0511	0,2228	0,0588	0,0103	0,0858	1,0000
	p-valor	0,3213	0,6980	0,7700	0,2127	0,7411	0,9533	0,6243	--

FONTE dados da pesquisa

TABELA 5. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis sociodemográficas para o grupo PM

	PM	H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	sexo	idade	tabagismo	etilismo	história familiar de cancer
H3k4me2	Spearman (p)	1,0000	0,3037	0,5539					
	p-valor	--	< 0,05	< 0,001					
H3K4me3	Spearman (p)	0,3037	1,0000	0,3798					
	p-valor	< 0,05	--	< 0,01					
H3K14ac	Spearman (p)	0,5539	0,3798	1,0000					
	p-valor	< 0,001	< 0,01	--					
sexo	Spearman (p)	0,0039	-0,1156	0,0308	1,0000				
	p-valor	0,9793	0,4338	0,8352	--				
idade	Spearman (p)	0,1460	0,1807	0,0587	-0,3940	1,0000			
	p-valor	0,3220	0,2190	0,6917	< 0,01	--			
tabagismo	Spearman (p)	-0,0652	0,3139	0,0963	0,0965	-0,0969	1,0000		
	p-valor	0,6595	< 0,05	0,5140	0,5142	0,5123	--		
etilismo	Spearman (p)	-0,0151	-0,0604	0,2316	0,7335	-0,2883	0,2326	1,0000	
	p-valor	0,9216	0,6933	0,1258	< 0,001	0,0548	0,1241	--	
história familiar de câncer	Spearman (p)	0,0213	-0,1507	-0,1327	0,1644	0,0870	0,2641	0,1325	1,0000
	p-valor	0,8883	0,3174	0,3794	0,2749	0,5652	0,0761	0,3914	--

FONTE dados da pesquisa

Avaliando-se as MPTHs com as variáveis clinicopatológicas para os 90 pacientes, as seguintes correlações significantes foram observadas: H3K14ac de forma direta com metástase linfonodal ( $p < 0,05$ ); H3K4me3 de forma inversa com diferenciação histológica do tipo bem diferenciado ( $p < 0,05$ ). Dentre as variáveis clinicopatológicas houve significância direta entre sintomas com tempo de evolução ( $p < 0,05$ ), classificação histológica do tipo bem diferenciado (BD) ( $p < 0,01$ ), recidiva ( $p < 0,05$ ), tamanho ( $p < 0,001$ ), estadiamento ( $p < 0,001$ ) e

metástase ( $p < 0,01$ ); e de forma indireta entre estadiamento e classificação histológica ( $p < 0,05$ ), sugerindo que quanto maior o estadiamento menos diferenciado será o tumor (TAB. 6). Em relação ao grupo PNM, encontrou-se correlações diretas de sintomas com: tempo de evolução, classificação histológica e recidiva todos com ( $p < 0,05$ ), além de tamanho e estadiamentos que também se mantiveram significantes ( $p < 0,001$ ). Curiosamente, encontrou-se uma correlação direta e estatística dos tumores localizados em língua com a classificação do tipo bem diferenciado ( $p < 0,01$ ) e também com estadiamento, mas sendo esta, de forma indireta ( $p < 0,01$ ), sugerindo que os tumores de língua geralmente são diagnosticados em estágios mais avançados. Outro dado significativo foi a correlação indireta dos tumores de assoalho bucal com classificação histológica ( $p < 0,05$ ), sugerindo um caráter menos diferenciado para os tumores nessa localização. Além disso, pode-se observar uma correlação indireta entre classificação histológica e estadiamento ( $p < 0,05$ ), sugerindo que tumores menos diferenciados estão em estágios mais avançados (TAB. 7). Em relação ao grupo PM, duas correlações significantes foram observadas, sendo indireta entre H3K4me3 e tumores bem diferenciados ( $p < 0,01$ ) e direta entre tamanho e estadiamento ( $p < 0,01$ ). Outro resultado interessante no grupo PM foi a correlação direta entre H3K4me2 e tumores localizados em língua, o qual apresentou significância limítrofe ( $p = 0,055$ ) (TAB. 8).

TABELA 6. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis clinicopatológicas dos 90 pacientes.

	Todos os pacientes	H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	Sintomas*	evolução**	língua	assoalho	outros	tamanho***	estadiamento*	metastases**	classificação histológica§	recidiva§§
<b>H3k4me2</b>	Spearman (ρ)	1,0000	0,4139	0,6170										
	p-valor	--	< 0,001	< 0,001										
<b>H3K4me3</b>	Spearman (ρ)	0,4139	1,0000	0,4698										
	p-valor	< 0,001	--	< 0,001										
<b>H3K14ac</b>	Spearman (ρ)	0,6170	0,4698	1,0000										
	p-valor	< 0,001	< 0,001	--										
<b>Sintomas*</b>	Spearman (ρ)	-0,0828	-0,0182	-0,0674	1,0000									
	p-valor	0,4487	0,8670	0,5370	--									
<b>evolução**</b>	Spearman (ρ)	-0,0149	0,1185	0,0400	0,2564	1,0000								
	p-valor	0,8918	0,2770	0,7140	< 0,05	--								
<b>língua</b>	Spearman (ρ)	-0,0941	-0,1878	-0,1327	0,0996	0,0746	1,0000							
	p-valor	0,3805	0,0780	0,2140	0,3642	0,4976	--							
<b>assoalho</b>	Spearman (ρ)	0,0438	0,0404	-0,0005	-0,0242	0,0508	-0,5272	1,0000						
	p-valor	0,6836	0,7060	0,9964	0,8262	0,6446	< 0,001	--						
<b>outros</b>	Spearman (ρ)	0,0580	0,1619	0,1428	0,0849	0,1289	-0,5567	-0,4125	1,0000					
	p-valor	0,5890	0,1290	0,1810	0,4401	0,2397	< 0,001	< 0,001	--					
<b>tamanho***</b>	Spearman (ρ)	-0,1752	-0,0108	-0,0366	0,1126	0,1893	-0,0194	-0,0048	0,0258	1,0000				
	p-valor	0,1300	0,9260	0,7530	0,3330	0,1039	0,8686	0,9677	0,8262	--				
<b>estadiamento*</b>	Spearman (ρ)	-0,1111	0,0432	0,1412	-0,0372	0,1465	-0,0922	0,0805	0,0204	0,6591	1,0000			
	p-valor	0,3028	0,6890	0,1890	0,7354	0,1811	0,3957	0,4585	0,8515	< 0,001	--			
<b>metastases**</b>	Spearman (ρ)	0,0840	0,0824	0,2427	0,1407	0,1725	0,1124	-0,1103	-0,0127	0,2940	0,4653	1,0000		
	p-valor	0,4310	0,4400	< 0,05	0,1964	0,1122	0,2944	0,3035	0,9063	< 0,01	< 0,001	--		
<b>classificação histológica§</b>	Spearman (ρ)	0,1178	0,4263	0,1844	0,4458	0,0716	0,2040	0,0908	0,1270	0,1805	-0,3062	0,0511	1,0000	
	p-valor	0,4519	< 0,05	0,2360	< 0,01	0,6566	0,1894	0,5624	0,4170	0,2851	< 0,05	0,7448	--	
<b>recidiva§§</b>	Spearman (ρ)	0,0288	-0,0420	-0,0855	0,2530	0,0074	0,1499	-0,1595	0,0021	-0,0301	-0,1394	-0,2065	0,0867	1,0000
	p-valor	0,8158	0,7340	0,4870	< 0,05	0,9534	0,2262	0,1973	0,9864	0,8243	0,2644	0,0912	0,6314	--

\*Sintomas: S(1); N(0); \*\*evolução: ≤3m (1); >3<6m (2); ≥6m (3); \*\*\*tamanho: ≤4cm (1); >4cm (2); \*estadiamento: inicial (1); avançado (2); \*\*metastases: S(1); N(0); § classificação histológica BD(1); MD/PD(0); §§recidiva: S(1); N(0)

Fonte: dados da pesquisa

TABELA 7: Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis clinicopatológicas para o grupo PNM

	PNM	H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	Sintomas*	evolução**	língua	assoalho	outros	tamanho***	estadiamento*	classificação histológica§	recidiva§§
H3k4me2	Spearman (ρ)	1,0000	0,5128	0,7077									
	p-valor	--	< 0,001	< 0,001									
H3K4me3	Spearman (ρ)	0,5128	1,0000	0,5471									
	p-valor	< 0,001	--	< 0,001									
H3K14ac	Spearman (ρ)	0,7077	0,5471	1,0000									
	p-valor	< 0,001	< 0,001	--									
Sintomas*	Spearman (ρ)	-0,1633	0,0832	-0,0030	1,0000								
	p-valor	0,3206	0,6140	0,9850	--								
evolução**	Spearman (ρ)	0,0995	0,2335	0,2075	0,3713	1,0000							
	p-valor	0,5359	0,1410	0,1930	< 0,05	--							
língua	Spearman (ρ)	0,1353	-0,1477	-0,0390	0,2324	0,0288	1,0000						
	p-valor	0,3929	0,3500	0,8060	0,1545	0,8581	--						
assoalho	Spearman (ρ)	0,0479	0,0750	0,1107	0,1225	0,1491	0,5271	1,0000					
	p-valor	0,7631	0,6360	0,4850	0,4576	0,3522	< 0,001	--					
outros	Spearman (ρ)	0,0914	0,0765	0,1533	0,1225	0,1789	0,4990	0,4734	1,0000				
	p-valor	0,5650	0,6300	0,3320	0,4576	0,2630	< 0,001	< 0,01	--				
tamanho***	Spearman (ρ)	-0,1859	0,2084	0,0032	0,0412	0,1104	-0,2854	0,0593	0,2435	1,0000			
	p-valor	0,2926	0,2360	0,9850	0,8172	0,5343	0,1018	0,7391	0,1652	--			
estadiamento*	Spearman (ρ)	0,1240	0,0186	0,1098	-0,1278	0,0093	0,4012	0,2077	0,2077	0,8266	1,0000		
	p-valor	0,4397	0,9080	0,4940	0,4380	0,9541	< 0,01	0,1927	0,1927	< 0,001	--		
classificação histológica§	Spearman (ρ)	0,0000	0,2091	0,0773	0,5606	0,2303	0,6364	0,5230	0,1612	0,4927	0,5325	1,0000	
	p-valor	1,0000	0,4040	0,7600	< 0,05	0,3579	< 0,01	< 0,05	0,5229	0,0525	< 0,05	--	
recidiva§§	Spearman (ρ)	-0,0039	-0,1887	-0,0709	0,4432	0,0930	0,3564	-0,3021	-0,0308	-0,0863	-0,1691	0,4485	1,0000
	p-valor	0,9836	0,3179	0,7090	< 0,05	0,6315	0,0533	0,1047	0,8718	0,6956	0,3805	0,1664	--

\*Sintomas: S(1); N(0); \*\*evolução: ≤3m (1); >3<6m (2); ≥6m (3); \*\*\*tamanho: ≤4cm (1); >4cm (2); \*estadiamento: inicial (1); avançado (2); § classificação histológica BD(1); MD/PD(0); §§recidiva: S(1); N(0)

Fonte: dados da pesquisa

TABELA 8. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com as variáveis clinicopatológicas para o grupo PM

	PM	H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	Sintomas*	evolução**	língua	assoalho	outros	tamanho***	estadiamento*	classificação histológica§	recidiva§§
H3k4me2	Spearman (ρ)	1,0000	0,3037	0,5539									
	p-valor	--	< 0,05	< 0,001									
H3K4me3	Spearman (ρ)	0,3037	1,0000	0,3798									
	p-valor	< 0,05	--	< 0,01									
H3K14ac	Spearman (ρ)	0,5539	0,3798	1,0000									
	p-valor	< 0,001	< 0,01	--									
Sintomas*	Spearman (ρ)	-0,0647	-0,1040	-0,2334	1,0000								
	p-valor	0,6659	0,4860	0,1140	--								
evolução**	Spearman (ρ)	-0,2205	0,0210	-0,2105	0,0833	1,0000							
	p-valor	0,1455	0,8910	0,1650	0,5864	--							
língua	Spearman (ρ)	-0,2814	-0,1604	-0,2437	-0,0996	0,0901	1,0000						
	p-valor	0,0554	0,2810	0,0988	0,5101	0,5609	--						
assoalho	Spearman (ρ)	0,1056	0,0185	0,1464	0,1481	-0,0307	0,5185	1,0000					
	p-valor	0,4799	0,9010	0,3260	0,3261	0,8433	< 0,001	--					
outros	Spearman (ρ)	0,2093	0,1922	0,1304	-0,0298	-0,0705	-0,6110	-0,3600	1,0000				
	p-valor	0,1581	0,1950	0,3820	0,8444	0,6495	< 0,001	< 0,05	--				
tamanho***	Spearman (ρ)	-0,1800	-0,2246	-0,2064	0,0548	0,1467	0,1418	-0,0114	-0,1447	1,0000			
	p-valor	0,2539	0,1520	0,1890	0,7303	0,3600	0,3764	0,9438	0,3666	--			
estadiamento*	Spearman (ρ)	-0,2213	-0,0331	-0,0687	-0,1078	0,1520	0,1798	0,0320	-0,2244	0,4110	1,0000		
	p-valor	0,1349	0,8253	0,6460	0,4759	0,3246	0,2317	0,8326	0,1338	< 0,01	--		
classificação histológica§	Spearman (ρ)	0,3297	0,5198	0,2404	0,3568	0,0706	0,0987	0,2418	0,0987	0,0278	0,0948	1,0000	
	p-valor	0,1075	< 0,01	0,2470	0,0870	0,7490	0,6388	0,2443	0,6388	0,9049	0,6594	--	
recidiva§§	Spearman (ρ)	0,0618	0,0677	0,0088	0,1435	-0,0636	0,0427	-0,1164	0,0569	0,0716	0,1560	-0,1584	1,0000
	p-valor	0,7123	0,6860	0,9580	0,3969	0,7126	0,8017	0,4928	0,7382	0,6873	0,3565	0,4813	--

\*Sintomas: S(1); N(0); \*\*evolução: ≤3m (1); >3<6m (2); ≥6m (3); \*\*\*tamanho: ≤4cm (1); >4cm (2); †estadiamento: inicial (1); avançado (2); § classificação histológica BD(1); MD/PD(0); §§recidiva: S(1); N(0)

Fonte: dados da pesquisa

Durante a análise de correlação das MPTHs com as modalidades de tratamento, condição clínica e sobrevida, observamos no grupo de 90 pacientes uma correlação inversa entre H3K4me3 e sobrevida dos pacientes ( $p < 0,05$ ), sugerindo que um maior aumento desta modificação está associado com uma pior sobrevida. Outro resultado interessante foi a correlação positiva entre as variáveis sobrevida e condição clínica dos pacientes (VSD) e com modalidade de tratamento trimodal (CQR). Em contrapartida, observou-se uma correlação indireta destas mesmas variáveis (sobrevida e VSD) com a modalidade de tratamento quimioterapia e radioterapia ( $p < 0,001$ ) (TAB. 9). Estes resultados também foram encontrados no grupo PM ( $p < 0,01$ ) (TAB. 12), sugerindo que o tratamento trimodal é a melhor opção para os pacientes com CCEB. Curiosamente foi constatado no grupo PNM uma correlação positiva entre H3k4me3 e tratamento quimioterapia + radioterapia (TAB. 10).

TABELA 9. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com os tipos de tratamentos, condição clínica e sobrevida, para os 90 pacientes

Todos os pacientes		H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	cirurgia	radioterapia	cirurgia+ radioterapia	quimioterapia + radioterapia	trimodal (CQR)	condição clínica (VSD)	condição clínica (VCDP)	condição clínica (VCDM)	condição clínica (O)	sobrevida
H3k4me2	Spearman (p).	1.0000	0,4139	0,6170										
	p-valor	--	< 0.001	< 0.001										
H3K4me3	Spearman (p).	0,4139	1.0000	0,4698										
	p-valor	< 0.001	--	0,0010										
H3K14ac	Spearman (p).	0,6170	0,4698	1.0000										
	p-valor	< 0.001	< 0.001	--										
cirurgia	Spearman (p).	-0,1129	-0,0429	-0,0832	1.0000									
	p-valor	0,2952	0,6910	0,4400	--									
radioterapia	Spearman (p).	0,0451	0,1453	0,0078	-0,1491	1.0000								
	p-valor	0,6764	0,1760	0,9420	0,1657	--								
cirurgia + radioterapia	Spearman (p).	0,0561	-0,1520	-0,0694	-0,1733	-0,1491	1.0000							
	p-valor	0,6036	0,1570	0,5200	0,1063	0,1657	--							
quimioterapia + radioterapia	Spearman (p).	-0,0189	0,0977	-0,0557	-0,2331	-0,2005	-0,2331	1.0000						
	p-valor	0,8613	0,3650	0,6060	< 0,05	0,0611	< 0,05	--						
trimodal (CQR)	Spearman (p).	0,0290	0,0389	0,1579	0,3070	0,2641	0,3070	-0,4129	1.0000					
	p-valor	0,7883	0,7190	0,1410	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,001	--					
condição clínica (VSD)	Spearman (p).	0,0182	-0,0280	0,0258	0,1513	-0,1218	0,0182	-0,2570	0,1843	1.0000				
	p-valor	0,8648	0,7930	0,8090	0,1594	0,2583	0,8667	< 0,05	0,0856	--				
condição clínica (VCDP)	Spearman (p).	-0,0230	0,0563	-0,1175	-0,1132	0,0169	-0,1132	0,0817	0,0841	-0,3672	1.0000			
	p-valor	0,8300	0,5980	0,2690	0,2936	0,8760	0,2936	0,4493	0,4359	< 0,001	--			
condição clínica (VCDM)	Spearman (p).	-0,0572	-0,0608	0,0441	0,0983	-0,0673	0,0983	-0,1052	-0,0075	-0,1413	-0,0896	1.0000		
	p-valor	0,5924	0,5690	0,6790	0,3624	0,5335	0,3624	0,3294	0,9451	0,1841	0,4009	--		
condição clínica (O)	Spearman (p).	0,0213	0,0048	0,0522	-0,0951	0,1302	0,0347	0,2252	-0,2426	-0,6357	-0,4032	-0,1552	1.0000	
	p-valor	0,8421	0,9640	0,6250	0,3781	0,2265	0,7486	< 0,05	< 0,05	< 0,001	< 0,001	0,1442	--	
sobrevida	Spearman (p).	0,0263	-0,2447	0,0193	0,1009	-0,1833	0,1362	-0,3495	0,2576	0,4549	0,0885	0,1203	-0,4190	1.0000
	p-valor	0,8058	< 0,05	0,8560	0,3498	0,0875	0,2059	< 0,001	< 0,05	< 0,001	0,4068	0,2586	< 0,001	--

Fonte: dados da pesquisa



TABELA 10. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com os tipos de tratamentos, condição clínica e sobrevida, para o grupo PNM

	PNM	H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	cirurgia	radioterapia	cirurgia + radioterapia	quimioterapia + radioterapia	trimodal (CQR)	condição clínica (VSD)	condição clínica (VCDP)	condição clínica (VCDM)	condição clínica (O)	sobrevida
H3k4me2	Spearman (ρ)	1,0000	0,5128	0,7077										
	p-valor	--	< 0,001	< 0,001										
H3K4me3	Spearman (ρ)	0,5128	1,0000	0,5471										
	p-valor	< 0,001	--	< 0,001										
H3K14ac	Spearman (ρ)	0,7077	0,5471	1,0000										
	p-valor	< 0,001	< 0,001	--										
cirurgia	Spearman (ρ)	-0,1189	-0,1140	-0,1166	1,0000									
	p-valor	0,4651	0,4830	0,4730	--									
radioterapia	Spearman (ρ)	0,0247	0,2961	0,0082	-0,1754	1,0000								
	p-valor	0,8799	0,0635	0,9590	0,2791	--								
cirurgia + radioterapia	Spearman (ρ)	0,0485	-0,2252	-0,0171	-0,2837	-0,1312	1,0000							
	p-valor	0,7665	0,1620	0,9160	0,0761	0,4199	--							
quimioterapia+ radioterapia	Spearman (ρ)	0,1910	0,3165	0,0371	-0,2837	-0,1312	-0,2121	1,0000						
	p-valor	0,2378	< 0,05	0,8200	0,0761	0,4199	0,1888	--						
trimodal (CQR)	Spearman (ρ)	0,0969	0,1348	0,0923	0,1864	0,3015	0,3015	0,3015	1,0000					
	p-valor	0,5520	0,4070	0,5700	0,2494	0,0587	0,0587	0,0587	--					
condição clínica (VSD)	Spearman (ρ)	-0,1102	0,0708	0,1064	0,1990	-0,0808	-0,0428	-0,1746	0,0328	1,0000				
	p-valor	0,4874	0,6550	0,5020	0,2183	0,6202	0,7931	0,2813	0,8409	--				
condição clínica- (VCDP)	Spearman (ρ)	0,0575	0,1293	0,2111	0,1680	0,0949	0,2303	0,0987	0,2182	0,4979	1,0000			
	p-valor	0,7178	0,4140	0,1790	0,3002	0,5602	0,1529	0,5446	0,1761	< 0,001	--			
condição clínica- (VCDM)	Spearman (ρ)	-0,0185	-0,0323	-0,0092	0,1156	-0,0653	0,1962	-0,1057	-0,1502	-0,2132	-0,1168	1,0000		
	p-valor	0,9077	0,8390	0,9530	0,4775	0,6888	0,2249	0,5164	0,3550	0,1752	0,4614	--		
condição clínica (O)	Spearman (ρ)	0,1877	0,0559	0,0806	0,1285	0,0372	0,1584	0,1584	0,1588	0,5680	0,3111	0,1332	1,0000	
	p-valor	0,2340	0,7250	0,6110	0,4293	0,8197	0,3289	0,3289	0,3276	< 0,001	< 0,05	0,4004	--	
sobrevida	Spearman (ρ)	-0,1645	-0,2048	-0,1158	0,2547	-0,0699	-0,0171	-0,2622	0,0236	0,3540	-0,1484	0,0277	-0,2770	1,0000
	p-valor	0,2979	0,1930	0,4650	0,1128	0,6682	0,9166	0,1021	0,8849	< 0,05	0,3482	0,8619	0,0757	--

Fonte: dados da pesquisa

TABELA 11. Matriz de correlação das MPTHs em CCEB com os tipos de tratamentos, condição clínica e sobrevida, para o grupo PM

PM		H3k4me2	H3K4me3	H3K14ac	cirurgia	radioterapia	cirurgia + radioterapia	quimioterapia + radioterapia	trimodal (CQR)	condição clínica (VSD)	condição clínica (VCDP)	condição clínica (VCDM)	condição clínica (O)	sobrevida
H3k4me2	Spearman (p).	1.0000	0,3037	0,5539										
	p-valor	--	< 0.05	< 0.001										
H3K4me3	Spearman (p).	0,3037	1.0000	0,3798										
	p-valor	< 0.05	--	< 0.01										
H3K14ac	Spearman (p).	0,5539	0,3798	1.0000										
	p-valor	< 0.001	< 0.01	--										
cirurgia	Spearman (p).	-0,1204	0,1656	0,1694	1.0000									
	p-valor	0,4149	0,2605	0,2490	--									
radioterapia	Spearman (p).	0,0234	0,0682	-0,0490	-0,0862	1.0000								
	p-valor	0,8744	0,6451	0,7400	0,5604	--								
cirurgia+ radioterapia	Spearman (p).	0,0705	-0,0751	-0,0796	-0,0788	-0,1562	1.0000							
	p-valor	0,6340	0,6121	0,5900	0,5944	0,2891	--							
quimioterapia+ radioterapia	Spearman (p).	-0,2217	-0,0497	-0,1705	-0,1338	-0,2651	-0,2425	1.0000						
	p-valor	0,1299	0,7375	0,2460	0,3646	0,0686	0,0967	--						
trimodal (CQR)	Spearman (p).	0,1907	0,0200	0,1784	0,1688	0,3345	0,3059	0,5194	1.0000					
	p-valor	0,1942	0,8927	0,2250	0,2515	< 0.05	< 0.05	< 0.001	--					
condição clínica (VSD)	Spearman (p).	0,2742	-0,1134	0,0694	-0,1271	-0,1190	0,0532	-0,2879	0,3695	1.0000				
	p-valor	0,0594	0,4428	0,6390	0,3894	0,4205	0,7197	< 0.05	< 0.01	--				
Condição clínica (VCDP)	Spearman (p).	0,0222	0,2079	0,0162	-0,0933	-0,0264	0,0000	0,0820	-0,0191	-0,2726	1.0000			
	p-valor	0,8810	0,1562	0,9130	0,5284	0,8586	1,0000	0,5796	0,8977	0,0609	--			
Condição clínica- (VCDM)	Spearman (p).	-0,1685	-0,0843	0,1264	-0,0304	-0,0603	-0,0551	-0,0936	0,1802	-0,0889	-0,0652	1.0000		
	p-valor	0,2523	0,5690	0,3910	0,8374	0,6841	0,7098	0,5269	0,2203	0,5479	0,6596	--		
Condição clínica-(O)	Spearman (p).	-0,2128	-0,0302	-0,1102	0,1918	0,1432	-0,0316	0,2223	-0,3669	-0,6625	-0,4862	-0,1586	1.0000	
	p-valor	0,1464	0,8380	0,4550	0,1916	0,3317	0,8311	0,1288	< 0.05	< 0.001	< 0.001	0,2817	--	
sobrevida	Spearman (p).	0,1574	0,2766	0,1132	0,2935	0,2024	0,2001	0,3276	0,4352	0,4772	0,0101	0,1632	0,4799	1.0000
	p-valor	0,2855	0,0571	0,4430	0,0429	0,1677	0,1727	< 0.05	< 0.01	< 0.001	0,9457	0,2677	< 0.001	--

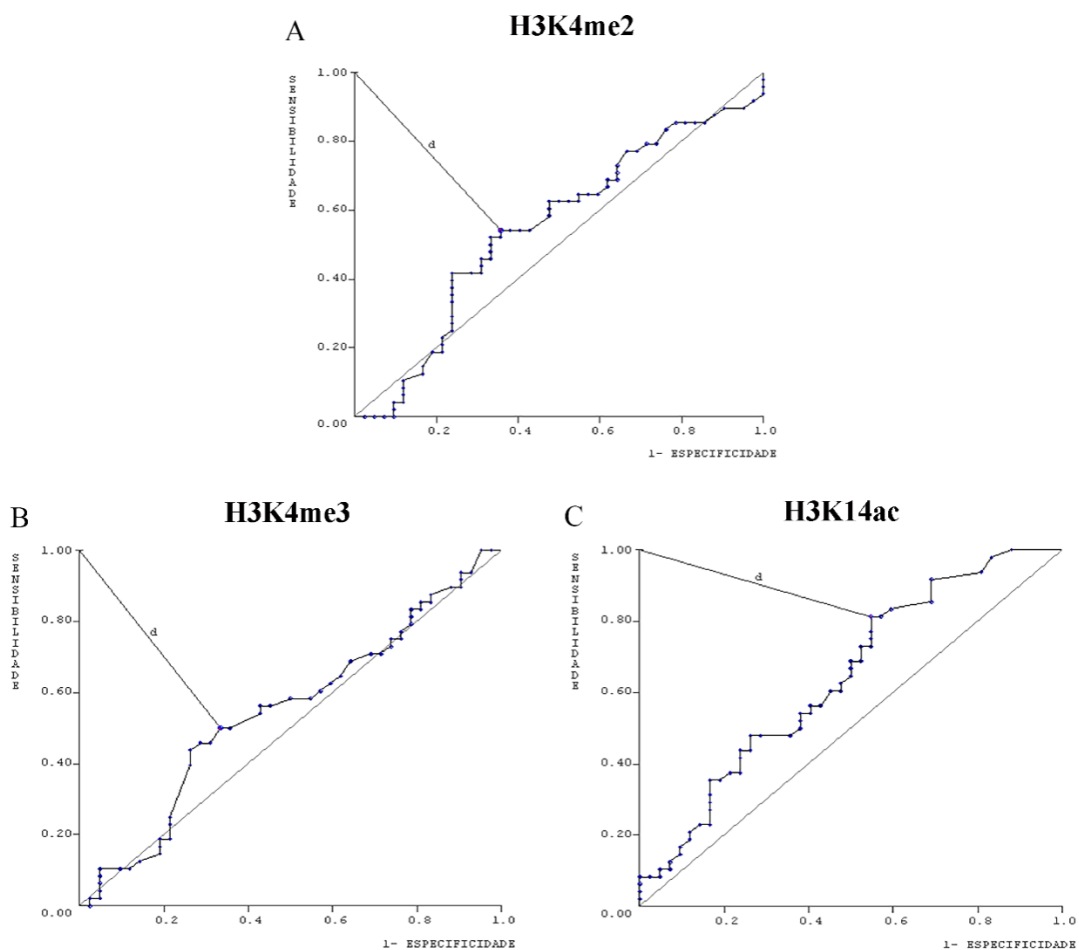
Fonte: dados da pesquisa

#### 6.4 Envolvimento de H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac com metástase locorregional de CCEB

Após ter sido constatado um significativo aumento da expressão de H3K14ac no grupo PM, optou-se por investigar se essas MPTHs poderiam ser utilizadas como preditores de ocorrência de metástases locorregionais. Dessa forma, foram construídas curvas *Receiver Operator Characteristic* (ROC) para cada histona (TAB. 12 e FIG. 15).

A curva ROC de H3K14ac apresentou sensibilidade de (81,3%) com ( $p=0,02$ ). Apesar de não ter apresentado uma especificidade tão boa quanto sua sensibilidade, este achado sugere que o aumento da expressão da H3K14ac poderia ser usado como ferramenta de triagem para a investigação de pacientes diagnosticados com CCEB N0. (TAB. 12).

FIGURA 15. Curvas ROC (*Receiver operating characteristic*) para cada MPTHs envolvida.



(A) H3K4me2, (B) H3K4me3, (C) H3K14ac

Fonte: dados da pesquisa

TABELA 12. Valores preditivos da curva ROC para cada MPTHs

VALORES PREDITIVOS	H3K4me2	H3K4me3	H3K14ac
<b>Ponto de corte (<i>cut off</i>)</b>	0.9600	0.9500	0.1400
<b>Sensibilidade</b>	0.5420	0.5000	0.8130
<b>Especificidade</b>	0.6430	0.6670	0.4520
<b>RV+</b>	1.5200	1.5000	1.4800
<b>Valor preditivo positivo</b>	63.41%	63.15%	62.87%
<b>RV-</b>	0.7100	0.7500	0.4100
<b>Valor preditivo negativo</b>	55.16%	53.89%	32.07%
<b>Acurácia</b>	0.5892	57.8000	64.4400
<b>Distância (d)</b>	0.58	0.60	0.58
<b>AAC</b>	0,59	0,58	0,63

Legenda: (RV+) razão de verossimilhança, (RV-) razão verossimilhança negativa, (AAC) área abaixo da curva

Fonte: dados da pesquisa

## 6.5 Análises univariada e multivariada

Modelos de regressão de Cox uni e multivariados foram realizados com intuito de avaliar possíveis preditores independentes de prognóstico (TAB. 13). Os resultados da análise univariada mostraram significância com H3K4me3 ( $p < 0,026$ ). Com relação às variáveis clinicopatológicas, foram encontradas significâncias para história familiar de câncer ( $p = 0,027$ ), tamanho do tumor ( $p = 0,024$ ) e metástase ( $p = 0,004$ ). Com relação a análise multivariada, nenhuma delas foi considerada um fator independente de prognóstico.

TABELA 13. Regressão de risco proporcional de Cox para análises univariada e multivariada

VARIÁVEIS	ANÁLISE UNIVARIADA		ANÁLISE MULTIVARIADAS	
	HR (IC 95%)	p	HR (IC 95%)	p
<b>H3k4me2</b>				
<i>Baixo</i>	0.877 (0.437 – 1.763)	0.713		
<i>Alta</i>	1			
<b>H3k4me3</b>				
<i>Baixa</i>	0.449 (0.222 – 0.907)	0.026 *	0.496 (0.227 – 1.085)	0.079
<i>Alta</i>	1		1	
<b>H3k14ac</b>				
<i>Baixa</i>	0.605 (0.261 – 1.403)	0.242		
<i>Alta</i>	1			
<b>História familiar de câncer</b>				
<i>Sim</i>	0.414 (0.189 - 0,906)	0.027*		
<i>Não</i>				
<b>Tamanho</b>				
< 4 cm	0.424 (0.201 - 0,895)	0.024*		
> 4 cm				
<b>Metástase</b>		0,004		
<i>Sim</i>	0.305 (0,137 - 0,682)			
<i>Não</i>				

(\*) Modelo de regressão de risco proporcional de Cox para análise univariada, com  $\alpha < 0,05$ .

(RR): risco relativo, (IC): intervalo de confiança.

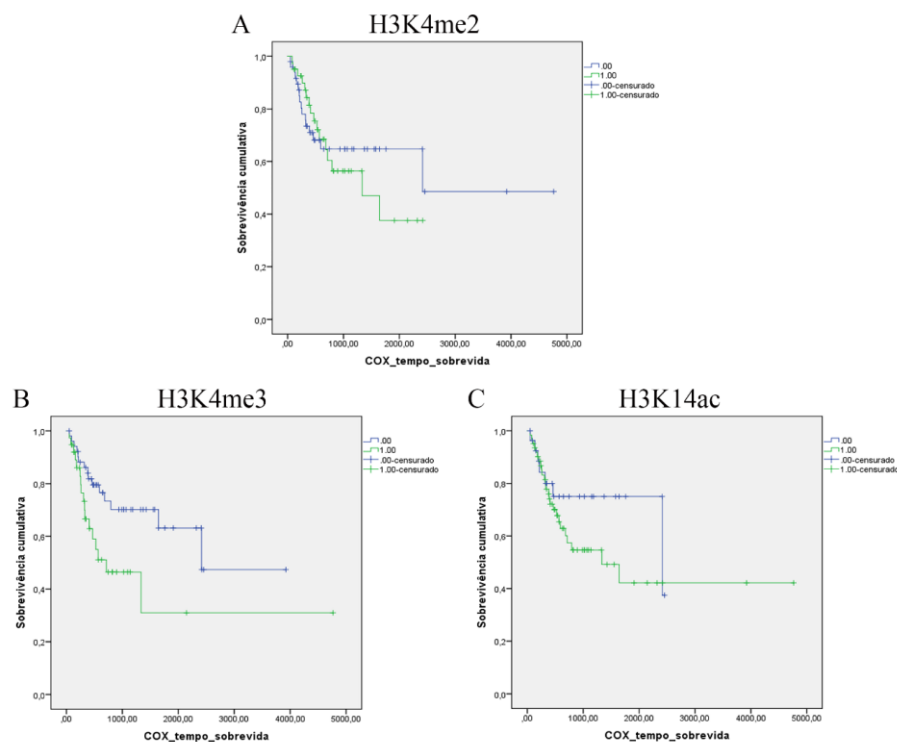
Fonte: dados da pesquisa

## 6.6 Impacto das MPTHs na sobrevida

### 6.6.1 Relação da expressão de H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac com sobrevida

Como já mencionado anteriormente, os pacientes foram agrupados de acordo com as MPTHs tendo como referência o ponto de corte (*cut off*) estabelecido pela curva ROC para classificar os pacientes em alta e baixa expressão. Foram considerados os escores 0 (baixa expressão) e 1 (alta expressão) para valores abaixo e acima do *cut off*, respectivamente. As análises de sobrevida de Kaplan-Meier mostraram que apenas H3K4me3 teve impacto significativo na sobrevida, estando sua alta expressão foi associada a um pior prognóstico ( $p=0,022$ ) (FIG. 16B). Tanto H3K4me2 como H3K14ac não apresentaram diferenças significantes das taxas de sobrevida (FIG. 16A e 16C).

FIGURA 16. Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida dos 90 pacientes com CCEB de acordo com a alta e baixa expressão das MPTHs.



(A) H3K4me2, (B) H3K4me3, (C) H3K14ac.

Fonte: dados da pesquisa

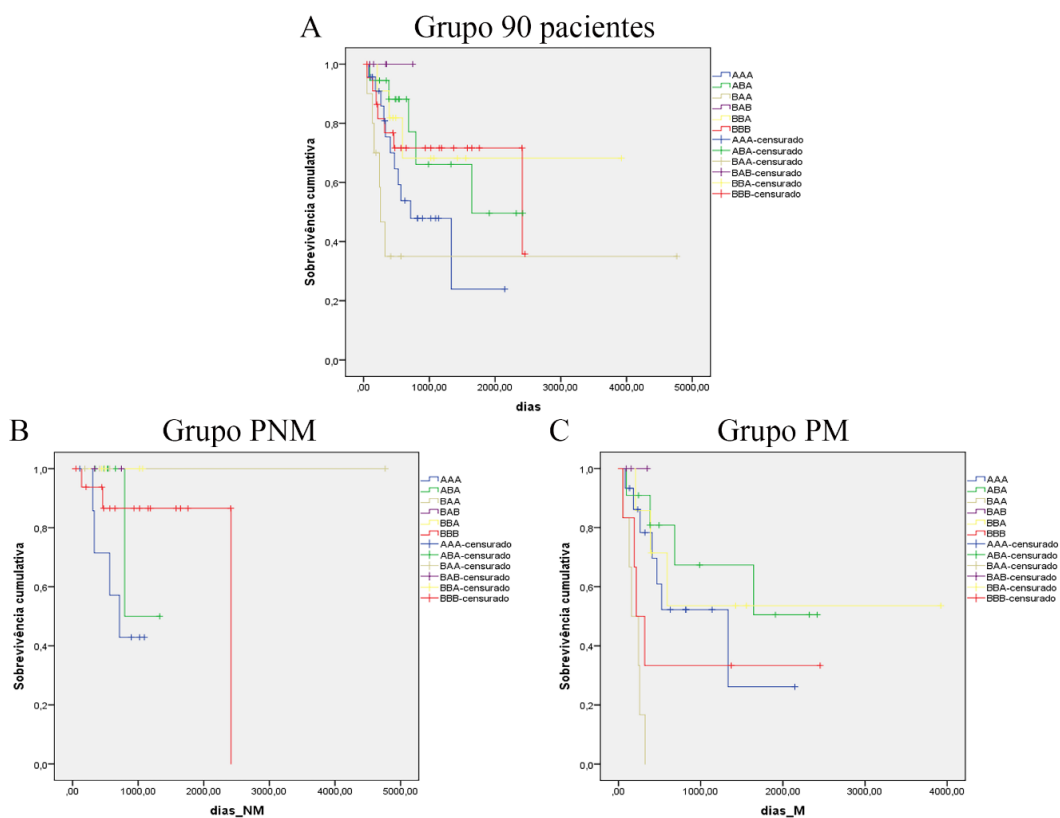
### 5.6.2 Análise da combinação dos padrões de expressão das MPTHs com sobrevida

Para verificar se a combinação de histonas (nesta ordem: H3K4me2 / H3K4me3 / H3K14ac) poderia ter um impacto na sobrevida dos pacientes, os mesmos foram ainda

agrupados de acordo com alta (A) e baixa (B) expressão para cada uma das MPTHs, sendo que no final foi possível obter oito tipos de combinações: AAA, AAB, ABA, BAA, BBA, BAB, ABB e BBB.

As análises de sobrevida de Kaplan-Meier de todos os 90 pacientes com CCEO apresentaram significância limítrofe ( $p=0,063$ ), embora a combinação BAA apresentou uma menor taxa de sobrevida quando comparado aos demais (FIG. 17A). Com relação aos grupos PNM e PM, foi observada uma diferença interessante na sobrevida dos pacientes. No grupo PNM, nenhuma significância foi alcançada ( $p=0,14$ ), embora a combinação AAA tenha tido a menor taxa de sobrevida quando comparada com os outros grupos (FIG. 17B). Por outro lado, no grupo PM foi encontrada significância estatística ( $p=0,0004$ ) para a combinação BAA, os quais apresentaram pior sobrevida quando comparados as demais combinações BAA x ABA (HR: 6,8477; IC: 5,23 - 132;  $p = 0,0002$ ); AAA x AAA (HR: 5,427; IC: 4,362- 103,6;  $p=0,0003$ ), BAA x BBA (HR: 5,930; IC: 2,836 - 57,51;  $p=0,0020$ ) (FIG. 17C).

FIGURA 17. Curvas de Kaplan-Meier para tempo de sobrevida dos 90 pacientes com CCEB de acordo com as combinações de alta e baixa expressão das MPTHs.



(A) 90 pacientes, (B) grupo PNM e (C) grupo PM

Fonte: dados da pesquisa

## 7 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, as pesquisas sobre MPTHs avançaram muito e os conhecimentos adquiridos no contexto do câncer têm sido muito promissores e com grande potencial de trazer benefícios profiláticos, diagnósticos e terapêuticos aos pacientes. As MPTHs desempenham um papel importante na transcrição gênica, levando à compactação ou à descompactação da cromatina, impedindo ou favorecendo, respectivamente, o recrutamento de maquinaria de transcrição gênica (IRIMIE *et al.*, 2018). Padrões globais de MPTHs têm sido sugeridos como determinantes na obtenção de resultados clínicos favoráveis aos pacientes acometidos por neoplasias malignas, mas para o CCEB isso ainda não está tão bem estabelecido na literatura. Nesse sentido, o foco principal deste estudo foi avaliar o papel das MPTHs H3K4m2, H3K4me3 e H3K14ac no comportamento biológico do CCEB com ênfase no desenvolvimento de metástases e impacto na sobrevida dos pacientes.

Como é de conhecimento amplo, metástase é um dos fatores de prognóstico mais importante para o CCEB e qualquer neoplasia maligna, influenciando diretamente na sobrevida dos pacientes (MATSUO *et al.*, 2018; CAMPOS-FERNANDES *et al.*, 2018). Com isso em mente, optamos em dividir nossos pacientes em dois grupos, denominados PNM e PM, tendo como base o diagnóstico de metástase, com intuito de investigar, com mais clareza, o papel das MPTHs investigadas, além de avaliar a relação delas com os dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos pacientes. Em nosso estudo foi possível identificar uma diferença significativa na expressão de H3K14ac no grupo PM em comparação com o grupo PNM. Além disso, H3K14ac foi fracamente correlacionada com metástase linfonodal e não teve impacto na sobrevida dos pacientes. Níveis de expressão de H3K14ac foram significativamente maiores em tumores de tireóide (PUPPIN *et al.*, 2012) e de próstata em estágio avançado (LEE; YANG; LINDAHL, *et al.*, 2017). Nesses dois estudos, essa MPTH foi associada com estágios mais avançados da doença, corroborando com nossos resultados.

No caso do CCEB, apenas dois estudos, um envolvendo pacientes (ARIF *et al.*, 2010) e outro em modelo animal de carcinogênese (URVALEK *et al.*, 2015), observaram uma expressão aumentada de H3K14ac em tecido tumoral quando comparado ao tecido normal adjacente. No entanto, nenhum deles avaliou a sua influência na ocorrência de metástase. Em virtude desses resultados, resolvemos investigar a possibilidade de a H3K14ac poder atuar como fator preditivo de metástase. A partir da análise da curva ROC, H3K14ac apresentou uma alta sensibilidade (81,3%), o que sugere que essa MPTH pode ser usada como ferramenta

de triagem para a investigação de pacientes diagnosticados com CCEB N0, mas com risco maior de desenvolverem metástases linfonodal clinicamente no decurso da doença. Além disso, testes com boa sensibilidade apresentam melhores chances de excluir casos falsos negativos, sendo isso de suma importância para o CCEB na medida em que até um terço dos pacientes podem apresentar metástases ocultas (NOGUTI *et al.*, 2012).

Quanto às análises uni e multivariada, a H3K14ac não mostrou ser um fator de prognóstico independente e também não teve impacto na sobrevida dos pacientes. No entanto, uma característica interessante da H3K14ac foi relatada em um estudo anterior Nakanishi *et al.* (2008), o qual destacou uma íntima relação de acetilação com hipermetilação de resíduo de lisina. Surpreendentemente, a expressão aumentada de H3K14ac foi especificamente associada com H3K4me3, elucidando inclusive que a acetilação em K14 está direcionada apenas para a trimetilação de K4me3 e não para di-metilação, ocorrendo assim um processo de estabilização mútua destas duas MPTHs. A partir dos achados anteriores, foi possível entender melhor nossos resultados, pois a MPTH responsável pela diminuição da sobrevida dos pacientes foi H3K4me3 e não H3K14ac, sendo que esta última estava apenas correlacionada com metástase. Assim, sugerimos que H3K14ac pode influenciar negativamente na sobrevida dos pacientes com CCEB tanto de forma direta como indireta.

O aumento da metilação em H3K4 está positivamente correlacionado com a transcrição gênica, portanto, desempenhando vários papéis distintos durante a expressão gênica, sendo esse processo modulado por metiltransferases e demetilases específicas (YANG; ERNST, 2017). Outro destaque dado a essa MPTH é o fato de que H3K4 poder ser mono-metilado (H3K4me1), di-metilado (H3K4me2) e tri-metilado (H3K4me3), aumentando consideravelmente a diversidade das suas funções reguladoras, podendo atuar inclusive de forma antagônica dependendo do aumento ou diminuição do número de metilações.

Em nosso estudo, quando se comparou a expressão de H3K4me2 e H3K4me3 entre os grupos PNM e PM, não foram constatadas diferenças na expressão delas. Esse achado foi similar ao descrito em outro estudo em que os níveis de H3K4me3 foram semelhantes em todos os estágios de evolução tumoral as etapas e com coloração quase uniforme em todas as etapas (CHEN *et al.*, 2013). Em dois estudos, observou-se níveis elevados de H3K4me2 e baixos de H3K4me3 em lesões de CCEB e displásicas em comparação com tecidos saudáveis (MANCUSO *et al.*, 2009; PIYATHILAKE *et al.*, 2005), mas em nenhum deles, as variações de expressão delas foram estudadas com o mesmo propósito desse estudo (comparando PNM com PM). Outro resultado interessante que obtivemos foi a correlação significativa e de forma inversa entre H3K4me3 com tumores bem diferenciados, sugerindo que, na medida em que



esta trimetilação aumenta, os tumores vão se tornando menos diferenciados, podendo influenciar negativamente na sobrevida dos pacientes. Essa correlação indireta entre H3K4me3 e gradação histológica também foi evidenciada no grupo PM e com uma força de correlação ainda maior.

Poucos estudos examinaram a associação entre as metilação de H3K4 e sobrevida dos pacientes, e aqueles estudos que se propuseram fazer tal análise obtiveram resultados conflitantes (LIU *et al.*, 2010; ELLINGER *et al.*, 2010). Além disso, não ficou claro nesses estudos se as diferenças entre os subtipos de metilação da H3K4 poderiam ter contribuído para essas discrepâncias. Um estudo de meta-análise com 1181 artigos relatou que uma diminuição de H3K4me2 e um aumento da expressão de H3K4me3 foram significativamente correlacionados com uma pior sobrevida (LI *et al.*, 2018). Neste estudo, foi constatado que diferentes estados de metilação em H3K4 podem exercer diferentes efeitos sobre o comportamento biológico dos tumores, podendo H3K4me2 e H3K4me3 atuar, inclusive, como ativadores transcricionais e promover a expressão de genes. Entretanto, os efeitos reguladores positivos ou negativos de H3K4me2 e H3K4me3 na carcinogênese são altamente dependentes de sua interação com fatores biológicos e ambientais (DEB *et al.*, 2014). Em nosso estudo, a H3K4me3 foi significativamente correlacionada com o tabagismo, confirmando mais uma vez o peso que os fatores ambientais podem exercer nas MPTHs. Quanto mais fatores de risco estiverem presentes maiores serão as chances de ocorrer alterações epigenéticas anormais e desordenadas, favorecendo a instabilidade genômica, o desenvolvimento e progressão tumoral. Além disso, o sinergismo entre fumo e álcool foi mais uma vez elucidado, evidenciando-se o perfil característico dos pacientes com CCEB, principalmente homens, fumantes e etilistas. No entanto, um dado interessante pôde ser observado aqui quando se encontrou uma correlação entre o grupo PM com idade e consumo de álcool, indicando que pacientes com CCEB metastáticos são, principalmente, homens, etilistas e com idade menor a 55 anos.

Pesquisas anteriores do nosso grupo (MATSUO *et al.*, 2018; CAMPOS-FERNANDES *et al.*, 2018) relataram o peso que fatores como gênero, etilismo, tamanho do tumor, estadiamento e metástase exercem negativamente no prognóstico e diminuição da sobrevida, achados confirmados também nesse estudo. Além disso, a partir das análises de correlação de Spearman, foi possível observar correlações significantes entre a história familiar de câncer com sintomatologia, tamanho do tumor, recidiva e óbito, sugerindo que pacientes com CCEB que já possuem história familiar poderiam apresentar pior prognóstico e menor sobrevida. Ainda dentro da correlação entre as variáveis clinicopatológicas, observou-

se que tumores com um tempo de evolução superior a 6 meses apresentam correlação direta com sintomatologia, recidiva e sobrevida com doença, evidenciando mais uma vez que o diagnóstico tardio, piora o prognóstico e reduz a sobrevida.

Pela primeira vez um aumento dos níveis de H3K4me3 no CCEB foi observado como tendo um impacto na sobrevida dos pacientes. Das três MPTHs investigadas, apenas a H3K4me3 apresentou significância na análise univariada, além de também ter impactado na sobrevida. Contudo, na análise multivariada, nenhuma das histonas pode ser considerada como um fator independente de prognóstico. Embora não se conheça mecanisticamente como essa MPTH pode contribuir para impactar a sobrevida de pacientes acometidos por tumores, alguns estudos relataram que isso pode ser influenciado pelo aumento da regulação de uma HAT (*Pygo 2*) em alguns tipos de câncer (POPADIUK *et al.*, 2006; ANDREWS *et al.*, 2008). A *Pygo2* é capaz de recrutar algumas trimetiltransferases, como (*MLL1/MLL2*) para a histona H3K4, nos genes alvo da via WNT (ZHOU *et al.*, 2016). A ativação aberrante da via WNT/ $\beta$  catenina desempenha um papel fundamental na transformação neoplásica e na progressão do CCEB, favorecendo a transição epitélio-mesênquima, desdiferenciação, invasão e migração, sendo todos estes fatores preponderantes para um pior prognóstico e, consequentemente, impacto negativo na sobrevida dos pacientes (TOH *et al.*, 2017).

Devido ao fato de todas as histonas terem apresentado correlações estatisticamente significantes entre elas, também perguntamos se a combinação das MPTHs poderia ter impacto na sobrevida dos 90 pacientes com CCEB e também nos grupos PNM e PM. Quanto aos 90 pacientes, observou-se que a baixa expressão de H3K4me2, alta de H3K4me3 e alta H3K14ac (BAA) tiveram a menor taxa de sobrevida, apesar de não ter sido significativo. No entanto, essa mesma combinação dentro do grupo PM teve um impacto negativo significativo na sobrevida. Como a metástase linfonodal cervical é um dos fatores de prognósticos no CCEB e que mais interfere negativamente na sobrevida (MATSUO *et al.*, 2018; CAMPOS-FERNANDES *et al.*, 2018), todos esses resultados indicam que a combinação destas MPTHs tem um grande valor na determinação do prognóstico desses pacientes.

Um fato interessante é que o aumento de H3K4me2 levou a melhora da sobrevida de pacientes do grupo PM (comparar ABA x BAA) (FIGURA 17C). A alta expressão de H3K4me2 melhorou a sobrevida de pacientes com carcinoma de pulmão em estágio inicial (LUI; DONG; WANG *et al.*, 2013), enquanto que a diminuição dos níveis de H3K4me2 foi associado com prognóstico ruim para pacientes acometidos com adenocarcinoma pancreático não avançado (linfonodo negativo) (ANDREWS *et al.*, 2007), câncer de próstata baixo grau Gleason (ANDREWS *et al.*, 2008), câncer de pulmão em estágio inicial e câncer renal

localizado (URAGUCHI *et al.*, 2004). Portanto esses dados sugerem que baixos níveis de H3K4me2 poderiam estar associados a uma diminuição da expressão de genes supressores de tumores (KURDISTANI *et al.*, 2007). De fato, observou-se que a enzima mono-di-desmetilase (LSD1) específica da lisina medeia a demetilação da H3K4me2 do gene *P21*, suprimindo sua expressão em tumores gástricos. Isso nos leva a sugerir que níveis reduzidos de H3K4me2 poderiam estar associados à diminuição da expressão de genes supressores tumorais dos pacientes acometidos com CCEB metastáticos, pois a função suprimida de *P21* aumentariam as chances de um tumor progredir. Este fato também pode explicar, em parte, o fato de a baixa expressão de H3K4me2 no grupo PNM ter melhorado a sobrevida dos pacientes já que a função de *P21* poderia não estar afetada nesse contexto.

A partir da análise crítica de nossos resultados, fica evidente o papel da metilação e acetilação nos resíduos de lisina 4 e 14 da histona H3 na tumorigênese do CCEB. Para o entendimento de como as diferenças no padrão de expressão de H3K4me2, H3K4me3 e H3K14ac poderão influenciar no prognóstico e na sobrevida dos pacientes com CCEB, é importante considerarmos os prováveis efeitos destas MPTHs na transcrição gênica (interferindo ou não na expressão de oncogenes e de genes supressores de tumor), os quais poderão agir de forma antagônica nas etapas da carcinogênese bucal. Além disso, a análise de correlação entre os dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos pacientes em estágios iniciais ou avançados da doença com as MPTHs aqui estudadas, ajudará na elaboração de novas estratégias que beneficiem não apenas o diagnóstico precoce, mas também o desenvolvimento de novos recursos terapêuticos que, somados aos protocolos já existentes, promoverão uma melhora no prognóstico. A ideia de combinar a terapia padrão com novos agentes moduladores epigenéticos poderá melhorar significativamente o desfecho clínico dos pacientes com CCEB e a sobrevida dos pacientes.

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- O aumento de H3K4me3 ocasionou um impacto negativo na sobrevida dos 90 pacientes com CCEB, além do fato de que a trimetilação de H3K4.
- Maiores níveis de H3k4me 3 foram correlacionados aos pacientes tabagistas e também com tumores menos diferenciados.
- Os níveis de acetilação de H3K14 foram mais expressos em pacientes com CCEB metastáticos, podendo o aumento desta modificação ter influenciado, mesmo que indiretamente, nos níveis de trimetilação de H3K4.
- H314ac apresentou correlação com metástase linfonodal, mas o seu papel como ferramenta de diagnóstico para metástase não pode ser confirmado, necessitando de mais estudos com essa finalidade.

Mais estudos devem ser realizados quanto à presença destas três MPTHs nos pacientes com CCEB, principalmente com relação aos efeitos que suas ações combinadas podem gerar no prognóstico e sobrevida dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS *et al.* **Fundamentos de biologia celular**. Porto Alegre: Artes médicas, 2017.
- ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n. 51, p. 786-94, May 1964. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- AMIT, M.; YEN, T. C.; LIAO, C. T. *et al.* Improvement in survival of patients with oral cavity squamous cell carcinoma: an international collaborative study. **Cancer**, v. 119, n. 24, p. 4.242–48, 2013. <https://doi.org/10.1002/cncr.28357>
- ANDREWS, P. G.; KENNEDY, M. W.; POPADIUK, C. M.; KAO, K. R. Oncogenic activation of the human pygopus2 promoter by e74-like factor-1. **Mol Cancer Res**, v. 2, n. 6, p. 259–66, 2008. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0068>
- ANDREWS, P. G.; LAKE, B. B.; POPADIUK, C.; KAO, K. R. Requirement of pygopus 2 in breast cancer. **Int J Oncol.**, v. 2, n.30, p. 357–63, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.014>
- ARIF, M.; VEDAMURTHY, B. M.; CHOUDHARI, R. *et al.* Nitric oxide-mediated histone hyperacetylation in oral cancer: Target for a water-soluble hat inhibitor, ctk7a. **Chem Biol.**, n. v. 8, n.17, p. 903–13, 2010.
- BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414-417, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.009>
- BANERJEE, T.; CHAKRAVARTI, D. A Peek into the Complex Realm of Histone Phosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 24, n. 31, p. 4.858–73, Dec. 2011. <https://doi.org/10.1128/MCB.05631-11>
- BANERJEE, T.; CHAKRAVARTI, D. A peek into the complex realm of histone phosphorylation. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 24, p. 4.858–73, 2011. <https://doi.org/10.1128/MCB.05631-11>
- BANNISTER, A. J; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res.**, n. 21, v. 3, p. 381–95. doi: 10.1038/cr.2011.22. Epub 2011 Feb 15. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- BATTIFORA, H. The multi tumor (sausage) tissue block: Novel method for immunohistochemical antibody testing. **Lab Invest.**, n. 55, v. 2, p. 244–48, 1986.
- BEDI, U.; MISHRA, V. K.; WASILEWSKI, D.; SCHEEL C.; JOHNSEN S. Epigenetic plasticity: A central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. **Oncotarget.**, v. 8, n.5, p. 2.016–29, Apr. 2014. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1875>

- BERGER, S. L.; KOUZARIDES, T.; SHIEKHATTAR, R.; SHILATIFARD, A. An operational definition of epigenetics. **Genes Dev.**, n. 23, p. 781–3, 2009. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>
- BEYER, S.; ZHU, J.; MAYR, D. *et al.* Histone H3 acetyl K9 and histone H3 tri methyl K4 as prognostic markers for patients with cervical cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 477, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18030477>
- BISWAS, S.; RAO, C. Epigenetics in cancer: Fundamentals and beyond. **Pharmacology&Therapeutics**, v. 173, p. 118–34, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>
- BLANCAFORT, P.; JIN, J.; FRYE, S. Writing and Rewriting the Epigenetic Code of Cancer Cells: From: Engineered Proteins to Small Molecules. **Mol Pharmacol.**, n. 83, v. 3, p. 563–576, Mar. 2013. <https://doi.org/10.1124/mol.112.080697>
- CAMPOS-FERNANDEZ, E.; MATSUO, F. S.; ANDRADE, M. F. *et al.* Prognostic value of h3s10 phosphorylation and h4k12 acetylation in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, 2018. <https://doi.org/10.1111/his.13713>
- CARRERAS-TORRAS, C.; GAY-ESCODA, C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 20, n. 3, p. e305, 2015. <https://doi.org/10.4317/medoral.20347>
- CASTILHO, R. M.; SQUARIZE, C.H.; ALMEIDA, L. O. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. **Int J Mol Sci.**, n. 18, v. 7, July 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18071506>
- CHAITANYA, N. C.; ALLAM, N. S. J.; BABU, D. B. G. *et al.* Systematic meta-analysis on association of human papilloma virus and oral cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 969, 2016. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.179098>
- CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; ANDERSON, W. F.; GILLISON, M. L. Incidence trends for human papillomavirus-related and-unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **Journal of clinical oncology**, v. 26, n. 4, p. 612–19, 2008. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1713>
- CHEN, Y. W.; CHEN, C. Y.; CHIANG, S. C.; LUI, M. T.; KAO, S. Y.; YANG, M. H. Predictors and impact of microsurgical complications in patients with locally advanced oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci.**, n. 103, v. 9, p. 1.672–8, Sep. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02345.x>
- CHEN, Y. W.; KAO, S. Y.; WANG, H. J. *et al.* Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 119, n. 24, p. 4.259–267, 2013. <https://doi.org/10.1002/cncr.28356>
- CHERVONA, Y.; COSTA, M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? **Nature**, v. 403, p. 41–5, 2012.

- CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 5, p. 401-421, 2015. <https://doi.org/10.3322/caac.21293>
- CORTESINA, G.; MARTONE, T. Molecular metastases markers in head and neck squamous cell carcinoma: Review of the literature. **Acta Otorhinolaryngol Ital.**, n. 26, v. 6, p. 317–25, 2006.
- DANTAS, T. S.; DE BARROS SILVA, P. G.; SOUSA, E. F.; DA CUNHA, M. D. O. P.; AGUIAR, A. S.; COSTA, F. W.; MOTA, M. R.; ALVES, A. P.; SOUSA, F. B. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. **Medicine**, v. 95, n. 3, p. 2.310–14, 2016. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002314>
- 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>
- DEB, M.; KAR, S.; SENGUPTA, D. *et al.* Chromatin dynamics: H3k4 methylation and h3 variant replacement during development and in cancer. **Cell Mol Life Sci.**, n. 71, v. 18, p. 3.439-63, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1605-4>
- DESJARLAIS, R.; TUMMINO, P. J. Role of Histone-Modifying Enzymes and Their Complexes in Regulation of Chromatin Biology. **Biochemistry**, n. 55, p. 1584–99, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01210>
- EL-NAGGAR, A. K.; REICHART, P. A. Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors*. Lyon, I. A. R. C. Press., 2005, p. 180–1.
- ELLINGER, J.; KAHL, P.; MERTENS C *et al.* Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. **Int J Cancer**, n. 127, p. 2360–6, 2010. <https://doi.org/10.1002/ijc.25250>
- ELLINGER, J.; KAHL, P.; VON DER GATHEN, J. *et al.* Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. **The Prostate**, v. 70, n. 1, p. 61–69, 2010. <https://doi.org/10.1002/pros.21038>
- EL-NAGGAR, A. K. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4th Edition, V. 9, Lyon, France: IARC, 2017.
- ELSHEIKH, S. E.; GREEN, A. R.; RAKHA, E. A. *et al.* Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient out come. **Cancer research**, v. 69, n. 9, p. 3802–9, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3907>

- FARIA, P. R.; CARDOSO, S. V.; DE, A. N. S.; SILVA, S. J.; LOYOLA, A. M. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. **Clin Oral Investig**, v. 7, p. 46-51, Mar. 2003.
- FREITAS-FILHO, S. A.; SERVATO, J. P. S.; SÁA, R. T.; LOYOLA, A. M.; CARDOSO, S. V. Evaluation of specific modified histones in lip carcinogenesis. **Pathology – Research and Practice**, n. 214, p. 876–80, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.04.004>
- FÜLLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. Histone onco-modifications. **Oncogene**, v. 30, n. 31, p. 3391, 2011. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.121>
- GANDINI, S.; BOTTERI, E.; IODICE, S. *et al.* Tobacco smoking and cancer: a meta- analysis. **International journal of cancer**, v. 122, n. 1, p. 155–64, 2008. <https://doi.org/10.1002/ijc.23033>
- GASCHE, J. A.; GOEL, A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncol.**, n. 8, v. 11, p. 1.407–25, 2012. <https://doi.org/10.2217/fon.12.138>
- GIL, J., RAMÍREZ-TORRES, A.; ENCARNACIÓN-GUEVARA, S. Lysine acetylation and cancer: a proteomics perspective. **J Proteomics**, n. 150, p. 297–309, Jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.10.003>
- GILTNANE, J. M.; RIMM, D. L. Technology insight: identification of biomarkers with tissue microarray technology. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 1, n. 2, p. 104–11, 2004. <https://doi.org/10.1038/ncponc0046>
- GONTARZ, M.; WYSZYNSKA-PAWELEC, G.; ZAPALA, J. Clinico-pathological predictive factors in squamous cell carcinoma of the tongue and the floor of the mouth. **Folia medica Cracoviensia**, v. 53, n. 2, p. 73–86, 2013.
- GONZÁLEZ-RAMÍREZ, I.; SOTO-REYES, E.; SÁNCHEZ-PÉREZ, Y.; HERRERA, L. A.; GARCÍA-CUELLAR, C. Histone and long non-coding RNAs: the new insights of epigenetic deregulation involved in oral cancer. **Oral Oncol.**, n. 50, v. 8, p. 691–5, Aug 2014. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.04.006>
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- HE, C.; XU, J.; ZHANG, J. *et al.* High expression of trimethylated histone H3 lysine 4 is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Human pathology**, v. 43, n. 9, p. 1.425–35, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2011.11.003>
- HOOPER, S. J.; CRAN, S. J.; FARDY, M. J. *et al.* A molecular analysis of the bacteria present within oral squamous cell carcinoma. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1651–9, 2007. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46918-0>
- HOOPER, S. J.; CRAN, S. J.; LEWIS, M. A. *et al.* Viable bacteria present within oral squamous cell carcinoma tissue. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1719–25, 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1719-1725.2006>



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER/INCA. **Estatísticas de câncer**. Estimativas do número de casos novos. Rio de Janeiro; 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>.

IRIMIE, A. I.; BRAICU, C.; PILECZKI, V.; PETRUSHEV, B.; SORITAU, O.; CAMPAN, R. S.; BERINDAN-NEAGOE, I. Knocking down of p53 triggers apoptosis and autophagy, concomitantly with inhibition of migration on SSC-4 oral squamous carcinoma cells. **Mol Cell Biochem**, n. 419, v 1–2, p. 75–82, Aug. 2016. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2751-9>

IRIMIE, A. J.; CIOCAN, C.; GULEI, D. *et al.* Current Insights into Oral Cancer. **Epigenetics. Int J Mol Sci**, n. 19, v. 3, p. 670. mar. 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19030670>

JABER, M. A. Oral epithelial dysplasia in non-user of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. **Journal of oral science**, v. 52, n. 1, p. 13–21, 2010. <https://doi.org/10.2334/josnurd.52.13>

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. E. K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and a etiology. **Periodontology** 2000, v. 57, n. 1, p. 19–37, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00401.x>

JOHNSON, N.; FRANCESCHI, S.; FERLAY, J. *et al.* Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). **World Health Organization Classification of Tumors**. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Lyon, I.A.R.C. Press., 2005, p. 168–75.

KAMPILAFKOS, P.; MELACHRINO, M.; KEFALOPOULOU, Z. *et al.* Epigenetic modifications in cutaneous malignant melanoma: EZH2, H3K4me2, and H3K27me3 immuno histochemical expression is enhanced at the invasion front of the tumor. **The American Journal of Dermatopathology**, v. 37, n. 2, p. 138–44, 2015. <https://doi.org/10.1097/DAD.0b013e31828a2d54>

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. S.; KAMBOJ, M.; VERMA, R.; KUMAR, M. Epigenetics in oral cancer - neoteric biomarker. **J Oral Med Oral Pathol Radiol.**, n, 2, p. 62–5, 2016. <https://doi.org/10.5958/2395-6194.2016.00017.5>

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. 333–45, 2015. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i4.333>

KIMURA, H. Histone modifications for human epigenome analysis. **Journal of human genetics**, v. 58, n. 7, p. 439, 2013. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66>

- 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>
- KURDISTANI, S. K. Histone modifications as markers of cancer prognosis: A cellular view. **Br J Cancer** v. 1, n.97, p. 1–5, 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603844>
- KURDISTANI, S. K. Histone modifications in cancer biology and prognosis. **Prog Drug Res.**, n. 67, p. 91–106, 2011. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8989-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8989-5_5)
- LEE, J. H.; YANG, B.; LINDAHL, A. J. *et al.* Identifying dysregulated epigenetic enzyme activity in castrate-resistant prostate cancer development. **ACS Chem Biol.**, v. 11, n.12, p. 2804–14, 2017. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b01035>
- LEE, J. S.; SMITH, E.; SHILATIFARD, A. The language of histone crosstalk. **Cell.**, v. 5, n. 142, p. 682–5, Sep. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.011>
- LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews of Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9–22, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrc2982>
- LI, S.; SHEN, L.; CHEN, K. N. Association between h3k4 methylation and cancer prognosis: A meta-analysis. **Thorac Cancer**, v. 7, n. 9, p. 794–9, 2018. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12647>
- LI, Y.; SETO, E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 10, n. 6, Oct. 2016. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- LI, Q.; JIA, N.; TAO, X. *et al.* The expression and significance of histone lysine methylation in endometrial cancer. **Oncology letters**, v. 14, n. 5, p. 6210–6, 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6979>
- LIN, T.; PONN, A.; HU, X.; LAW, B. K.; LU, J. Requirement of the histone demethylase *lzd1* in *snail*-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, v. 35, n. 29, p. 4.896–904, 2010. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.234>
- LIU, B. L.; CHENG, J. X.; ZHANG, X. *et al.* Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, n. 19, p. 2.888–96, 2010. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0454>
- LIU, Y.; DONG, Q. Z.; WANG, S. *et al.* Abnormal expression of pygopus 2 correlates with a malignant phenotype in human lung cancer. **BMC Cancer**, n. 13, p. 346, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-346>
- LIU, Z. L.; LI, H.; LIU, J.; WU, M. L.; CHEN, X. Y.; LIU, L. H.; WANG, Q. Inactivated WNT signaling in resveratrol-treated epidermal squamous cancer cells and its biological implication. **Oncol Lett.**, v. 2, n.14, p. 2239–43, Aug. 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6458>

LIU, X.; GAO, X. L.; LIANG, X. H. *et al.* The etiologic spectrum of head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Onco target**, v. 7, n. 40, p. 66226, 2016.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11265>

LUGER, K.; MÄDER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389(6648), n.18, p. 251–60, Sep. 1997. <https://doi.org/10.1038/38444>

MAJCHRZAK, E.; SZYBIAK, B.; WEGNER, A. *et al.* Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiology and oncology**, v. 48, n. 1, p. 1-10, 2014. <https://doi.org/10.2478/raon-2013-0057>

MANCUSO, M.; MATASSA, D. S.; CONTE, M. *et al.* H3K4 histone methylation in oral squamous cell carcinoma. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 3, p. 405–10, 2009.

[https://doi.org/10.18388/abp.2009\\_2473](https://doi.org/10.18388/abp.2009_2473)

MANUYAKORN, A.; PAULUS, R.; FARRELL, J. *et al.* Cellular histone modification patterns predict prognosis and treatment response in resectable pancreatic adenocarcinoma: Results from RTOG 9704. **J Clin Oncol.**, n. 28, v. 8, p. 1.358–65, 2010.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.5639>

MASCOLO, M.; SIANO, M.; ILARDI, G. *et al.* Epigenetic dysregulation in oral cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 2, p. 2331-53, 2012.

<https://doi.org/10.3390/ijms13022331>

MATSUO, F. S.; ANDRADE, M. F.; LOYOLA, A. M.; DA SILVA, S. J.; SILVA, M. J. B.; CARDOSO, S. V.; DE FARIA, P. R. Pathologic significance of AKT, mTOR, and GSK3β proteins in oral squamous cell carcinoma-affected patients. **Virchows Arch**, v. 6, n. 452, p. 983–97, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2318-0>

METGUD, R.; GUPTA, K.; GUPTA, J. Exploring bacterial flora in oral squamous cell carcinoma: a microbiological study. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 89, n. 2, p. 153–9, 2014. <https://doi.org/10.3109/10520295.2013.831120>

MOSASHVILLI, D.; KAHL, P.; MERTENS, C. *et al.* Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. **Cancer science**, v. 101, n. 12, p. 2664–9, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01717.x>

MÜLLER, S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 125, n. 6, p. 591-604, jun. 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.02.012>

NAGANUMA, K.; HATTA, M.; IKEBE, T.; YAMAZAKI, J. Epigenetic alterations of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, n. 20, v. 14, p. 988, Dec. 2014. doi: 10.1186/1471-2407-14-988. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-988>

NAKANISHI, S.; SANDERSON, B. W.; DELVENTHAL, K.; BRADFORD, W-D.; STAEHLING-HAMPTON, K.; SHILATIFARD, A. A. Comprehensive library of histone mutants identifies nucleosomal residues required for H3K4 methylation. **Nat Struct Mol Biol.**, n. 15, v. 8, p. 881–8, Aug. 2008. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1454>

NARAYAN, T. V.; REVANNA, G. M.; HALLIKERI, U.; KURIAKOSE, M. A. Dental caries and periodontal disease status in patients with oral squamous cell carcinoma: a screening study in urban and semiurban population of Karnataka. **Journal of maxillofacial and oral surgery**, v. 13, n. 4, p. 435–43, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12663-013-0540-5>

NG, J. H.; IYER, N. G.; TAN, M. H. *et al.* Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head & neck**, v. 39, n. 2, p. 297–304, 2017. <https://doi.org/10.1002/hed.24589>

NI, Y.; DING, L.; HU, Q.; HUA, Z. Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma: proteomics discovery and clinical validation. **PROTEOMICS–Clinical Applications**, v. 9, n. 1-2, p. 86-97, 2015. <https://doi.org/10.1002/prca.201400091>

NOGUTI, J.; DE MOURA, C. F.; DE JESUS, G. P. *et al.* Metastasis from oral cancer: An overview. **Cancer Genomics Proteomics**. v. 5, n. 9, p. 329–35, 2012.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 3, p. 298–307, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2010.12.003>

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D. C.; PARDO, A. P. S. Metilação de DNA e câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, n. 56, v. 4, p. 493–9, 2010.

PIYATHILAKE, C. J.; BELL, W. C.; JONES, J. *et al.* Patterns of global DNA and histone methylation appear to be similar in normal, dysplastic and neoplastic oral epithelium of humans. **Disease markers**, v. 21, n. 3, p. 147–51, 2005. <https://doi.org/10.1155/2005/285134>

POPADIUK, C. M.; XIONG, J.; WELLS, M. G. *et al.* Antisense suppression of pygopus2 results in growth arrest of epithelial ovarian cancer. **Clin Cancer Res**, n. 12, v. 7, p. 2216–23, 2006. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2433>

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human. **Disease nature biotechnology**, n. 10, v. 28, Oct. 2010. PUPPIN, C.; PASSON, N.; LAVARONE, E. *et al.* Levels of histone acetylation in thyroid tumors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 411, n. 4, p. 679–83, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.182>

PUSHALKAR, S.; MANE, S. P.; JI, X. *et al.* Microbial diversity in saliva of oral squamous cell carcinoma. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 269–77, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00773.x>

RASBAND, W. S. **ImageJ**: Optical Density Calibration [Internet]. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. [cited 2018 Apr 18]. Disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/>.

REICHART, P.; SIDRANKYS, D. (Ed.). Pathology e genetics, WHO Classification Head and Neck Tumours. **IARCP Ress**, Lyon, v. 430, p. 163-75, 2005.

RIVERA, César. Essentials of oral cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 9, p. 11.884, 2015.

ROGENHOFER, S.; MIERSCH, H.; GÖKE, F. *et al.* Histone methylation defines an epigenetic entity in penile squamous cell carcinoma. **The Journal of urology**, v. 189, n. 3, p. 1117–22, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.08.221>

SELIGSON, D. B.; HORVATH, S.; MCBRIAN, M. A. *et al.* Global levels of histone modification predict prognosis in different cancers. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 5, p. 1619–28, 2009. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080874>

SLOOTWEG, P. J.; EVESON, J. W. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. (eds.). **World Health Organization Classification of Tumors**. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Lyon, I.A.R.C. Press., p. 166–7, 2005.

TAGHAVI, N.; YAZDI, I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 5, 2015.

TAMAGAWA, H.; OSHIMA, T.; SHIOZAWA, M. *et al.* The global histone modification pattern correlates with overall survival in metachronous liver metastasis of colorectal cancer. **Oncology reports**, v. 27, n. 3, p. 637–42, 2012. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1547>

TANAKA, T.; ISHIGAMORI, R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. **Journal of oncology**, v. 2011, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/603740>

TAVERNA, S. D.; ILIN, S.; ROGERS, R. S.; TANNY, J. C.; LAVENDER, H.; LI, H.; BAKER, L.; BOYLE, J.; BLAIR, L. P.; CHAIT, B. T.; PATEL, D. J.; AITCHISON, J. D.; TACKETT, A. J.; ALLIS, C. D. Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. **Mol Cell**, v. 5, n. 24, p. 785–96, Dec. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.026>

TOH, T. B.; LIM, J. J.; CHOW, E. K. Epigenetics in cancer stem cells. **Mol. Cancer**, v. 29, n.16, Dec. 2017. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0596-9>

TRIVEDI, T. I.; TANKSHALI, J. V.; GOSWAMI, S. N. *et al.* Identification of site-specific prognostic biomarkers in patients with oral squamous cell carcinoma. **Neoplasma**, v. 58, n. 3, p. 217, 2011. [https://doi.org/10.4149/neo\\_2011\\_03\\_217](https://doi.org/10.4149/neo_2011_03_217)

TROELTZSCH, M.; KNÖSEL, T.; EICHINGER, C. *et al.* Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 7, p. 1291–300, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.01.009>

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>

URAGUCHI, M.; MORIKAWA, M.; SHIRAKAWA, M.; SANADA, K.; IMAI, K.

Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **J Dent Res.**, v. 4, n.83, p. 327–32, 2004. <https://doi.org/10.1177/154405910408300411>

URVALEK, A. M.; GUDAS, L. J. Retinoic acid and histone deacetylases regulate epigenetic changes in embryonic stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 19519–30, 2014. doi: 10.1074 / jbc.M114.556555.Epub 2014 12 de maio.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556555>

URVALEK, A. M.; OSEI-SARFO, K.; TANG, X. H. *et al.* Identification of Ethanol and 4 - Nitroquinoline - 1 - Oxide Induced Epigenetic and Oxidative Stress Markers During Oral Cavity Carcinogenesis. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 39, n. 8, p. 1360–372, 2015.

<https://doi.org/10.1111/acer.12772>

VAN MONSJOU, H. S.; WREESMANN, V. B., VAN DEN BREKEL, M. W. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oral oncology**, v. 49, n. 12, p. 1.097–102, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.001>

VERDE, G.; QUEROL-PAÑOS, J.; CEBRIÀ-COSTA, J. P.; PASCUAL-REGUANT, L.; SERRA-BARDENYS, G.; ITURBIDE, A.; PEIRÓ, S. Lysine-Specific Histone Demethylases Contribute to Cellular Differentiation and Carcinogenesis. **Epigenomes**, v. 1, n.1, 2017.

<https://doi.org/10.3390/epigenomes1010004>

WATANABE, T.; MORINAGA, S.; AKAIKE, M. *et al.* The cellular level of histone H3 lysine 4 dimethylation correlates with response to adjuvant gemcitabine in Japanese pancreatic cancer patients treated with surgery. **European Journal of Surgical Oncology (EJSO)**, v. 38, n. 11, p. 1051–57, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ejso.2012.08.008>

WEBBER, L. P.; WAGNER, V. P.; CURRA, M. *et al.* Hypoacetylation of acetyl-histone H3(h3k9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. **Histopathology**, v. 2, n.71, p. 278–86, 2017.

<https://doi.org/10.1111/his.13218>

XIA, R-H. *et al.* Low expression of endothelin receptor B (EDNRB) is related to H3K9me3 binding with the EDNRB promoter region an disassociated 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. 258–68, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2015.04.015>

YANG, W.; ERNST, P. SET/MLL family proteins in hematopoiesis and leucemia. **Int J Hematol.**, v. 1, n. 105, p. 7–16, Jan. 2017. doi: 10.1007/s12185-016-2118-8.

<https://doi.org/10.1007/s12185-016-2118-8>

ZHANG, K.; LI, L.; ZHU, M. *et al.* Comparative analysis of histone H3 and H4 post-translational modifications of esophageal squamous cell carcinoma with different in vasive

capabilities. **Journal of proteomics**, v. 112, p. 180–89, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.004>

ZHOU, C.; ZHANG, Y.; DAI J *et al.* Pygo2 functions as a prognostic factor for glioma due to its up-regulation of h3k4me3 and promotion of mll1/ml12 complex recruitment. **Sci Rep.** v. 2, n. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep22066>



Texto redigido segundo o acordo ortográfico da língua portuguesa vigente desde 2012 e uniformizado conforme o *Vocabulário ortográfico da língua portuguesa* da Academia Brasileira de Letras (versão *on-line*).

Trabalho normalizado e formatado segundo recomendações do “Manual acadêmico do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas” e a norma NBR 14724 da Associação Brasileira de Normas Técnicas

NORMALIZAÇÃO E FORMATAÇÃO

*Edinan José Silva*

etalii@bol.com.br

REVISÃO DE PROVAS

*Daniella Cristina Borges*