



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



**RAFAEL ANTÔNIO VELÔSO CAIXETA**

**AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES PÓS-  
TRADUCIONAIS DE HISTONAS H3K9ME3 E  
H3K36ME3 EM LEUCOPLASIAS BUCAIS**

UBERLÂNDIA

2019

RAFAEL ANTÔNIO VELÔSO CAIXETA

**AVALIAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES PÓS-  
TRADUCIONAIS DE HISTONAS H3K9ME3 E  
H3K36ME3 EM LEUCOPLASIAS BUCAIS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado a Faculdade de Odontologia  
da UFU, como requisito parcial para  
obtenção do título de Graduado em  
Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota  
Loyola

Co-orientadora: Anaíra Ribeiro  
Guedes Fonseca Costa

UBERLÂNDIA

2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me permitir chegar até aqui e conhecer tantas pessoas que se tornaram muito especiais nesta jornada.

Agradeço também:

À minha **família e familiares, pai, mãe, irmã, irmão, avós, primos e tias** sem todo o apoio e amor recebido por eles nada disto seria possível;

Aos **meus queridos amigos, Amanda, Igor, Felipe, Filipe, Fernanda, Lorena, Mariana, Nicolas, Raíssa e Rani** que, mesmo a centenas de quilômetros de distâncias, sempre estiveram presentes e dispostos a me ajudar nessa caminhada, dividindo tristezas e alegrias;

As pessoas tão especiais que me acolheram nesta cidade, **Ewerton, Caíque, Renato, Igor, Luke, Max, Yann** e todas as “**Patrícias**”, por estarem sempre ao meu lado e me ensinarem o verdadeiro sentido do amor e amizade, saibam que vocês fizeram essa caminhada mais leve e prazerosa;

As minhas queridas **Ana Flávia, Isadora, Jéssica, Mary, Mirian, Tati e Tatê**, por estarem comigo, ouvindo e dividindo todos os dramas diários e sempre incentivando um ao outro a sermos pessoas melhores;

Aos **meus queridos companheiros da comissão de formatura, Anahi, Danilo, Lorena e Thalles**, que, em todos esses anos, dividiram angústias e felicidades, e tudo que passamos juntos fez com que crescêssemos juntos;

Ao pessoal do laboratório, **Débora, Lúbia, Luiz Fernando, Neide, Pedro, Roberta e Sérgio** por toda ajuda, disponibilidade e risadas compartilhadas;

Um agradecimento especial ao **prof. Adriano** e **Anaíra**, exemplos de profissionais capacitados e de pessoas extraordinárias, que sempre estiveram dispostos e presentes, que me acolheram tão bem no laboratório e me incentivaram a ser uma pessoa e um profissional melhor;

Ao apoio financeiro da **FAPEMIG** na execução deste trabalho através da concessão de bolsa de pesquisa durante grande parte do seu desenvolvimento;

Por último, mas não menos importante agradeço a essa turma que me abraçou de uma forma maravilhosa, **OBRIGADO 81!**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>%</b>	porcentagem
<b>&lt;</b>	menor
<b>=</b>	igual
<b>&gt;</b>	maior
<b>≤</b>	menor ou igual
<b>°C</b>	grau Celsius
<b>μm</b>	micrometro
<b>CA</b>	Califórnia, Estados Unidos da América
<b>CA</b>	Califórnia
<b>CCE</b>	carcinoma de células escamosas
<b>CCR</b>	Carcinoma de células renais
<b>CEP-UFU</b>	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia
<b>CPNPC</b>	Câncer de pulmão de não pequenas células
<b>C-terminais</b>	Carbóxi-terminais
<b>DAB</b>	diaminobenzidina
<b>DAP-</b>	proteína quinase associada à morte
<b>quinase</b>	
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiaminotetracético
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FOUFU</b>	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia
<b>g</b>	gramas
<b>GST</b>	Genes supressores de tumor
<b>h</b>	Horas
<b>H1</b>	histona H1
<b>H2A</b>	histona H2A
<b>H2B</b>	histona H2B
<b>H2O2</b>	Água oxigenada
<b>H3</b>	histona H3
<b>H3.3K36M</b>	Mutação do resíduo de lisina 36 para metionina (M) na histona H3.3

<b>H3K27</b>	lisina 27 da histona H3
<b>H3K36</b>	lisina 36 da histona H3
<b>H3K36me3</b>	trimetilação da lisina 36 da histona H3
<b>H3K4</b>	lisina 4 da histona H3
<b>H3K79</b>	lisina 79 da histona H3
<b>H3K9</b>	lisina 9 da histona H3
<b>H3K9ac</b>	acetilação da lisina 9 da histona H3
<b>H3K9me3</b>	trimetilação da lisina 9 da histona H3
<b>H3K9me3</b>	trimetilação da lisina 9 da histona H3
<b>H4</b>	histona H4
<b>H4K20</b>	lisina 20 da histona H4
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HE</b>	hematoxilina e eosina
<b>hMLH1</b>	Homólogo humano de mutL1
<b>HMTs</b>	metiltransferases de histona (histone methyltransferases)
<b>hMutS<math>\alpha</math></b>	Proteína de reconhecimento de alteração de pareamento de bases
<b>HPV</b>	Papiloma vírus humano
<b>K</b>	lisina
<b>Ki-67</b>	antígeno de proliferação celular
<b>LAR</b>	Lesão de alto risco
<b>LB</b>	Leucoplasia bucal
<b>LBR</b>	Lesão de baixo risco
<b>LH</b>	Leucoplasia homogênea
<b>LNH</b>	Leucoplasia não homogênea
<b>LS</b>	Língua e soalho bucal
<b>MARTs</b>	Mono-adenosina difosfato-ribosiltransferase
<b>MGMT</b>	Enzima de reparo de DNA (O6-metilguanina-DNA metiltransferase)
<b>min.</b>	minutos
<b>miRNA</b>	Micro RNA
<b>MJ</b>	Mucosa jugal
<b>ml</b>	mililitros
<b>mm<sup>2</sup></b>	Milímetros quadrados
<b>MPTH</b>	Modificações pós-traducionais de histonas

<b>nm</b>	Nanômetro
<b>N-terminais</b>	Amino-terminais
<b>O</b>	Orofaringe
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b><i>p</i></b>	nível de significância
<b>P16</b>	Proteína relacionada ao ciclo celular, denominada p16INK4A
<b>p53</b>	gene e proteína de mesmo nome (53 refere-se ao peso molecular)
<b>PA</b>	Pensilvânia
<b>PARPs</b>	Poli-adenosina difosfato-ribosiltransferase
<b>PBS-BSA</b>	Tampão fosfato/soro albumina bovina
<b>PD</b>	Palato duro
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PM</b>	Palato mole
<b>pRb</b>	Proteína do retinoblastoma
<b>PSI</b>	unidade de pressão no sistema inglês
<b>r</b>	Coefficiente de correlação
<b>RAI</b>	Rebordo alveolar inferior
<b>RARβ2</b>	Receptor beta de ácido retinóico
<b>RAS</b>	Rebordo alveolar superior
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
<b>RPD3S</b>	Complexo de histona desacetilase
<b>SET</b>	<i>Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax</i>
<b>SETD2</b>	Enzima trimetiltransferase
<b>TRIS -HCl</b>	tris(hidroximetil)aminometano (hydroxymethylaminomethane) hidrocloreídrico
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia

## SUMÁRIO

RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
1. INTRODUÇÃO .....	7
1.1. LEUCOPLASIA BUCAL.....	7
1.2. EPIGENÉTICA .....	11
1.3. HISTONAS E SUAS MODIFICAÇÕES .....	12
1.4. METILAÇÃO DE HISTONAS .....	14
1.4.1. H3K9ME3.....	15
1.4.2. H3K36ME3 .....	16
2. PROPOSIÇÃO.....	17
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. GERAIS .....	17
3.2. ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
4.1. CASUÍSTICA.....	18
4.2. ENSAIOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS .....	19
4.3. ANÁLISE E AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	21
4.4. CALIBRAÇÃO DO IMAGE J .....	21
4.5. CALIBRAÇÃO DA DISTÂNCIA.....	21
4.6. ANÁLISE DAS IMAGENS .....	23
4.7. ESTATÍSTICA .....	26
4.8. ANÁLISE DOS DADOS .....	26
5. RESULTADOS .....	27
5.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLINICOPATOLÓGICOS .....	27
5.2. ANÁLISE E AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	28
5.2.1. MPTH H3K9ME3 .....	28
5.2.2. MPTH H3K36ME3 .....	30
5.3. RELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO ENTRE H3K9ME3 E H3K36ME3 .....	32
5.4. RELAÇÃO ENTRE MPTH E DADOS DEMOGRÁFICOS E CLINICOPATOLÓGICOS .....	34
6. DISCUSSÃO.....	39
7. CONCLUSÃO.....	46
8. REFERÊNCIAS* .....	47
9. ANEXOS.....	55

## RESUMO

**Introdução:** A patogenia da leucoplasia bucal (LB) é pouco compreendida, embora eventos genéticos e epigenéticos têm sido indicados como protagonistas do processo. O objetivo deste estudo foi avaliar e analisar a presença de modificações pós-traducionais de histonas (MPTH) H3K9me3 e H3K36me3 nas leucoplasias orais e sua associação com dados clinicopatológicos. **Metodologia:** Foram avaliados casos de leucoplasia bucal para expressão de H3K9me3 (n=31) e H3K36me3 (n=32), dos quais foram coletados os dados clinicopatológicos: idade, sexo, localização, dimensões, classificação clínica, tabagismo e transformação maligna. As amostras foram classificadas em lesões de alto risco (LAR) e baixo risco (LBR), segundo critérios estabelecidos por Kujan *et al.* (2006). O ensaio imuno-histoquímico baseou-se na técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase, e a avaliação imunocolorimétrica da expressão proteica foi realizada considerando percentual de núcleos positivos utilizando o programa ImageJ. Os dados foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos a partir de duas e três comparações e testes de associação, com auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 5. **Resultados:** Foi observada maior expressão de H3K9me3 nas LB do que no seu grupo controle (p=0,0061); em comparação semelhante, expressão para H3K36me3 foi menor nas LB (p=0,0119). No tecido normal (controle) foi observada maior expressão de H3K36me3 do que de H3K9me3 (p=0,0026). Maior expressão de H3K9me3 foi notada para LB localizados em rebordos alveolares superior e inferior (p=0,0076); lesões classificadas como LBR mostraram maior expressão de H3K9me3 do que as LAR (p=0,0161). Pacientes do sexo feminino mostraram maior imunomarcagem de H3K36me3 (p=0,0044). Foi observados mais casos de alta expressão de H3K9me3 nas leucoplasias de baixo risco (p=0,0038), e para H3K36me3 mais casos de alta expressão no sexo feminino (p=0,0307). **Conclusão:** As modificações estudadas, H3K9me3 e H3K36me3, possuem papel significativo na patogênese e progressão das LB, sendo influenciadas pela localização da lesão, sexo dos pacientes e associadas a riscos diferenciados de transformação maligna.

**Palavras-chave:** Código das histonas; leucoplasia oral; imuno-histoquímica; câncer bucal; prognóstico.



## ABSTRACT

**Introduction:** The pathogenesis of oral leukoplakia (OL) is poorly understood, although genetic and epigenetic events have been indicated as protagonists of the process. The aim of this study was to evaluate the presence of post-translational histone modifications (PTHM) H3K9me3 and H3K36me3 in oral leukoplakias and their association with clinical-pathological data. **Methodology:** OL cases were selected for the analysis of H3K9me3 (n = 31) and H3K36me3 (n = 32) expression, from which clinical-pathological data were collected: age, gender, location, size, clinical type, smoking habit and malignant transformation. Samples were classified into high risk (HRL) and low risk (LRL) lesions, according to the criterion of Kujan *et al.* (2006). The immunohistochemical assay was based on the streptavidin-biotin-peroxidase technique, and an immunocolorimetric evaluation of protein expression was performed considering the percentage of nuclei using the ImageJ program. Data were analyzed by parametric and nonparametric tests with two or three comparisons and association tests, with the aid of GraphPad Prism software, version 5. **Results:** A higher expression of H3K9me3 was observed in OL compared to control (p = 0.0061); In a similar comparison, the expression for H3K36me3 was lower in OL (p = 0.0119). In normal (control) tissue, H3K36me3 was higher than H3K9me3 (p = 0.0026). Higher H3K9me3 expression was noted in OL detected in upper and lower alveolar ridges (p = 0.0076); lesions classified as LRL presented higher H3K9me3 expression than HRL (p = 0.0161). Female patients present higher immunostaining of H3K36me3 (p = 0.0044). Most cases of high expression of H3K9me3 were observed in LRL (p = 0.0038), while H3K36me3 was highly expressed in females (p = 0.0307). **Conclusion:** The studied modifications H3K9me3 and H3K36me3 play a significant role in the pathogenesis and progression of the OL, being influenced by the lesion location, patient gender and changes in malignant transformation factors.

**Keywords:** Histone code; oral leukoplakia; immunohistochemistry; mouth neoplasms; prognosis.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. LEUCOPLASIA BUCAL

O termo leucoplasia bucal (LB) se refere a lesões bucais que se apresentam como placas predominantemente brancas que não podem ser caracterizadas clinicamente ou patologicamente como qualquer outra entidade nosológica, e que representam risco para o desenvolvimento de câncer (BRITO; GOMES; GUIMARAES; CAMPOS *et al.*, 2014; VAN DER WAAL, 2015; WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). Por isso, seu diagnóstico deve ser inicialmente abordado pela exclusão de fatores etiológicos que possam ser atribuídos como causa daquela expressão clínica, exceção feita ao fumo, e pela exclusão de outras variações de normalidade da mucosa ou lesões brancas, nosologicamente definidas como linha alba, leucoedema, queratose friccional, estomatite nicotínica, líquen plano, lúpus eritematoso, estomatite urêmica, nevo branco esponjoso, por exemplo (VILLA; WOO, 2017). Recomenda-se, neste conceito, que a definição do diagnóstico de LB também considere a avaliação histopatológica das lesões suspeitas, a fim de identificar aspectos histopatológicos que traduzam alterações intrínsecas do epitélio, descartando concomitantemente outras entidades nosológicas com aspectos histopatológicos bem definidos (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007).

Estima-se que a prevalência global da LB seja entre 1.49% a 2.60%, sendo significativamente mais frequente em homens. Contudo, sua frequência parece vincular-se a distribuição geográfica dos pacientes acometidos. É mais comum em indivíduos mais velhos, após quarta década de vida (VILLA; WOO, 2017; WARNAKULASURIYA, 2018).

O desenvolvimento da LB tem sido atribuído a fatores de riscos variados, especialmente o tabagismo e ao consumo de álcool (LODI; PORTER, 2008; MASEREJIAN; JOSHIPURA; ROSNER; GIOVANNUCCI *et al.*, 2006; SILVERMAN; GORSKY; LOZADA, 1984; VILLA; WOO, 2017; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016), independente do tipo e quantidade ingerida (MASEREJIAN; JOSHIPURA; ROSNER; GIOVANNUCCI *et al.*, 2006). A infecção por papiloma vírus humano (HPV) tem sido cogitada como possível causa adicional para a doença, no entanto essa relação ainda é elusiva (BAGAN; JIMENEZ; MURILLO; GAVALDA *et al.*, 2007; FORNATORA; JONES; KERPEL; FREEDMAN, 1996; VAN DER WAAL, 2009). Há ainda um grupo de LB

idiopáticas pela inexistência de causas aparentes relacionadas a sua presença (WARNAKULASURIYA, 2018).

Clinicamente, são, geralmente, assintomáticas. Podem acometer qualquer local da boca e orofaringe, apresentando-se como lesão única, com maior frequência em ventre, borda lateral de língua e assoalho bucal (WARNAKULASURIYA, 2018; ZHANG; CHEUNG; LAM; CHENG *et al.*, 2001). São divididas em dois grupos: 1) leucoplasias homogêneas (LH), e 2) leucoplasias não homogêneas (LNH), com base nas características morfológicas de sua superfície, coloração, textura e espessura (VAN DER WAAL, 2009; VILLA; WOO, 2017; WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). A LH é caracterizada por uma placa branca e fina, de relevo superficial uniforme, com pelo menos uma área com bordas bem delimitada. As alterações de relevo superficial presentes são decorrentes daquelas próprias da anatomia da região (VILLA; WOO, 2017). A LNH consiste em lesões que apresentam áreas brancas intercaladas com áreas vermelhas (eritoplásicas), com áreas de superfície nodular, ou verrucosa (VAN DER WAAL, 2009; VILLA; WOO, 2017). O seu potencial de crescimento é variável, geralmente mencionado com crescimento lento e progressivo (CERERO-LAPIEDRA; BALADE-MARTINEZ; MORENO-LOPEZ; ESPARZA-GOMEZ *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de LB não idiopática está associada a exposição aos fatores de risco variados (MASEREJIAN; JOSHIPURA; ROSNER; GIOVANNUCCI *et al.*, 2006; VILLA; WOO, 2017), e existem casos que apresentaram regressão, e até mesmo desaparecimento, após a paralização da exposição ao uso de fumo/álcool concomitantemente, além de outros fatores de riscos combinados (SUGAR; BANOCZY, 1969), levando em consideração o efeito sinérgico entre o consumo de álcool e tabaco no desenvolvimento de LB (GUPTA, 1984).

Histologicamente, as LB podem apresentar paraqueratose, hiperortoqueratose acantose, hiperplasia, hipotrofia e displasia epiteliais (BEWLEY; FARWELL, 2017; EL-NAGGAR; CHAN; TAKATA; GRANDIS *et al.*, 2017; VAN DER WAAL, 2009; VILLA; WOO, 2017). Considerando os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), as displasias podem ser classificadas como: (1) leve, quando as alterações arquiteturais e celulares teciduais são limitadas ao terço inferior do epitélio; (2) moderada, quando as alterações se estendem até o terço médio do epitélio; (3) e intensa, quando as alterações afetam toda a espessura do epitélio. Esta última categoria tem sido reconhecida, com algum dissenso na literatura, como

carcinoma *in situ* (EL-NAGGAR; CHAN; TAKATA; GRANDIS *et al.*, 2017; VAN DER WAAL, 2009). Conquanto este sistema tenha tido uma importância histórica e ainda continue sendo padrão, várias críticas a sua utilização tem sido ressaltas na literatura. A mais relevante é a incapacidade de se diferenciar casos de displasia moderada (CAMARA; DUTRA; TAKAHAMA JUNIOR; FONTES *et al.*, 2016; KUJAN; OLIVER; KHATTAB; ROBERTS *et al.*, 2006) e a sua relevância na estimativa da transformação maligna (CAMARA; DUTRA; TAKAHAMA JUNIOR; FONTES *et al.*, 2016).

A partir da identificação de aspectos citológicos e arquiteturais associados às lesões potencialmente malignas, um sistema binário foi proposto para a gradação de displasia, a partir de casos que desenvolveram ou não transformação maligna (KUJAN; OLIVER; KHATTAB; ROBERTS *et al.*, 2006). Neste sistema, são consideradas lesões de baixo risco (LBR) aquelas que, no exame histopatológico, apresentam menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas; e lesões de alto risco (LAR) aquelas nas quais se observa um mínimo de quatro alterações arquiteturais e cinco citológicas (KUJAN; OLIVER; KHATTAB; ROBERTS *et al.*, 2006). Os critérios utilizados tanto no sistema OMS quanto no sistema binário são explicitados na Tabela 1.

**Tabela 1. Critérios aplicados para o diagnóstico das displasias.**

<b>Alterações da arquitetura tecidual</b>
Estratificação epitelial irregular
Perda de polaridade da camada basal
Projeções epiteliais em forma de gota
Aumento do número de mitoses
Mitoses superficiais anormais
Disqueratose
Presença de pérolas de queratina dentro das cristas epiteliais
<b>Alterações citológicas</b>
Anisocitose
Anisocariose
Variações do tamanho e forma dos núcleos
Variações do tamanho e forma das células
Aumento da proporção núcleo/citoplasma
Núcleos com tamanho aumentado
Figuras de mitoses atípicas
Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Hipercromatismo

Adaptado de EL-NAGGAR *et al.* (2017) e Van der Waal (2009)

A taxa global de transformação maligna das LB varia entre 3 e 15%, e a taxa anual global entre 1 e 3%. O risco de malignização possui relação de dependência com os fatores de risco existentes e com as características clínicas e histopatológicas da lesão (VILLA; WOO, 2017).

O aspecto mais relevante do comportamento desta doença é o potencial inerente de transformação maligna. Esta discussão tem sido recentemente revisada, e parece não haver uma definição de associação absoluta entre algum tipo de característica clínica e o potencial de transformação maligna. Todavia, historicamente, algumas características ainda persistem como norteadoras desta previsão, entre as quais localização (língua e soalho bucal), LNH, lesões em mulheres, maiores que 200mm<sup>2</sup>, com maior tempo de

evolução, as idiopáticas, e para alguns autores, a presença de colonização por *Candida sp*, e a presença de displasias (NAPIER; SPEIGHT, 2008; VAN DER WAAL, 2009).

Em termos de progressão e desenvolvimento de malignidade, as LB são consideradas processos dinâmicos (NAPIER; SPEIGHT, 2008), e com o crescimento dos estudos de eventos genéticos e epigenéticos em doenças potencialmente malignas, tem-se aumentado a possibilidade de descobrir biomarcadores que identifiquem o risco de transformação maligna nestas lesões, melhorando o seu diagnóstico e, conseqüentemente, o prognóstico.

O uso de biomarcadores para identificação da carcinogênese oral é baseado na detecção de marcadores de proliferação, como a Ki-67, e as proteínas envolvidas no ciclo celular, como, por exemplo, as proteínas p53, pRb e ciclina D1 (PARLATESCU; GHEORGHE; COCULESCU; TOVARU, 2014). Os avanços em oncogenômica têm demonstrado que alterações epigenéticas podem exercer um papel importante no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, incluindo o carcinoma de células escamosas (CCE) (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017). Todavia, ainda não existem definições objetivas quanto a participação da epigenética na sua patogenia e se, assim definidos, poderiam se constituir marcadores específicos capazes de prever a transformação maligna na leucoplasia bucal.

## 1.2. EPIGENÉTICA

A epigenética consiste no estudo de alterações hereditárias na expressão gênica e organização da cromatina que não estão associadas às modificações na sequência de bases do DNA (SHAW, 2006). Existem diversos fatores conhecidos que são capazes de gerar modificações em células de mamíferos, gerando um fenótipo transformado epigeneticamente, isto é, sem alterar a sequência de bases do DNA da célula, são eles: irradiação, fumaça de tabaco, estresse, hormônios (como o estradiol, por exemplo), análogos de bases nitrogenadas, cádmio, arsênico, níquel, espécies reativas de oxigênio e vários outros produtos químicos (VERMA; SRIVASTAVA, 2002).

Diversos mecanismos estão ligados às alterações epigenéticas, os mais estudados são: (1) a metilação do DNA; (2) as modificações pós-traducionais de histonas (MPTH); (3) o silenciamento gênico mediado por RNA não-codificante, também conhecidos como micro RNA (miRNA) (DAWSON; KOUZARIDES, 2012; FEINBERG; TYCKO, 2004; TABY; ISSA, 2010). Estes mecanismos atuam por meio

de modificações químicas no DNA e suas proteínas associadas alterando a expressão gênica sem modificar a sequência do DNA (SHAW, 2006).

Uma diferença importante entre o mecanismo epigenético e o genético na gênese das doenças e que tem potencial terapêutico é que o primeiro pode ser revertido através do uso de agentes químicos (VERMA; SRIVASTAVA, 2002). Por exemplo, os principais mecanismos dos agentes terapêuticos, até o momento, são baseados na reversão da metilação do DNA e na inibição da desacetilação das histonas (LAIRD, 2005; SHAW, 2006).

Diversos estudos demonstram o papel de eventos epigenéticos em lesões potencialmente malignas e carcinoma de células escamosas. Como, por exemplo, Piscopo *et al.* (2006) avaliaram a expressão de mRNA das histonas H3 e H3.3 em carcinomas de células escamosas e leucoplasias bucais, investigando sua influência na patogênese destas lesões em associação com a infecção por HPV e hábitos de etilismo e tabagismo.

### 1.3. HISTONAS E SUAS MODIFICAÇÕES

Estima-se que existam 1,8 metros lineares de DNA na célula eucarionte organizados estruturados tridimensionalmente, e compactados dentro do núcleo celular por meio de associações com proteínas, denominadas histonas (VIRANI; COLACINO; KIM; ROZEK, 2012). Esse complexo formado por DNA-histonas é a unidade básica da cromatina, compondo a maior parte do material no núcleo celular, e denominado nucleossomo (VERMA; SRIVASTAVA, 2002; VIRANI; COLACINO; KIM; ROZEK, 2012).

O nucleossomo é composto por um octâmero de histonas envolto por uma fita de DNA, sendo dois pares de cada tipo (H2A, H2B, H3 e H4) (LUGER, 2003; VERMA; SRIVASTAVA, 2002; VIRANI; COLACINO; KIM; ROZEK, 2012). O DNA que se enrola em volta desse conjunto de histonas tem aproximadamente 146 pares de bases nitrogenadas (BARSKI; CUDDAPAH; CUI; ROH *et al.*, 2007). O conjunto DNA-histonas é organizado pela histona H1, encontrada fora do complexo, que se liga ao DNA nos pontos de entrada e saída do nucleossomo (ALLAN; HARTMAN; CRANE-ROBINSON; AVILES, 1980).

As histonas têm extensões amino e carbóxi-terminais, chamadas "caudas". (VERMA; SRIVASTAVA, 2002). Essas caudas N e C-terminais são passíveis de sofrer modificações pós-traducionais, como acetilação, metilação, fosforilação,

sumoilação, ribosilação e ubiquitinação, que contribuem para a modulação da expressão gênica (GUO; ZHENG; PARK; LV *et al.*, 2014).

A carcinogênese oral é influenciada por modificações nos mecanismos epigenéticos, incluindo as modificações pós-traducionais de histonas (MPTH), as quais têm um papel essencial na organização e remodelação da cromatina para regulação da expressão gênica: ativando-a ou inibindo-a (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017).

As MPTH desempenham papéis importantes na transmissão da memória transcricional epigenética, a qual é armazenada dentro das células sob a forma de um código, (JENUWEIN; ALLIS, 2001), denominado código de histona. Como mencionado, estas modificações codificadas, modulam a expressão gênica, afetando o acesso da maquinaria transcricional da célula ao DNA (KOUZARIDES, 2007). Assim, como reguladoras globais da expressão gênica, a maioria das modificações tem potencial de afetar a gênese e progressão do câncer (JENUWEIN; ALLIS, 2001).

A desregulação da acetilação de histonas pode levar a atividade transcricional epigenética descontrolada de diferentes genes, (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017), através do relaxamento da cromatina, que facilita o acesso da maquinaria de transcrição de genes específicos (FERRARI; STRUBIN, 2015). A metilação de resíduos específicos de lisina (K), nas caudas das histonas H3 e H4 leva a desregulação na manutenção da cromatina e a afeta a regulação adequada da expressão gênica (BENNETT; SWAROOP; TROCHE; LICHT, 2017). A fosforilação da histona desempenha um papel na resposta ao reparo do dano no DNA, na estabilidade cromossômica e no apoptose (PORTELA; ESTELLER, 2010). A ubiquitinação, quando comparada às outras modificações, é mais extensa e não tem suas funções claras e definidas, mas é provável que tenha papel na manutenção física da cromatina aberta através de um processo de cunhagem, devido ao seu tamanho (KOUZARIDES, 2007). A sumoilação antagoniza a acetilação e a ubiquitinação, que ocorrem no mesmo resíduo de lisina, sendo repressiva para a transcrição gênica em leveduras (KOUZARIDES, 2007). O processo de ribosilação é mediado por duas enzimas denominadas MARTs (Mono-ADP-ribosiltransferases) ou PARPs (poli-ADP-ribosepolimerases), e embora a função destas enzimas tenha sido associada à transcrição gênica, não há evidência de que as suas atividades catalíticas estejam envolvidas nesta modificação, assim este processo tem um papel mal definido no que diz respeito à sua função (KOUZARIDES, 2007).



Foi observado que alterações na histona H3K9ac podem ocorrer durante o processo de carcinogênese oral, estando associadas ao aumento na taxa de proliferação celular e na transição epitelial-mesenquimal, acreditando que esta histona pode ser um marcador de prognóstico para o carcinoma de células escamosas (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017). Além da acetilação estudos avaliaram outras modificações pós-traducionais de histonas em amostras de tecido normal, leucoplasia bucal e carcinoma de células escamosas. Por exemplo, a presença de dimetilação e trimetilação do resíduo de lisina 4, H3K4me2 e H3K4me3 respectivamente, foi observada em amostras de LB, as quais apresentaram padrão mais próximo ao estado patológico do que da normalidade (MANCUSO; MATASSA; CONTE; COLELLA *et al.*, 2009).

#### 1.4. METILAÇÃO DE HISTONAS

A metilação das histonas ocorre nas cadeias laterais dos resíduos de arginina, lisina e histidina (DAWSON; KOUZARIDES, 2012), e está associada tanto à ativação transcricional quanto à repressão (VIRANI; COLACINO; KIM; ROZEK, 2012). As lisinas podem ser mono-, di- ou tri- metiladas, enquanto os resíduos de arginina podem ser metilados simetricamente, quando ocorre em ambos os lados do resíduo, observando em um plano bidimensional, ou assimetricamente, quando ocorre em somente um dos lados (BANNISTER; SCHNEIDER; MYERS; THORNE *et al.*, 2005; DAWSON; KOUZARIDES, 2012).

Os sítios de metilação mais bem caracterizados na literatura são aqueles que ocorrem nos resíduos de lisina. As enzimas responsáveis pela metilação da lisina contêm um domínio SET (*Su(var)3-9*, *Enhancer-of-zeste*, *Trithorax*) como unidade catalítica com atividade metiltransferase (BENNETT; SWAROOP; TROCHE; LICHT, 2017; DAWSON; KOUZARIDES, 2012). O domínio SET é frequentemente fundido a domínios regulatórios e de segmentação (KUDITHIPUDI; JELTSCH, 2014), e tem como uma das suas funções conferir a especificidade da enzima sobre a histona-alvo (XIAO; JING; WILSON; WALKER *et al.*, 2003). Essas enzimas são denominadas de histona-lisina-N-metiltransferases, também conhecidas como K-metiltransferases, e a reação envolve a transferência de grupos metil do cofator S-adenosil metionina (VIRANI; COLACINO; KIM; ROZEK, 2012).

Embora vários resíduos de lisina nas diversas histonas sejam metilados, os mais estudados são H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 e H4K20, sendo que alguns,

como H3K4 e H3K36, estão associados com genes ativos em eucromatina, enquanto outros, como H3K9 e H3K27, têm associação com regiões de heterocromatina do genoma (BARKSI; CUDDAPAH; CUI; ROH *et al.*, 2007). A eucromatina é caracterizada por uma densidade relativamente baixa de DNA e altas taxas de transcrição gênica, sendo considerada transcricionalmente ativa, enquanto a heterocromatina tem uma densidade relativamente alta de DNA e baixas taxas de transcrição gênica, considerada, por sua vez, transcricionalmente silenciosa (BECKER; NICETTO; ZARET, 2016; RICE; ALLIS, 2001).

#### 1.4.1. H3K9ME3

A metilação em H3K9 foi implicada na formação da heterocromatina produzindo silenciamento gênico (BANNISTER; ZEGERMAN; PARTRIDGE; MISKA *et al.*, 2001; RICE; ALLIS, 2001). A trimetilação do resíduo de lisina 9 na histona 3 (H3K9me3) foi associada à estabilização do genoma, protegendo o DNA de danos causados por reagentes genotóxicos e mutagênicos. Durante o processo de transformação maligna seus níveis são reduzidos, sendo esta MPTH considerada uma característica epigenética crítica para a tumorigênese. Em teoria, um gene com metilação aumentada e transcrição reprimida pode funcionar como supressores de tumor (LI; LEI; ZHAO; LI *et al.*, 2017).

Diversos estudos investigaram a presença de H3K9me3 em outros tumores, associando-a a algumas variáveis, por exemplo: Park *et al.* (2008) encontrou a presença dessa MPTH em pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico, sendo também observada correlação positiva com o estágio do tumor, invasão linfocelular e recorrência do câncer, além de mostrar que maiores níveis dessa proteína têm associação com menor taxa de sobrevivência. Assim, pode ser usada como um preditor de recorrência e como fator prognóstico independente em adenocarcinomas gástricos, onde imunomarcagem mais forte indica pior prognóstico Rogenhofer *et al.* (2012) avaliou a presença de H3K9me3 em diversos subtipos de carcinoma de células renais (CCR), incluindo células claras, papilares, cromóforos e sarcomatóides, em oncocitoma renal e em tecido renal normal, e encontrou baixos níveis de H3K9me3 nestas lesões em comparação aos tecidos normais e associando esses níveis com o estadiamento avançado dessas lesões, o que pode auxiliar na identificação de pacientes portadores de CCR com pior prognóstico. Song *et al.* (2012) investigaram a presença de H3K9me3 em câncer de pulmão de não pequenas células (CPNPC) e

observou fraca marcação nuclear nessas lesões, também foi encontrada correlação positiva entre a baixa marcação com a recorrência desse tumor e sobrevida livre da doença, sugerindo que esta MPTH atue como potenciais marcadores de recorrência tumoral e sobrevida livre de doença em pacientes com CPNPC.

A redução dos níveis de H3K9me3 pode associar-se a transformação maligna através por meio do aumento da expressão de oncogenes (LI; LEI; ZHAO; LI *et al.*, 2017). Estudos defendem a ideia da utilização desta MPTH como marcadora de prognóstico em alguns tipos de câncer (CHERVONA; COSTA, 2012), incluindo pulmão (SONG; NOH; LEE; EUN *et al.*, 2005), próstata (ELLINGER; KAHL; VON DER GATHEN; ROGENHOFER *et al.*, 2010), mama (LESZINSKI; GEZER; SIEGELE; STOETZER *et al.*, 2012), leucemia (MULLER-TIDOW; KLEIN; HASCHER; ISKEN *et al.*, 2010) e estômago (PARK; JIN; KIM; YOOK *et al.*, 2008).

#### 1.4.2. H3K36ME3

A trimetilação do resíduo de lisina 36 na histona 3 (H3K36me3) tem relação com a regulação do processo de reparo do DNA, *splicing* alternativo e remodelação da cromatina, em organismos eucariotos (ZHANG; LI; ZHU; WANG *et al.*, 2015). As variações qualitativas na execução dessas funções leva a uma desregulação na expressão de alguns genes, o que facilitaria o desenvolvimento de neoplasias malignas (ZHAO; CABALLERO; LEVY; STEVENSON *et al.*, 2009).

Níveis elevados de H3K36me3 foram detectados próximo da extremidade 3' dos genes (BARSKI; CUDDAPAH; CUI; ROH *et al.*, 2007). Essa localização indica que os níveis dessas modificações aumentam em direção a essa extremidade, que é uma região de transcrição ativa (BANNISTER; SCHNEIDER; MYERS; THORNE *et al.*, 2005). Assim, outro papel importante desta modificação é a ativação gênica (BARSKI; CUDDAPAH; CUI; ROH *et al.*, 2007).

Alguns estudos investigaram a presença desta MPTH em outros tumores, como por exemplo: Sant'Ana (2014) investigou a presença de H3K36me3 em pacientes portadores de tumores primários não metastáticos e primários metastáticos de carcinoma de células escamosas bucal, sem identificar nenhuma correlação prognóstica significativa. Tamagawa *et al.* (2013) analisaram esta mesma MPTH em pacientes com metástase em linfonodos e portadores de câncer colorretal, e encontrou correlação significativa entre os dados clínico-patológicos destes pacientes, evidenciando o papel desta proteína na progressão desse tipo de câncer. Lu *et al.* (2019) buscaram a presença

de H3K36me3 em condroblastomas, e observou que nessas lesões não ocorre perda completa dessa MPTH, no entanto apresenta expressão heterogênea, dificultando a sua avaliação nesses tumores.

A redução ou perda de H3K36me3 tem relação direta com o surgimento de gliomas e condroblastomas (BEHJATI; TARPEY; PRESNEAU; SCHEIPL *et al.*, 2013; MORISHITA; DI LUCCIO, 2011), e também um maior risco de morte pelo carcinoma de células renais e progressão após nefrectomia para carcinoma de células renais de células claras (HO; KAPUR; JOSEPH; SERIE *et al.*, 2016). Existe associação entre H3K36me3 e uma função supressora de tumor, o que levaria a progressão de cânceres de mama, mostrando a associação dessa modificação como um potencial indicador prognóstico (NEWBOLD; MOKBEL, 2010).

Com os avanços em Oncogenômica mostrando o papel das alterações epigenéticas no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer, incluindo o carcinoma de células escamosas (WEBBER; WAGNER; CURRA; VARGAS *et al.*, 2017), associado à quantidade limitada de estudos que realizaram a investigação das duas MPTH em questão, em leucoplasias bucais ou outros distúrbios potencialmente malignos, motivaram a realização deste estudo.

## **2. PROPOSIÇÃO**

Baseado na revisão realizada na literatura foi decidido investigar modificações de histonas em amostras de leucoplasia bucal, por meio de ensaio imuno-histoquímico, avaliando a presença de antígenos identificados com modificações globais de histonas referentes às proteínas H3K9me3 e H3K36me3 e analisando a possibilidade de utilizá-las como marcadoras de prognóstico desse distúrbio potencialmente cancerizável.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. GERAIS**

Analisar a imunomarcção de antígenos relacionados às MPTH em amostras de leucoplasia bucal, comparando sua reatividade imuno-histoquímica com os casos controles oriundos de mucosa normal e as diferentes variáveis demográficas e clinicopatológicas.

### 3.2. ESPECÍFICOS

- Identificar e descrever o padrão de reatividade imunohistoquímica em epitélio normal e LB para as MPTH H3K9me3 e H3K36me3;
- Investigar a correlação entre os níveis de imunorreatividade das MPTH nas LB e nas amostras de epitélio normal da mucosa;
- Investigar diferenças e associações entre padrões de imunorreatividade das MPTH e características demográficas dos pacientes e clinicopatológicas das lesões;
- Analisar comparativamente os níveis de imunorreatividade das MPTH mencionadas nos casos de transformação maligna.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU) (CAAE: 60858016.1.0000.5152, CEP-UFU #1.516.159) (Anexo 1).

### 4.1. CASUÍSTICA

A casuística empregada neste estudo foi composta de casos de LB diagnosticadas no período de 1994 a 2016, a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG-Brasil). Foram selecionadas previamente um total de 52 casos para os quais as anotações nas fichas clínicas e de biópsia continham dados suficientes para definir o diagnóstico de LB segundo critérios da OMS estabelecidos em sua última publicação (EL-NAGGAR; CHAN; TAKATA; GRANDIS *et al.*, 2017; WARNAKULASURIYA, 2018). Desta amostra, 20 casos foram descartados pela ausência de material suficiente para a realização dos experimentos laboratoriais e ausência de dados suficientes para as análises pretendidas. Sendo os principais critérios de inclusão utilizados: lesões cujo diagnóstico clínico de leucoplasia bucal foi confirmado através do exame histopatológico, independente do grau de displasia, e presença de material e dados clínicos suficientes para realizar as análises propostas. O único critério absoluto de exclusão foi ausência de material e dados clínicos que impossibilitasse a realização das análises. Para os casos controle o único critério de inclusão foi: pertencer à área de mucosa oral normal, independente da

região, e o de exclusão foi de ausência de material para realizar os ensaios imuno-histoquímicos.

Ao final, 32 casos foram utilizados para avaliação da MPTH H3K36ME3 e 31 casos da MPTH H3K9ME3. Para todos os casos incluídos foram coletados dados demográficos e clinicopatológicos, a saber: idade e sexo dos pacientes; exposição a produtos do tabaco, presença ou não de tabagismo, localização primária e dimensão das lesões, tipo clínico, informação sobre transformação maligna da doença.

Foram constituídos dois grupos controles formados por tecidos de mucosa bucal, de diferentes regiões bucais (mucosa de lábio inferior, mucosa jugal, região de saco de vestibulo, gengiva vestibular de região posterior, palato duro e assoalho bucal), sendo 15 casos para os ensaios com MPTH H3K36ME3 e 11 casos para os ensaios com MPTH H3K9ME3.

#### 4.2. ENSAIOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados sobre cortes de 3 µm obtidos a partir dos blocos teciduais fixados em formalina (solução de formol a 10%) e incluídos em parafina, montados em lâminas silanizadas/polarizadas StarFrost® (Knittel Glaser, Brunsquive, BS, Alemanha), conforme protocolo próprio do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFU, pela técnica de bloqueio da atividade de ligação à avidina endógena baseada no trabalho de Miller *et al.* (1999).

Inicialmente, foi feita a desparafinação através da incubação dos cortes no banho de xilol (Synth, São Paulo, SP, Brasil) em estufa, à temperatura de 56°C por 30 minutos (min.), e, em seguida, durante 15 min. em um segundo banho de xilol à temperatura ambiente. Adiante, realizou-se a hidratação em sessões decrescentes de etanol: duas passagens em etanol 100%, uma passagem em etanol 95% e 80% respectivamente, num período de 5 min. cada. Para remoção do pigmento formólico, as amostras foram submersas em solução de hidróxido de amônio a 10% (Synth) e em etanol a 95% durante 10 min., e após essa etapa foram feitas lavadas em água corrente por 5 min.

O processo de resgate antigênico foi realizado a partir da imersão dos cortes em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Amresco, Solon, OH, EUA) a 1,0 mM, tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em um ciclo de 15 min. à temperatura de 110°C, em câmara termopressurizada (Steamer – Biocare Medical,

Concord, CA, EUA). Após resfriamento por 40 min, os cortes foram submetidos à lavagem com cinco banhos de água destilada.

Sequencialmente, foi realizado o bloqueio da atividade endógena da biotina através da imersão das lâminas, durante 15 min., à temperatura ambiente, em solução preparada com duas claras de ovos dissolvidas em 200 mL de água deionizada e filtrada por três vezes em gaze, seguidos de 10 banhos em água destilada. Para o bloqueio da atividade endógena da avidina, os cortes foram imersos por 15 min. à temperatura ambiente em solução preparada com 30g de leite em pó desnatado (Itambé<sup>®</sup>, São Paulo, SP, Brasil) dissolvido em 180 ml de água deionizada, seguido por lavagem com dez banhos de água destilada (MILLER; KUBIER; REYNOLDS; TURNBOW; *et al.*, 1999).

Em seguida, para a realização do bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela imersão dos cortes em três banhos de 10 min. cada em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) a 10 volumes, seguida por cinco banhos em água destilada e, então, três lavagens de cinco min. cada uma em solução tampão tris hidroximetil aminometano hidrocloreídrico (Tris-HCl), 20 mM pH 7,4 (Amresco, Dallas, Texas, USA), todos à temperatura ambiente.

As lâminas foram então incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida, em solução bloqueadora de reações inespecíficas a base de caseína (Background Sniper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 15 min. Em seguida, os anticorpos primários diluídos em solução PBS-BSA (tampão fosfato/soro albumina bovina) na titulação previamente padronizada (1:2.000 para H3K9me3, referência ab8898; 1:10.000 para H3K36me3, Referência: ab9050) foram depositados sobre os cortes histológicos, e incubados por duas horas à temperatura ambiente, em câmara úmida. Todos os anticorpos utilizados foram fornecidos pela Abcam (Cambridge, Reino Unido). Como controle negativo, omitiu-se os anticorpos primários nos respectivos ensaios.

Em seguida, cortes foram lavadas em dois banhos de solução de Tris-HCl por 2 min., cada, e incubados novamente por 20 min. em câmara úmida, à temperatura ambiente, utilizando-se o sistema de amplificação estreptavidina-biotina-peroxidase (Trekkie Universal Link, Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Na sequência, os cortes foram lavados por dois banhos em solução de Tris-HCl durante dois min cada.

O complexo terciário (estreptavidina conjugada a peroxidase, Trekkie Avidin-HRP Label, Biocare Medical) foi aplicado por 10 min., em câmara úmida, à

temperatura ambiente. Ao final, os cortes passaram por duas lavagens em tampão Tris-HCl, por período de 2 min. cada.

Para o processo de revelação da reação utilizou-se substrato cromogênico 3.3' tetra-hidrocloro de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (Betazoid DAB Chromogen Solution, Biocare Medical) por 5 min, seguido por lavagem em água corrente também por 5 min.

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

#### 4.3. ANÁLISE E AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para análise imuno-histoquímica da expressão de H3K9me3 e H3K36me3 foi utilizado o *software* ImageJ (Image Processing and Analysis in Java, versão 1.38e/Java 1.5.0\_09), por meio da ferramenta *Cell Counter*, com a finalidade de realizar a avaliação proporcional de núcleos imunomarcados.

Para a realização da análise todas as lâminas foram escaneadas em ampliação original de 200X, usando o *scanner* de lâminas Slide Scanner Aperio AT2 (Leica Biosystem Imaging, Inc., Nussloch, Germany) acoplado a um computador (Dell Precision T3600), e o *software* ImageJ. (JENSEN, 2013).

#### 4.4. CALIBRAÇÃO DO IMAGE J

Antes de iniciar as análises, foi realizada a calibração dos parâmetros de distância do ImageJ para que todas as imagens tenham o mesmo padrão de análise. Para isso utilizou-se o protocolo disponível no site [www.imagej.inh.gov](http://www.imagej.inh.gov).

#### 4.5. CALIBRAÇÃO DA DISTÂNCIA

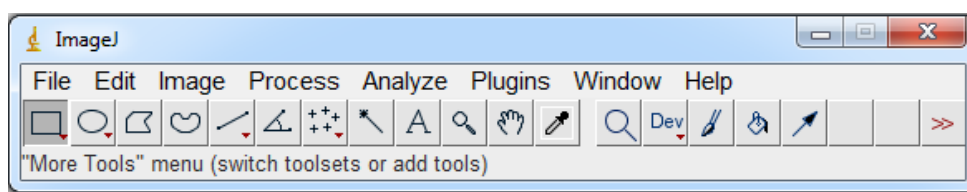
A calibração de distância permite a obtenção de informações a respeito do número de pixels presentes em uma determinada área de valor conhecido. Com isto é possível estabelecer a relação entre intensidade de cor, que diz respeito à imunomarcção, e pixels avaliados, visando dados proporcionais (relativos) para os casos a serem analisados. Para esta etapa, utilizou-se a imagem aleatória de um caso, seguindo as etapas:



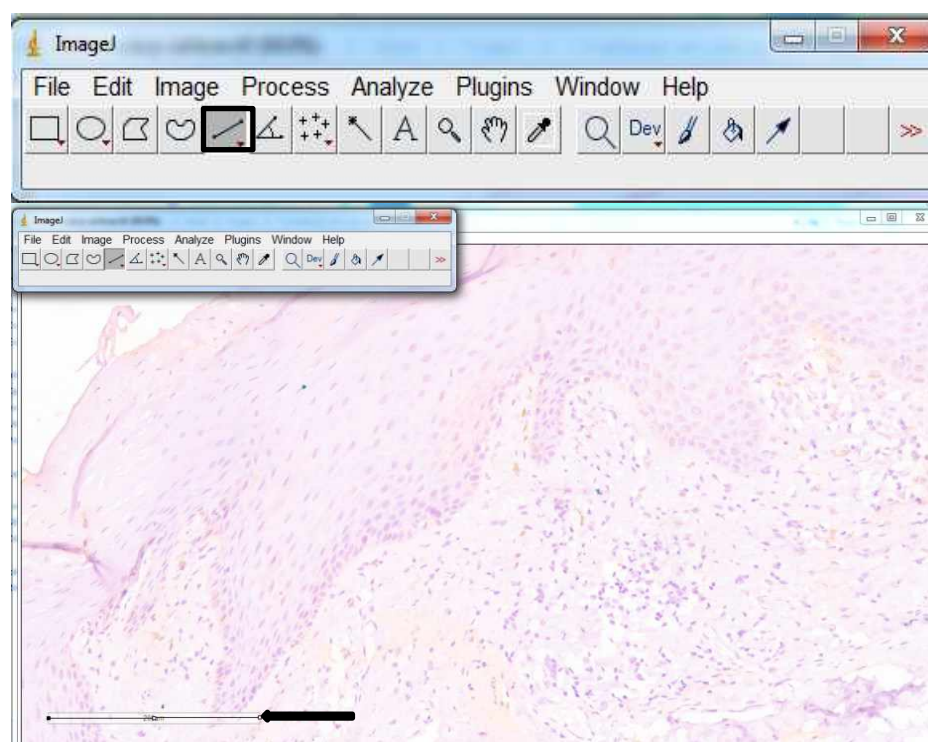
1. Realizar a mensuração do valor de pixels presentes em 200  $\mu\text{m}$  através da ferramenta *Straight line*, dispondo-a sobre a barra de medida em  $\mu\text{m}$  (200  $\mu\text{m}$ ) presente na imagem (Figuras 1 e 2);

2. Acessar na barra de ferramentas a opção *Analyze* e, em seguida, *Set Scale*, assim disponibiliza uma janela específica para inserção dos dados relativos à distância em  $\mu\text{m}$ : no caso em questão distância 200, e unidade,  $\mu\text{m}$  (Figura 3);

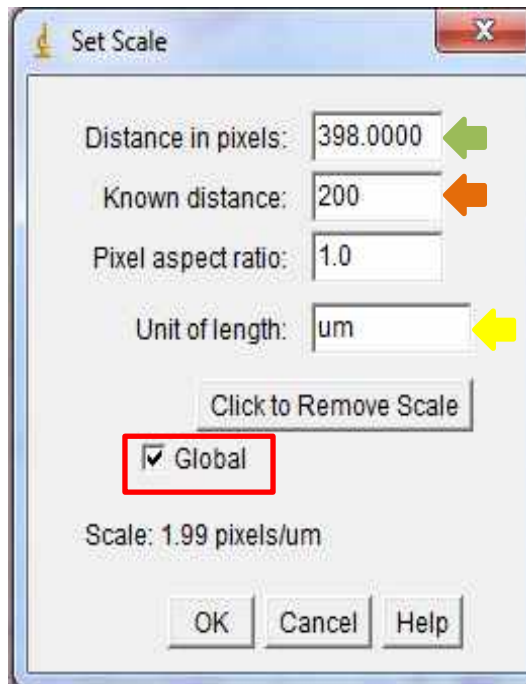
3. Marcar a opção *Global* e, por fim, *OK*, assim os dados fornecidos serão aplicados a todas as imagens abertas posteriormente à essa calibração (Figura 3).



**Figura 1.** Tela inicial do ImageJ contendo diferentes ícones relativos às ferramentas.



**Figura 2.** Calibração da distância. O quadrado preto indica a ferramenta *Straight line*, e a seta preta indica a barra de medida em mm (200) utilizada para calibração.



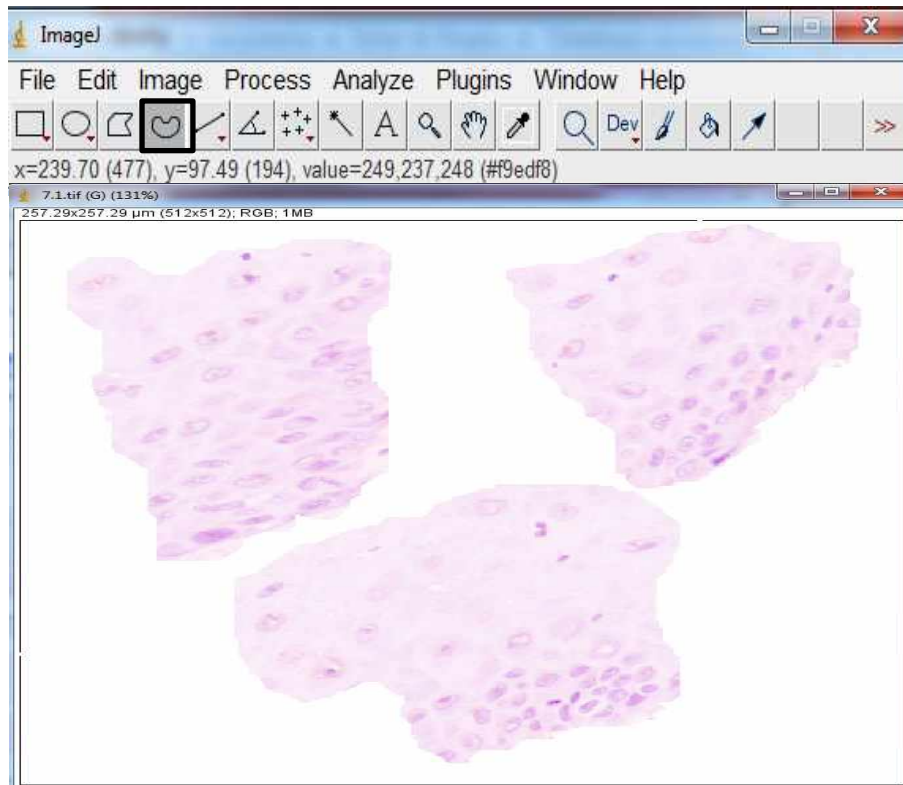
**Figura 3.** Janela para inserção de dados para calibração de dimensão. O dado *Distance in Pixels*, representado pela seta verde, aparece automaticamente. Os valores para *Known Distance*, seta laranja, e *Unit of Length*, seta amarela, são inseridos como mostrado. A opção *Global* para padronizar a calibração é representada pelo retângulo vermelho.

#### 4.6. ANÁLISE DAS IMAGENS

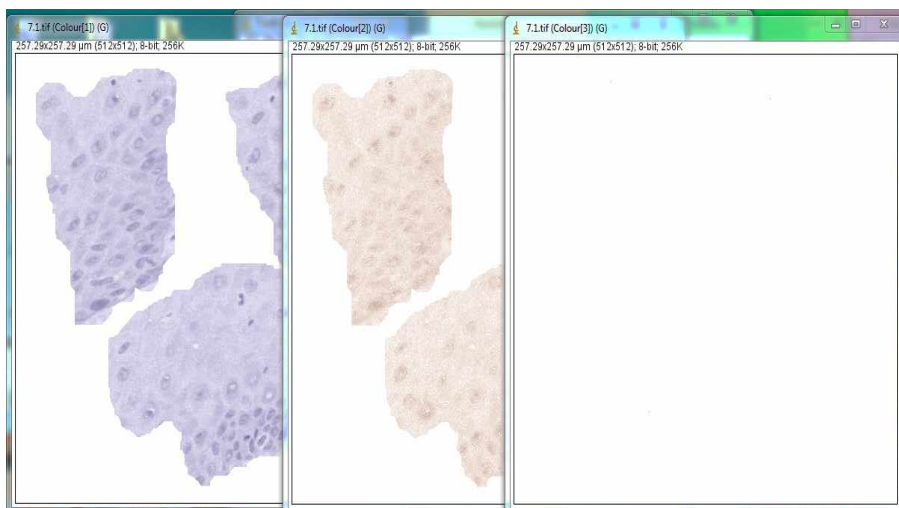
Para cada caso foi feita a seleção de três áreas do tecido epitelial incluindo cinco camadas de células no intervalo entre a camada basal e a espinhosa. Para isso foram desenvolvidos os seguintes procedimentos e ferramentas do *software* Image J:

1. Seleção das áreas pela ferramenta *Freehand Selection*. Essas áreas foram colocadas na ferramenta *New Image*, o que possibilitou realizar a análise de forma conjunta (Figura 4);
2. Realização da primeira contagem geral dos núcleos presentes nas áreas previamente selecionadas, por meio da ferramenta *Cell Counter* (Figura 5);
3. Realização da deconvolução da imagem original para obtenção de duas imagens: uma referente a matiz hetatoxilina, e outra do DAB (Figura 6);
4. Aplicação da ferramenta *Threshold* na imagem de matiz DAB para definição da marcação nuclear e, assim, fazer a seleção dos núcleos reativos (Figura 7);

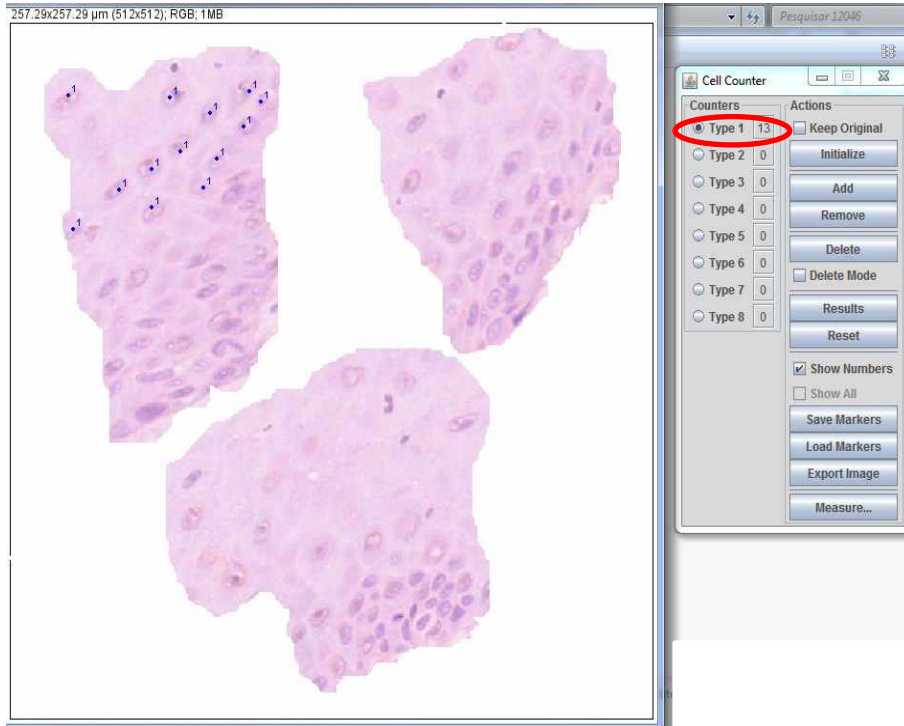
5. Pela ferramenta *Cell Counter* realizar a segunda contagem, desta vez somente dos núcleos imunorreativos (Figura 8);



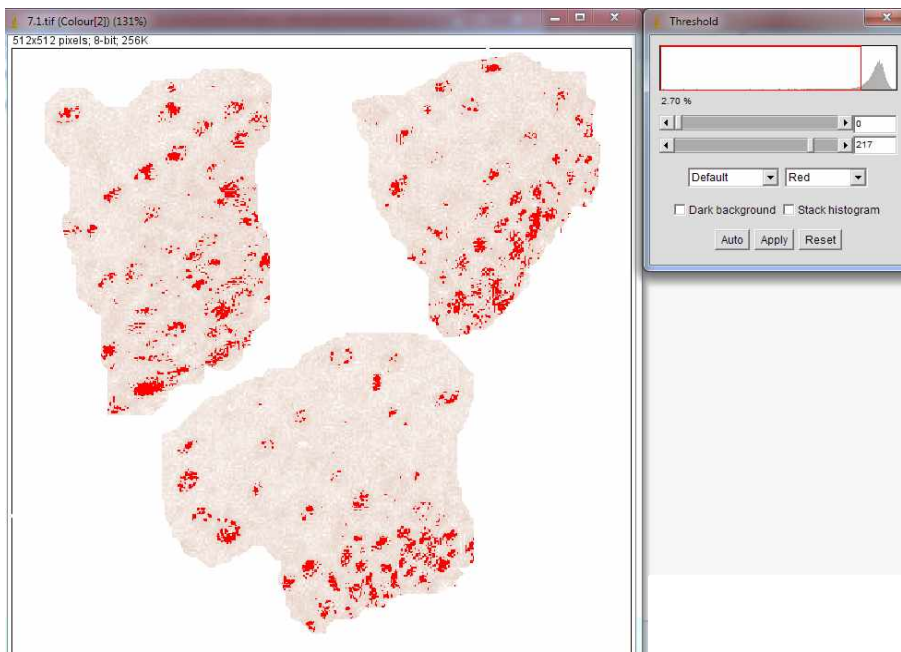
**Figura 4.** Seleção das áreas a serem analisadas através da ferramenta *FreeHand Selection* (quadrado preto).



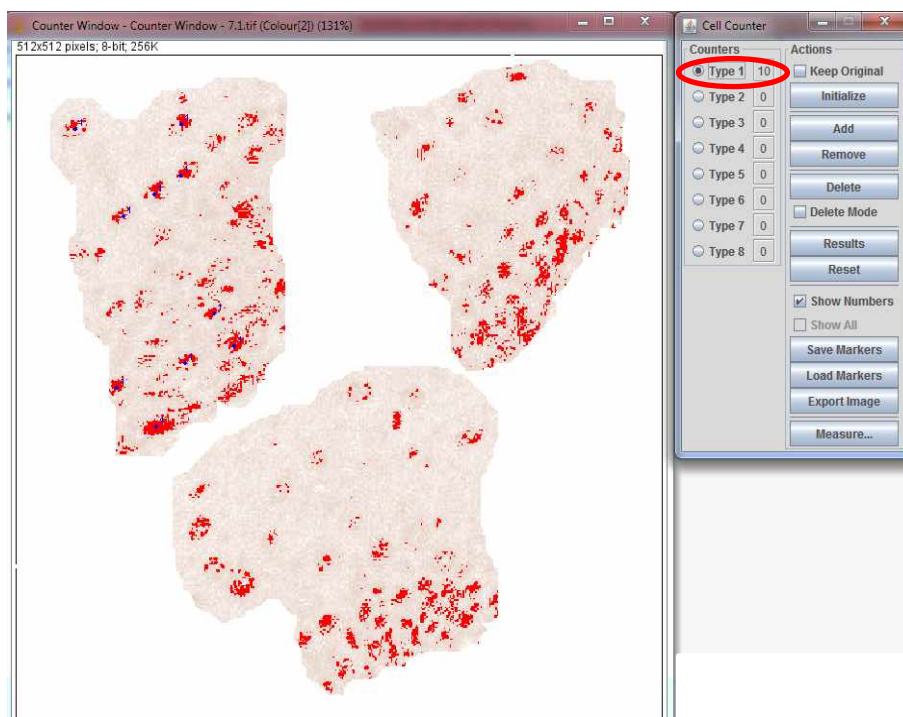
**Figura 5.** Imagens após realizada a deconvolução. Da esquerda para a direita observa-se primeiro a imagem com matiz de hematoxilina, segundo a imagem de matiz DAB e, por último a imagem em branco que representa a resultante após a deconvolução.



**Figura 6.** Primeira contagem geral dos núvles sobre a imagem original. Em vermelho localiza-se a quantidade de núcleos marcados com a ferramenta *Cell Counter*.



**Figura 7.** Aplicação da ferramenta *Threshold* para definição das marcações nucleares.



**Figura 8.** Contagem de núcleos imunorreativos sobre a matiz DAB com e máscara *Threshold*. Em vermelho localiza-se a quantidade de núcleos marcados com a ferramenta *Cell Counter*.

#### 4.7. ESTATÍSTICA

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

#### 4.8. ANÁLISE DOS DADOS

Para a realização das análises estatísticas, os dados foram categorizados em 8 variáveis:

1. Idade: não idoso (< 65 anos); idoso (> 65 anos);
2. Sexo: masculino; feminino;
3. Localização: LS – língua e soalho bucal; MJ – mucosa jugal; PD/PM/O – palato duro, palato mole e orofaringe; RAS – rebordo alveolar superior; RAI – rebordo alveolar inferior;
4. Tipo Clínico: LH, homogênea; LNH, não homogênea;
5. Tamanho: menor ou igual a 200mm<sup>2</sup> e maior que 200mm<sup>2</sup>;
6. Tabagismo: tabagista e não tabagista;
7. Displasia: LBR, baixo risco; LAR, alto risco;

## 8. Transformação maligna: sim e não.

Para a análise estatística foi utilizado o *software* GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, EUA). Inicialmente, os valores obtidos para os diferentes grupos foram testados quanto à distribuição gaussiana pelo teste Shapiro-Wilk. Para as avaliações comparativas dos valores de percentagem de núcleos imunorreativos obtidos entre os dois grupos representativos das variáveis definidas (idade; sexo, localização, tipo clínico; tamanho; tabagismo; displasia, transformação) e entre LB e casos controles foi utilizado teste *t* de Student para distribuição paramétrica e *U* de Mann-Whitney para não paramétrica. Para o estrato de localização foi utilizado Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Para a associação entre as diferentes categorias das variáveis demográficas e clinicopatológicas dos casos de LB foi utilizado *cut-off* previamente determinado como a média ou mediana da porcentagem de núcleos positivos para cada MPTH, a partir do qual serão definidos os casos de alta e baixa expressão, para essa associação foram utilizados os testes do Qui-quadrado e exato de Fisher. Os testes de correlação de Pearson e de Spearman foram empregados para verificar a correlação entre os valores de percentagem de núcleos imunorreativos para as modificações de histonas. Todos os testes foram realizados considerando intervalo de confiança de 95% (default do *software*), com  $\alpha = 0,05$ . Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E CLINICOPATOLÓGICOS

Os dados referentes às características demográficas e clinicopatológica dos pacientes acometidos por LB estão distribuídos na Tabela 2. A maioria dos casos de LB acometeu pacientes do sexo masculino (n=18, 56,25%), com média etária de 52,8  $\pm$ 10,8, sendo 71,88% (n=23) dos pacientes tabagistas. O sítio mais acometido foi mucosa jugal (n=11, 34,38%). Lesões com tamanho menor ou igual à 200mm<sup>2</sup> foram predominantes, correspondendo a 59,38% (n=19) dos casos. O tipo clínico predominante foi de leucoplasias homogêneas, que correspondeu a 71,88% (n=23) dos casos. Com relação a classificação histológica das lesões quanto ao risco segundo Kujan *et al.* (2006), a maioria dos casos (n=23, 71,88%) foram classificados como lesões de baixo risco. No que se refere à transformação maligna das lesões após diagnóstico e acompanhamento, somente 12,50% (n=4) sofreram malignização.

**Tabela 2. Dados demográficos e clinicopatológicos referentes aos casos de LB.**

Variáveis	n..casos	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	18	56,25
Feminino	14	43,75
<b>Idade</b>		
≤ 65 anos	28	87,50
> 65 anos	4	12,50
<b>Localização*</b>		
Língua/soalho	6	18,75
Mucosa jugal	11	34,38
Palato duro, palato mole ou orofaringe	10	31,25
Rebordo alveolar maxilar	3	9,37
Rebordo alveolar mandibular	2	6,25
<b>Dimensão</b>		
≤ 200mm <sup>2</sup>	19	59,38
> 200mm <sup>2</sup>	13	40,62
<b>Exposição ao fumo</b>		
Sim	23	71,88
Não	7	21,87
Não informado	2	6,25
<b>Displasia</b>		
Alto Risco	9	28,12
Baixo Risco	23	71,88
<b>Tipo clínico</b>		
Homogênea	23	71,88
Não homogênea	9	28,12
<b>Transformação maligna</b>		
Sim	4	12,50
Não	28	87,50

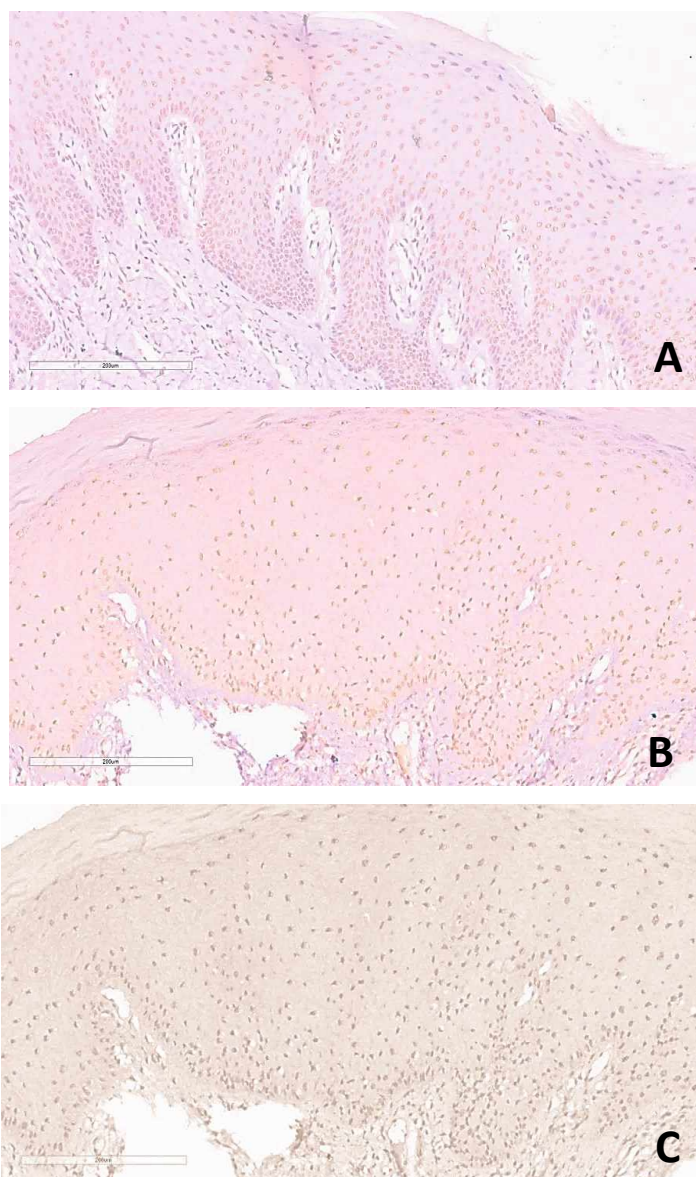
## 5.2. ANÁLISE E AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

### 5.2.1. MPTH H3K9ME3

A MPTH H3K9me3 foi identificada em todas as amostras de LB e no epitélio das amostras de mucosa normal, utilizadas como controle. A imunomarcção se deu nos núcleos das células, em intensidade visualmente fraca, não se visualizando nenhuma imunomarcção no citoplasma (Figura A). A imunomarcção identificada expressou-se com média de 76,2%, variando de 51,0% a 94,0%.

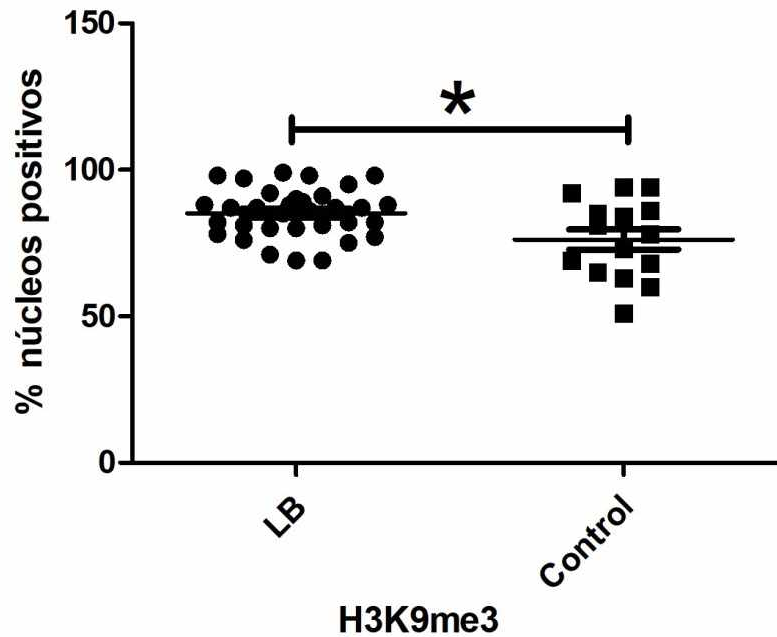
Para as LB, a imunorreatividade foi difusa, distribuída ao longo das camadas epiteliais, também restritas aos núcleos, mostrando-se visualmente em intensidade de fraca a moderada (Figura 9). A média do percentual de núcleos marcados foi de 85,2%,

variando de 69,0% a 99,0%. Estes valores foram maiores ( $p = 0,0061$ ) do que aqueles observados para o grupo controle (mucosa normal) (Figura 10).



**Figura 9:** Imunorreatividade antigênica para H3K9me3 no tecido epitelial das mucosas incluídas como grupos controle e leucoplasia bucal. (A) No grupo controle, observa-se imunomarcção fraca, dispersando-se ao longo do tecido epitelial. Em (B) e (C) tem-se a imunorreatividade antigênica para H3K9me3 em leucoplasias bucais. Em (B) observa-se a secção tecidual original da leucoplasia com marcações nucleares difusamente distribuídas em toda a espessura epitelial, com intensidade fraca a moderada; C) Aspecto histológico da imunomarcção após deconvolução da imagem, onde aparecem somente os núcleos nos quais houve a precipitação da diaminobenzidina. (aumento original de 200x, estreptavidina-biotina, contracoradas por hematoxilina de Harris). Fonte: Acervo pessoal.





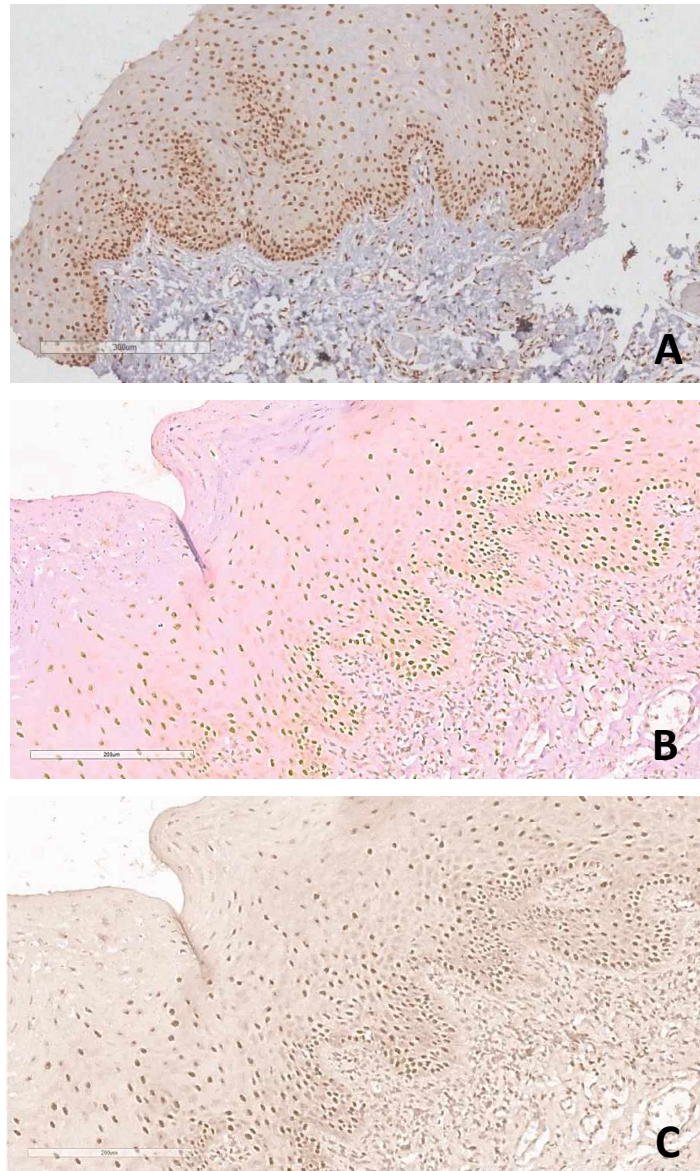
**Figura 10:** Análise comparativa dos valores percentuais de reatividade antigênica encontrados para H3K9me3 referentes aos casos de leucoplasia bucal e o epitélios normais do grupo controle (Teste *t* de *Student*,  $p = 0,0061$ ).

#### 5.2.2. MPTH H3K36ME3

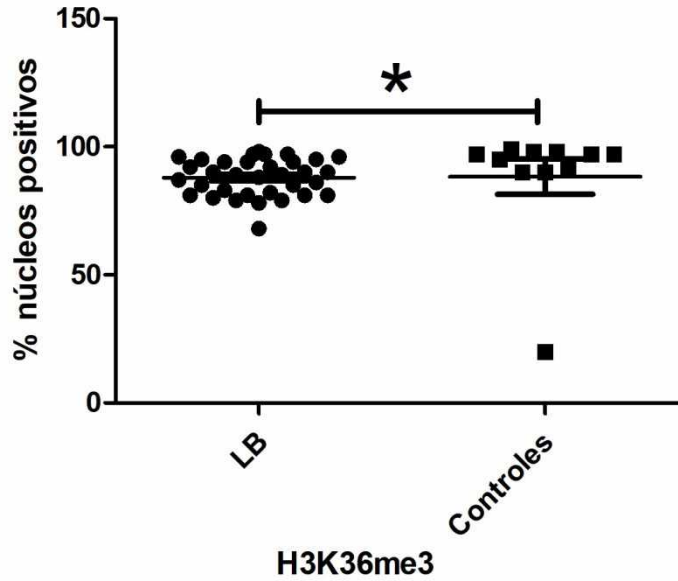
Para a MPTH H3K36me3, observou-se que o antígeno foi identificado em todas as amostras tanto de LB e de epitélio normal dos casos controle.

Nas amostras controle observou-se imunorreatividade nuclear variável em todas as camadas celulares epiteliais, que foram percebidas como de intensidade moderada a forte (Figura 11). A avaliação da imunorreatividade nuclear mostrou uma variação de 20% a 99% de núcleos marcados, com uma mediana de 97,0%.

Nas amostras de LB imunorreatividade apenas nuclear foi difusa, identificadas em todas as camadas epiteliais, percebidas visualmente como de intensidade moderada a forte. Mais intensa reatividade foi percebida nas camadas espinhosa e basal (Figura B). O percentual médio de núcleos positivos foi de 87,9%, com variações entre 68,0% e 98,0% das células avaliadas. Estes valores foram menores ( $p=0,0119$ ) do que aqueles encontrados para a amostra de mucosa normal do grupo controle (Figura 12). Sendo os percentuais de núcleos imunorreativos maiores para os casos controle do que para os casos de leucoplasia bucal.



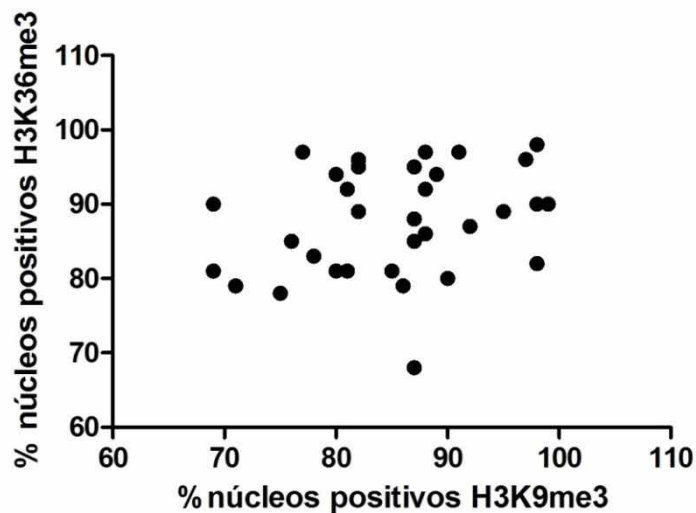
**Figura 11:** Imunorreatividade antigênica para H3K36me3 no epitélio das mucosas normais do controle e leucoplasias bucais. (A) No grupo controle, pode-se observar distribuição topográfica ampla de núcleos reativos para H3K36me3, presentes ao longo de toda a espessura do tecido epitelial. Visualmente observam-se núcleos com imunomarcção variando de moderada e forte. Em (B) e (C) observam-se as imunorreatividades antigênica para H3K36me3 em leucoplasias bucais. Em (B) o corte histológico de leucoplasia bucal mostrando a colocação original (hematoxilina de Harris/diaminobenzidina) com marcações nucleares difusas em todo o epitélio, com forte intensidade percebida para nas camadas espinhosa e basal; em (C) o corte histológico após a deconvolução da imagem, no qual se observam somente os núcleos marcados com diaminobenzidina (Aumento original de 200x, estreptavidina-biotina, contracoradas por hematoxilina de Harris). Fonte: Acervo pessoal.



**Figura 12:** Análise comparativa dos valores percentuais de reatividade antigênica encontrados para H3K36me3 referentes aos casos de leucoplasia bucal e o epitélios normais do grupo controle. (Teste *U* de *Mann-Whitney*,  $p=0,0119$ ).

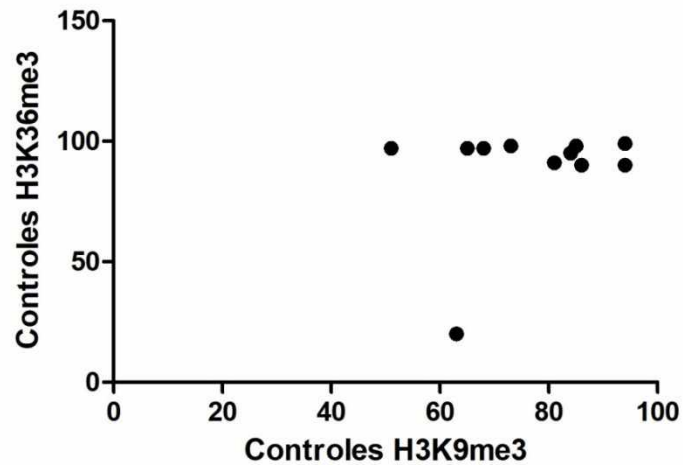
### 5.3. RELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO ENTRE H3K9ME3 E H3K36ME3

Não foi observada correlação significativa ( $p=0,1458$ ) entre os valores dos percentuais de núcleos marcados entre as duas MPTH estudadas para os casos de LB (Figura 13).



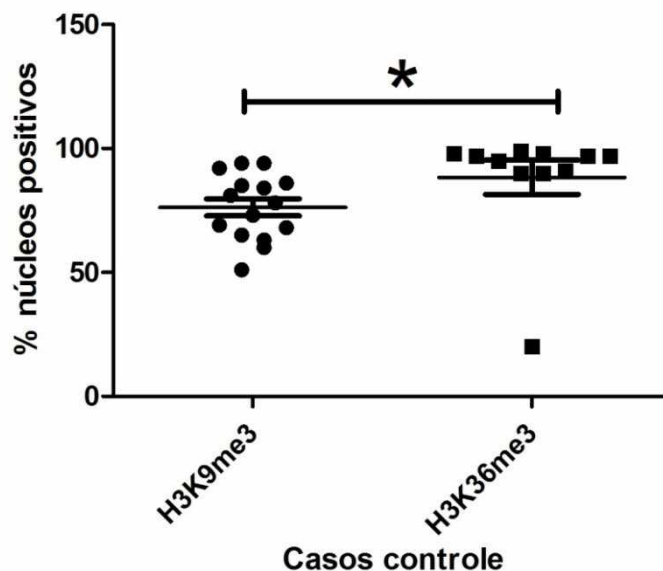
**Figura 13:** Análise da correlação entre os valores percentuais de reatividade antigênica dos casos de LB para H3K9me3 e H3K36me3. (Teste de correlação de Pearson,  $p = 0,1458$ ,  $r = 0,2589$ ).

Para os casos controles também não foi observada relação significativa ( $p=0,8132$ ) entre os valores dos percentuais de núcleos imunorreativos entre as MPTH (Figura 14).



**Figura 14:** Análise da correlação entre os valores percentuais de núcleos imunorreativos dos casos controles para H3K9me3 e H3K36me3. (Teste de correlação de Spearman,  $p = 0,8132$ ,  $r = 0,08084$ ).

Foi observada diferença estatística significativa entre os grupos controles das modificações de histona estudadas ( $p=0,0026$ ) (Figura 15).



**Figura 15:** Comparação dos valores percentuais de reatividade antigênica dos casos controles para H3K9me3 e H3K36me3. (Teste *U* de *Mann-Whitney*,  $p=0,0026$ ).

#### 5.4. RELAÇÃO ENTRE MPTH E DADOS DEMOGRÁFICOS E CLINICOPATOLÓGICOS

Os valores médios ou medianos dos percentuais de imunorreatividade nuclear para a MPTH H3K9me3 e H3K36me3 estão descritos na Tabela 3, segundo a estratificação definida para as categorias demográficas e clinicopatológicas estudadas.

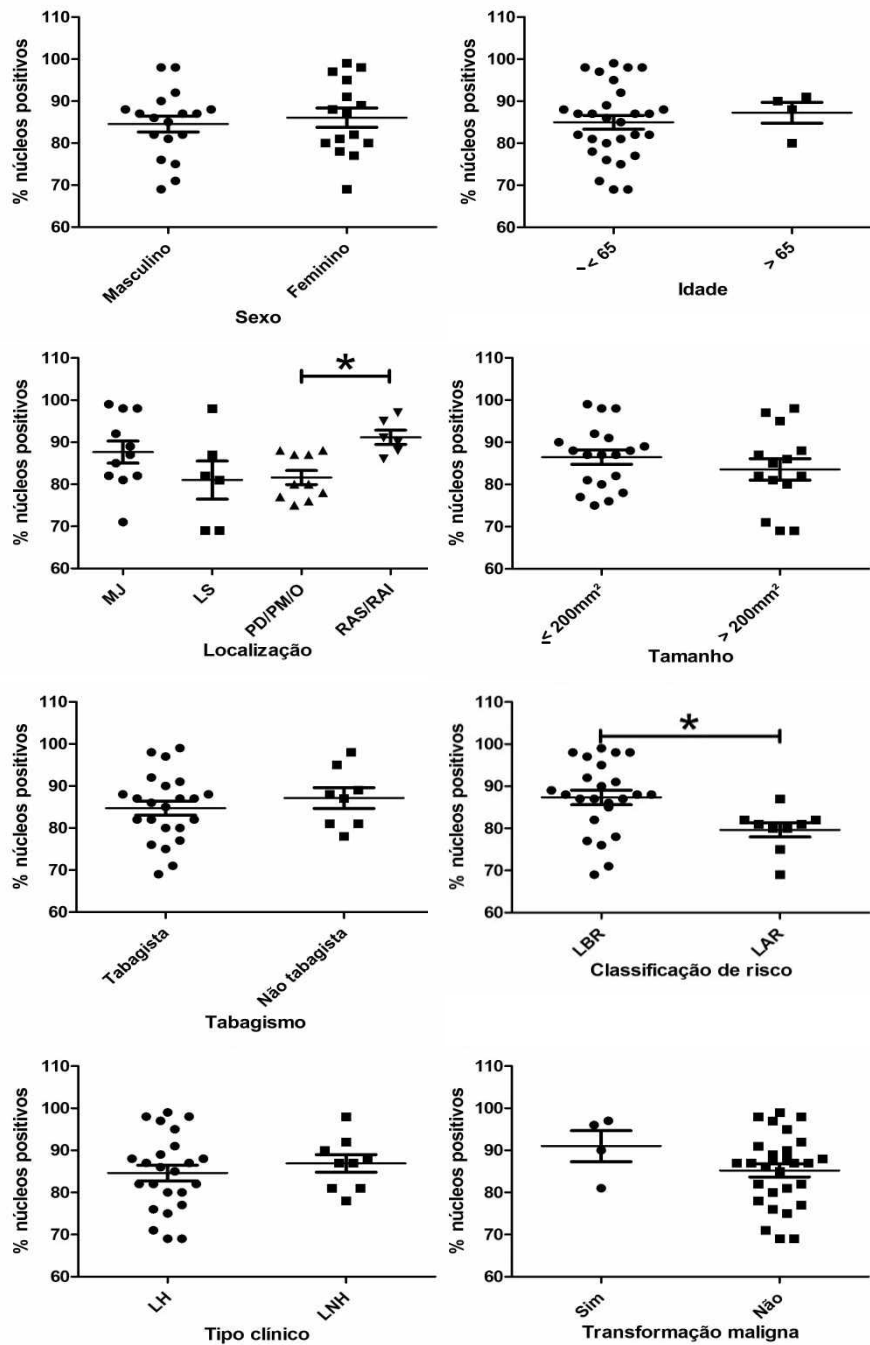
Percebem-se, pelos resultados, que valores percentuais maiores para H3K9me3 foram identificados para as variáveis sexo feminino, pacientes com 65 anos ou menos, lesões em rebordo alveolar (maxilar e mandibular), leucoplasias menores ou iguais a 200mm<sup>2</sup>, pacientes não tabagistas, leucoplasias não homogêneas, que sofreram transformação maligna, e leucoplasias de baixo risco. Apenas para as variáveis displasia, e localização obtiveram-se resultados estatisticamente diferentes.

Para H3K36me3 os maiores valores percentuais foram observados nas variáveis sexo feminino, pacientes acima de 65 anos, localização em mucosa jugal, leucoplasias maiores que 200mm<sup>2</sup>, pacientes não tabagistas, leucoplasias homogêneas, que sofreram transformação maligna e leucoplasias de baixo risco. E somente para as variáveis referentes ao sexo foi observada diferença estatística. Nas Figuras 16 e 17 podem ser observadas as análises das MPTH para cada variável estudada.

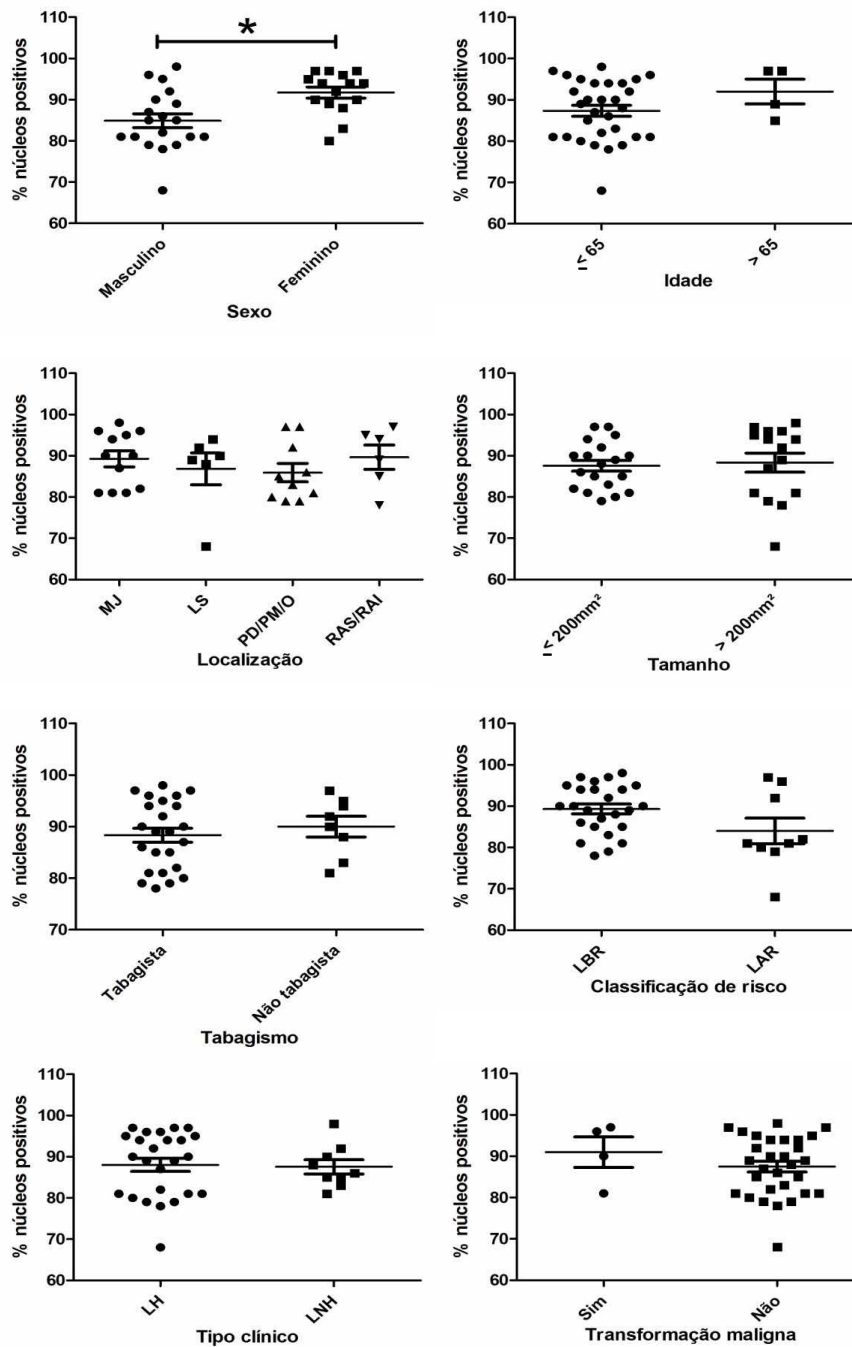
**Tabela 3. Valores médios e medianos dos percentuais de imunorreatividade nuclear para ambas MPTH estudadas.**

Variáveis		H3K9me3	$p^1$	H3K36me3	$p^1$
<b>Sexo<sup>o</sup></b>					
	Masculino	84,56	0,6121	84,89	0,0044
	Feminino	86,07		91,73	
<b>Idade*</b>					
	≤ 65 anos	86,00	0,4724	88,50	0,2081
	> 65 anos	89,00		93,00	
<b>Exposição ao fumo<sup>o</sup></b>					
	Sim	84,74	0,4623	88,33	0,5311
	Não	87,13		90,00	
<b>Dimensão<sup>o</sup></b>					
	≤ 200m <sup>2</sup>	86,47	0,3310	87,58	0,7680
	> 200m <sup>2</sup>	83,57		88,33	
<b>Localização<sup>+</sup></b>					
	Língua/soalho	81,50	0,0391	89,50	0,6392
	Mucosa jugal	87,00		90,00	
	Palato duro, palato mole ou orofaringe	80,00		84,00	
	Rebordo alveolar maxilar e mandibular	90,50		91,50	
<b>Displasia<sup>2</sup></b>					
	Alto Risco	81,00	0,0161	84,00	0,0573
	Baixo Risco	88,00		89,32	
<b>Tipo clínico<sup>3</sup></b>					
	Homogênea	84,63	0,4961	90,00	0,7824
	Não homogênea	86,89		86,00	
<b>Transformação maligna*</b>					
	Sim	93,00	0,2242	93,00	0,3217
	Não	87,00		88,50	

1 – valor de  $p$  para os testes estatísticos empregados: teste  $t$  de *Student* (<sup>o</sup>), teste  $U$  de *Mann-Whitney* (<sup>\*</sup>) e teste de *Kruskal-Wallis* (<sup>+</sup>) com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,050$ ). 2 – Para H3K9me3 foi utilizado teste  $U$  de *Mann-Whitney* e para H3K36me3 teste  $t$  de *Student*. 3 – Para H3K9me3 foi utilizado teste  $t$  de *Student* e para H3K36me3 teste  $U$  de *Mann-Whitney*.



**Figura 16:** Análise da porcentagem de núcleos reativos para H3K9me3 nos casos de leucoplasia bucal para as variáveis demográficas e clinicopatológicas consideradas, com intervalo de confiança de 95%. (A) Sexo (*teste t de Student*,  $p=0,6121$ ); (B) Idade (*teste U de Mann-Whitney*,  $p=0,4724$ ); (C) Localização: mucosa jugal (MJ), língua/soalho (LS), palato duro/palato mole/orofaringe (PD/PM/O) e rebordo alveolar superior/rebordo alveolar inferior (RAS/RAI) (*teste Kruskal-Wallis*,  $p=0,0391$ ), PD/PM/O x RAS/RAI (*teste U de Mann-Whitney*,  $p=0,0076$ ); (D) Tamanho (*teste t de Student*,  $p=0,3310$ ); (E) Tabagismo (*teste t de Student*,  $p=0,4623$ ); (F) Classificação de risco: leucoplasia de alto risco (LAH) e leucoplasia de baixo risco (LBR) (*teste t de Student*,  $p=0,0161$ ); (G) Tipo clínico: leucoplasia homogênea (LH) e leucoplasia não homogênea (LNH) (*teste t de Student*,  $p=0,4961$ ); (H) Transformação maligna (*teste U de Mann-Whitney*,  $p=0,2242$ ).



**Figura 17:** Análise da porcentagem de núcleos reativos para H3K36me3 nos casos de leucoplasia bucal para as variáveis demográficas e clinicopatológicas consideradas, com intervalo de confiança de 95%. (A) Sexo (teste *t* de *Student*,  $p=0,0044$ ); (B) Idade (teste *U* de *Mann-Whitney*,  $p=0,2081$ ); (C) Localização: mucosa jugal (MJ), língua/soalho (LS), palato duro/palato mole/orofaringe (PD/PM/O) e rebordo alveolar superior/rebordo alveolar inferior (RAS/RAI) (teste Kruskal-Wallis,  $p=0,6392$ ); (D) Tamanho (teste *t* de *Student*,  $p=0,7680$ ); (E) Tabagismo (teste *t* de *Student*,  $p=0,5311$ ); (F) Classificação de risco: leucoplasia de alto risco (LAR) e leucoplasia de baixo risco (LBR) (teste *t* de *Student*,  $p=0,0573$ ); (G) Tipo clínico: leucoplasia homogênea (LH) e leucoplasia não homogênea (LNH) (teste *U* de *Mann-Whitney*,  $p=0,7842$ ); (H) Transformação maligna (teste *U* de *Mann-Whitney*,  $p=0,3217$ ).



Os resultados dos testes de associação entre as variáveis estudadas e os valores dos percentuais de núcleos imunorreativos, obtidos a partir de *cut-offs* previamente determinados como a média da porcentagem de núcleos positivos para cada MPTH, podem ser vistos nas Tabelas 4 e 5. Observa-se que houve associação estatisticamente significativa da MPTH H3K9me3 com a classificação de risco (p=0,0038), e da MPTH H3K36me3 com a variável sexo (p=0,0307).

**Tabela 4. Associação entre diferentes categorias das variáveis demográficas e clinicopatológicas dos casos de leucoplasias bucais e a MPTH H3K9me3 (n=31), segundo os percentuais de reatividade antigênica nuclear obtidos.**

Variáveis	n.casos <sup>1</sup>	H3K9me3		P <sup>3</sup>
		ALTA <sup>2</sup>	BAIXA <sup>2</sup>	
<b>Sexo</b>				
Masculino	17	10	7	0,7247
Feminino	14	7	7	
<b>Idade</b>				
≤ 65 anos	27	14	13	0,6067
> 65 anos	4	3	1	
<b>Localização*</b>				
Língua/soalho	6	2	4	0,1007
Mucosa jugal	10	6	4	
Palato duro, palato mole ou orofaringe	10	4	6	
Rebordo alveolar maxilar	3	3	0	
Rebordo alveolar mandibular	2	2	0	
<b>Dimensão</b>				
≤ 200mm <sup>2</sup>	19	12	7	0,2883
> 200mm <sup>2</sup>	12	5	7	
<b>Exposição ao fumo</b>				
Sim	22	12	10	1,0000
Não	7	4	3	
Não informado	2			
<b>Displasia</b>				
Alto Risco	9	1	8	0,0038
Baixo Risco	22	16	6	
<b>Tipo clínico</b>				
Homogênea	22	11	11	0,4564
Não homogênea	9	6	3	
<b>Transformação maligna</b>				
Sim	4	1	3	0,3041
Não	27	16	11	

1 – número de casos; 2 – altos e baixos níveis percentuais de núcleos imunorreativos segundo o *cut-off* definido para H3K9me3 (85,2%) Alta expressão: > 85,2%; Baixa expressão: ≤ 85,2%; 3 – valor de *p* para os testes estatísticos empregados: teste do *Qui-quadrado* (\*) e teste exato de *Fisher*, com intervalo de confiança de 95%.

**Tabela 5. Associação entre diferentes categorias das variáveis demográficas e clinicopatológicas dos casos de leucoplasias bucais e a MPTH H3K36me3 (n=32), segundo os percentuais de reatividade antigênica nuclear obtidos.**

Variáveis	n..casos <sup>1</sup>	H3K36me3		P <sup>3</sup>	
		ALTA <sup>2</sup>	BAIXA <sup>2</sup>		
<b>Sexo</b>					
Masculino	18	6	12	0,0045	
Feminino	14	12	2		
<b>Idade</b>					
≤ 65 anos	28	15	13	0,6128	
> 65 anos	4	3	1		
<b>Localização*</b>					
Língua/soalho	6	5	1	0,1823	
Mucosa jugal	11	7	4		
Palato duro, palato mole ou orofaringe	10	3	7		
Rebordo alveolar maxilar	3	2	1		
Rebordo alveolar mandibular	2	1	1		
<b>Dimensão</b>					
≤ 200mm <sup>2</sup>	19	10	9		0,7249
> 200mm <sup>2</sup>	13	8	5		
<b>Exposição ao fumo</b>					
Sim	23	13	10	0,6693	
Não	7	5	2		
Não informado	2				
<b>Displasia</b>					
Alto Risco	9	3	6	0,1317	
Baixo Risco	23	15	8		
<b>Tipo clínico</b>					
Homogênea	23	14	9	0,4533	
Não homogênea	9	4	5		
<b>Transformação maligna</b>					
Sim	4	3	1	0,6128	
Não	28	15	13		

1 – número de casos; 2 – altos e baixos níveis percentuais de núcleos imunorreativos conforme *cut-off* estabelecido para H3K36me3 (87,9%) Alta expressão: > 87,9%; Baixa expressão: ≤ 87,9%; 3 – valor de *p* para os testes estatísticos empregados: teste do *Qui-quadrado* (\*) e teste exato de *Fisher*, com intervalo de confiança de 95%.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a distribuição da imunorreatividade nuclear de duas modificações pós-traducionais de histonas, H3K9me3 e H3K36me3, nas LB, frente a variáveis demográficas, clinicopatológicas e progressão da lesão para a transformação maligna.

A amostra incluída neste estudo mostrou LB diagnosticadas em sua maioria no sexo masculino, entre quinta e sexta década de vida, com a média etária geral de 54,3 anos, sendo a maioria dos pacientes tabagistas. Ainda, a maioria das lesões foi de LH, com 12,5% dos casos evoluindo para transformação maligna. Esses dados, em linhas gerais, são concordantes com diferentes séries estudadas em várias regiões do mundo (ARNAOUTAKIS; BISHOP; WESTRA; CALIFANO, 2013; BOUQUOT; GORLIN, 1986; BROUNS; BAART; BLOEMENA; KARAGOZOGLU *et al.*, 2013; HOLMSTRUP; VEDTOFTE; REIBEL; STOLTZE, 2006; LIU; WANG; ZHOU; SHI *et al.*, 2010; VILLA; WOO, 2017). Chamou a atenção, todavia, a predominância de casos em mucosa jugal, repetindo padrão já descrito anteriormente para os casos diagnosticados no Serviço de Estomatologia da FOUFU e eventualmente em outras regiões do mundo (BARBOSA DE PAULO, 2016; (CHHER; HAK; KALLARAKKAL; DURWARD *et al.*, 2018; KRISHNA PRIYA; SRINIVAS; DEVAKI, 2018). Chama a atenção o fato de que esta localização não é usualmente descrita no ocidente (BROUNS; BAART; BLOEMENA; KARAGOZOGLU *et al.*, 2013; LIU; WANG; ZHOU; SHI *et al.*, 2010), sendo mais usualmente descrita no sudeste asiático, especialmente Índia. Nesse país, o nó de Betel, colocado no fundo de saco vestibular, constitui-se no principal fator causal das LB naquela população (SILVERMAN; GORSKY; LOZADA, 1984; WALDRON; SHAFER, 1975). As análises dos dados demográficos levantados dos prontuários dos pacientes de nossa amostra não permitiram oferecer uma explicação objetiva para este achado, permanecendo um possível ponto de investigação.

Em um estudo realizado na Holanda com 236 pacientes, as lesões maiores a 200mm<sup>2</sup> mostraram risco cinco vezes maior para malignização, comparadas as menores o mesmo padrão de que leucoplasias que excedam 200mm<sup>2</sup> possuem um risco maior de transformação maligna, pode ser observado em outros estudos (HOLMSTRUP; VEDTOFTE; REIBEL; STOLTZE, 2006; NAPIER; COWAN; GREGG; STEVENSON *et al.*, 2003; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016). Nossos resultados refletiram esta tendência: lesões maiores que 200mm<sup>2</sup> representaram 40,62% da amostra, e destas 20,08% sofreram transformação maligna, enquanto que para as LB menores ou iguais a 200mm<sup>2</sup>, equivalentes a 59,38%, somente 5,26% malignizaram, confirmando estudos prévios.

No presente estudo, 23 LB foram classificadas como LBR, e apenas um caso apresentou transformação maligna (4,35%); dos nove casos definidos como LAR, três

sofreram malignização (33,3%). Outros autores também observaram uma maior taxa de malignização em lesões classificadas como de alto risco, utilizando o mesmo sistema binário de classificação (BROUNS; BAART; BLOEMENA; KARAGOZOGLU *et al.*, 2013). Assim, nossos achados reforçam aqueles obtidos por Kujan *et al.* (2006), mostrando que as lesões LAR são mais propensas ao processo de transformação maligna. E mais, enfatizam a percepção de que o sistema binário proposto por Kujan *et al.* (2006) tende a ser mais preciso nesta previsão da evolução das LB para câncer.

A metilação de resíduos específicos de lisinas (K) nas caudas terminais de histonas tem sido associada a repressão ou ativação da transcrição gênica (GASCHE; GOEL, 2012; VOLKEL; ANGRAND, 2007), podendo ocorrer nas caudas da histona H3 (K4, K9, K27, K36 e K79) ou H4 (K20)(GASCHE; GOEL, 2012). Esse padrão de metilação de histonas parece estar implicado na carcinogênese. Por exemplo, genes supressores de tumor (GST) silenciados a partir de histonas modificadas por metilação, podem comprometer o controle da proliferação celular, com reflexos no processo carcinogênico (DIEZ-PEREZ; CAMPO-TRAPERO; CANO-SANCHEZ; LOPEZ-DURAN *et al.*, 2011).

A trimetilação de H3K9, por exemplo, tem sido associada a repressão/silenciamento da transcrição gênica (VOLKEL; ANGRAND, 2007; YAMAMOTO; SHIMA; MATSUO; NISHIOKA *et al.*, 2010), com potencial envolvimento no silenciamento (inativação) de GST. Efeito oposto, mas também considerado marcante para a carcinogênese, é a redução dos níveis de H3K9me3. Neste caso, o efeito se dá pelo aumento na transcrição de oncogenes, outro grupo de genes associado a tumorigênese (LI; LEI; ZHAO; LI *et al.*, 2017).

Li *et al.* (2017) observaram a presença da MPTH H3K9me3 em 49,3% de 67 genes estudados, sugerindo um importante papel desta MPTH na regulação da expressão de oncogenes e, conseqüentemente, no desenvolvimento do câncer de mama. Além disto, foi observada uma diminuição do nível de H3K9me3 em modelos transformação maligna *in vitro* para a qual algumas explicações são consideradas: a redução de H3K9me3 nos oncogenes eleva seu nível de expressão ou pode causar instabilidade da cromatina, ativando o nível de transcrição de transposons ou sensibilizando a célula para danos no DNA. Ainda neste trabalho, em contrapartida, sugerem que os genes com maior metilação e transcrição reprimida podem funcionar como supressores de tumores.

Os casos de LB em nosso estudo apresentaram maior percentual de núcleos marcados para H3K9me3 comparativamente ao epitélio da mucosa normal. Resultado semelhante pode ser observado em outros estudos que avaliaram a expressão desta mesma MPTH, mas em outras lesões. Um estudo realizado para avaliar a trimetilação de H3K9 em pacientes com câncer de cólon também mostrou diferença estatisticamente significativa para os valores percentuais mais elevados de núcleos reativos entre tecido tumoral comparativamente ao tecido normal (BENARD; GOOSSENS-BEUMER; VAN HOESEL; DE GRAAF *et al.*, 2014). Outro estudo realizado em câncer de bexiga mostrou que a expressão da MPTH H3K9me3 é maior em células cancerígenas em comparação com tecido normal do urotélio (ELLINGER; BACHMANN; GOKE; BEHBAHANI *et al.*, 2014).

Estes achados podem sugerir que esta MPTH estaria inserida no processo de carcinogênese, tendo em vista de que a carcinogênese bucal pode envolver o desenvolvimento de LB previamente a presença do fenótipo neoplásico. E, também, abre a perspectiva de seu potencial envolvimento na sua progressão.

Alguns GST e genes de reparo do DNA mostram ter um papel importante no processo de carcinogênese e progressão dos cânceres bucais (metástases), tais como p53, p16, MGMT, RAR $\beta$ 2, E-caderina e DAP-quinases (DIEZ-PEREZ; CAMPO-TRAPERO; CANO-SANCHEZ; LOPEZ-DURAN *et al.*, 2011). Investigações sobre silenciamento gênico associado a MPTH por metilação de resíduos de lisina poderiam fornecer informações relevantes sobre a regulação de sua expressão com vistas a compreender sua influência no processo carcinogênico.

Associando nossos achados com os observados na literatura, direta e indiretamente relacionados a MPTH H3K9me3, podemos sugerir que a maior frequência dessa modificação esteja associada com a redução da expressão gênica, afetando a atividade dos GST, favorecendo o processo de carcinogênese em lesões potencialmente malignas.

No câncer de estômago, níveis globais de H3K9me3 foram associados positivamente ao estágio do tumor, a invasão linfovascular e recorrência do câncer; nível elevado de H3K9me3 foi correlacionado com baixa taxa de sobrevivência (PARK; JIN; KIM; YOON *et al.*, 2008). Assim, a identificação de H3K9me3 poderia ser percebida como potencial biomarcador prognóstico de LB, onde a alta expressão dessa proteína indicaria pior prognóstico, traduzido pela possibilidade de participar de sua progressão à câncer.

No entanto, para algumas neoplasias, os baixos níveis de H3K9me3 em casos de câncer de pulmão (SONG; KIM; KIM; PARK *et al.*, 2012), próstata (ELLINGER; KAHL; VON DER GATHEN; ROGENHOFER *et al.*, 2010), mama (LESZINSKI; GEZER; SIEGELE; STOETZER *et al.*, 2012) e leucemia (MULLER-TIDOW; KLEIN; HASCHER; ISKEN *et al.*, 2010) foram associados com a progressão de tumores. Essa aparente ausência de linearidade na associação dos níveis de MPTH H3K9me3 e a carcinogênese põe em questão a possibilidade de outros fatores influenciarem esta relação, mascarando o seu real significado. Desta forma, futuros estudos deveriam considerar nesta análise a influência da histogênese tumoral, especificidades de carcinógenos na tumorigênese das neoplasias, efeitos de alteração no ambiente tumoral, com por exemplo aquele exercido pela inflamação, a influência contemporânea de outras MPTH, e fatores demográficos como sexo, no real significado desta MPTH na tumorigênese humana.

O presente trabalho mostra que o significado da imunorreatividade de H3K9me3 no processo de carcinogênese bucal a partir da imunorreatividade das LB não parece de fácil compreensão. Nossos resultados mostraram uma associação significativa entre LBR com maior percentual de núcleos positivos para H3K9me3. Maior imunorreatividade em LB comparada aquela em epitélio normal, conjugada aos achados de maior expressão em neoplasias mais agressivas, remete-nos a expectativa de que os achados nas LB de alto risco devessem ser maiores que as encontradas em baixo risco. Todavia, a ausência desta relação, pode nos indicar que esta MPTH seja importante nas fases iniciais do processo, não estando implicadas, por si só, na transformação maligna.

Vale ressaltar que a ausência de trabalhos na literatura que estudassem a relação da referida MPTH com o sistema binário de classificação Kujan *et al.* (2006) acrescenta mais limitações a exploração do significado dos nossos achados.

No presente estudo, houve maior expressão dessa MPTH nas lesões localizadas nos rebordos alveolares superior e inferior. Uma possibilidade de interpretação para este achado seria de nesta localização ter ocorrido apenas LBR, segundo critérios de Kujan *et al.* (2006). Este dado seria compatível com o fato de que, nesta localização, o processo de transformação maligna é menos frequente, falando a favor aí de lesões menos agressivas (SILVERMAN, 2001).

A trimetilação de H3K36, mediada pela enzima trimetiltransferase (SETD2) (NEWBOLD; MOKBEL, 2010), tem seu papel associado com a ativação da

transcrição gênica (LACHNER; JENUWEIN, 2002; TABY; ISSA, 2010; VOLKEL; ANGRAND, 2007; WAGNER; CARPENTER, 2012), bem como com o reparo do DNA (ZHANG; LI; ZHU; WANG *et al.*, 2015). Essas funções estão ligadas a proteína de reconhecimento de alterações de pareamento de bases (*mismatch*) (hMutSa), vinculada ao reparo de DNA, com domínios específicos, que interagem com os resíduos de lisina metilados (LI; MAO; TONG; HUANG *et al.*, 2013). Sua disfunção levaria à desregulação na expressão de alguns genes com potencial efeito sobre a carcinogênese (ZHAO; CABALLERO; LEVY; STEVENSON *et al.*, 2009). Este fato pode ser confirmado em alguns tipos de cânceres, nos quais foi identificada a disfunção da proteína de reconhecimento de *mismatch*, em que a expressão de H3K36me3 estava reduzida (HO; PARK; ZHAO; TONG *et al.*, 2016).

A metilação do H3K36 está envolvida no recrutamento de enzimas como o complexo histona desacetilase de RPD3S, por exemplo, que atuam para manter um estado desacetilado da cromatina em regiões transcritas pela RNA polimerase II, reforçando, assim, que a supressão da MPTH H3K36 está associada a transcrição inadequada dessas regiões (CARROZZA; LI; FLORENS; SUGANUMA *et al.*, 2005; LI; GOGOL; CAREY; LEE *et al.*, 2007).

Diversos estudos propõem que a desregulação ou perda das funções de H3K36me3 desempenha um papel importante na origem e progressão de diversos tumores (BEHJATI; TARPEY; PRESNEAU; SCHEIPL *et al.*, 2013; HO; PARK; ZHAO; TONG *et al.*, 2016; KUDITHIPUDI; JELTSCH, 2014), como gliomas e condroblastomas (BEHJATI; TARPEY; PRESNEAU; SCHEIPL *et al.*, 2013), carcinomas de células claras renais, cânceres de mama e leucemia (KUDITHIPUDI; JELTSCH, 2014; MARANGO; SHIMOYAMA; NISHIO; MEYER *et al.*, 2008; NEWBOLD; MOKBEL, 2010).

Newbold & Mokbel (2010), demonstraram que os níveis de expressão de SETD2, proteína responsável por mediar o processo de metilação de H3K36, são significativamente mais baixos em células tumorais de câncer de mama, em comparação com o tecido mamário normal do mesmo paciente. A ausência funcional de SETD2 em gliomas foi associada a uma diminuição de expressão de H3K36me3 em gliomas (FONTEBASSO; SCHWARTZENTRUBER; KHUONG-QUANG; LIU *et al.*, 2013). Além disto, ensaios *in vitro* associados a competição de metilação de H3K36me3 com proteína mutada H3.3K36M – (mutação da histona K (lisina) para M (metionina)) – ficou demonstrada uma redução dos níveis de trimetilação de H3K36 em

condroblastomas (FANG; GAN; WANG; ZHOU *et al.*, 2017). Esta demonstração aponta para o fato de que mecanismos inibitórios de metilação naquela MPTH poderiam ocorrer, gerando disfunção da mesma, favorecendo a transformação celular na tumorigênese.

Algumas proteínas envolvidas no processo de reparo do DNA mostraram alterações na imunexpressão em CCE em lábio inferior, especificamente hMLH1 (homólogo humano de mutL1), sendo que os casos de baixo grau apresentaram maior expressão destas proteínas (DE OLIVEIRA; DE SOUSA LOPES; DE SANTANA SARMENTO; QUEIROZ *et al.*, 2014). E em um estudo realizado por Zhao *et al.* (2016) em câncer gástrico, foi demonstrado que a baixa expressão de H3K36me3 está correlacionada com a existência de transcritos defeituosos em regiões específicas de hMLH1, afetando sua função e contribuindo com a patogenia desta doença, reforçando o papel desta MPTH no reparo do DNA e sua relação com a carcinogênese.

No presente estudo, a imunorreatividade nuclear para H3K36me3 nos casos de LB foi menor que aqueles observados no epitélio da mucosa normal. Esta menor expressão pode indicar desregulação na função desta MPTH na patogenia das LB. Resultado semelhante foi observado por De Freitas filho *et al.* (2018) que mostraram menor imunorreatividade nuclear para H3K36me3 em queilite actínica e carcinoma de células escamosas bucal comparada a do tecido normal.

Tendo em vista os efeitos de H3K36me3 na transcrição gênica, a diminuição destas MPTH parece ter impacto negativo na expressão de GST, reforçada pelo fato de que o reparo de DNA por esta via também estaria comprometido. Estes achados possibilitam sugerir que alterações funcionais de GST nas LB estariam em parte vinculadas a redução desta MPTH. Estudos exploratórios procurando associar a expressão de GST e MPTH auxiliariam na análise desta hipótese.

Nosso estudo também mostrou menor imunorreatividade de H3K36me3 entre os homens, sendo importante averiguar quais os aspectos da patogenia da LB identificada com esta população poderiam justificar estes achados. É conhecido que grande parcela dos portadores de LB está vinculada a exposição aos produtos do fumo e álcool. Esta associação tem sido mais frequentemente observada no sexo masculino (MASEREJIAN; JOSHIPURA; ROSNER; GIOVANNUCCI *et al.*, 2006), o que poderia sugerir uma justificativa para este achado. Não encontramos na literatura estudos sobre LB que discutissem estes dados. Todavia, Sant'ana (2014), não observou nenhuma associação entre imunorreatividade de H3K36me3 e variáveis demográficas e



clinicopatológicas em uma amostra de carcinoma de células escamosas bucal. Por outro lado, Tamagawa *et al.* (2013) observou uma relação oposta para pacientes com câncer colorretal, sugerindo que esta relação pode ser mais complexa, merecendo ser mais bem investigada.

Quando comparados os casos de mucosa normal para as duas MPTH estudadas, foi observada maior percentual de núcleos imunorreativos para H3K36me3 do que para H3K9me3. Estes achados seriam esperados, levando em consideração os resultados de estudos que avaliaram comparativamente a presença destas MPTH em outras lesões e tecidos normais, como citado anteriormente (BENARD; GOOSSENS-BEUMER; VAN HOESEL; DE GRAAF *et al.*, 2014; DE FREITAS FILHO; SERVATO; DE SA; SIQUEIRA *et al.*, 2018). Além disto, também não foi possível observar uma correlação entre as imunorreatividades destas MPTH nas amostras de epitélio normal e LB, sugerindo que possam ter ações não conjugadas na modulação da cromatina e na transcrição gênica.

É importante destacar que mais estudos são necessários, com diferentes metodologias e mais aprofundados, para que seja possível esclarecer quais são, de fato, os reais papéis das modificações pós-traducionais de histonas trabalhadas aqui com o processo de carcinogênese de lesões potencialmente malignas.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que, no contexto da investigação, as modificações pós-traducionais de histonas MPTH H3K9me3 e H3K36me3 estão presentes nas leucoplasias bucais sugerindo sua participação na patogenia destas doenças. Além disto, ao observar o índice de expressão de H3K9me3 aumentado em amostras de LB comparado às de mucosa normal, e, em comparação semelhante, o decréscimo de H3K36me3, constatou-se neste modelo que a detecção e expressão de ambas estão associadas, de forma diferenciada, a progressão da doença em direção à transformação maligna, assumindo, assim, potencial valor como marcador desta transição.

A associação destas modificações a variáveis demográficas e clinicopatológicas mostra que a expressão das MPTH sofre influência das condições sobre as quais estão expostas, e a compreensão da presença destas modificações na patogenia das leucoplasias bucais merece ser mais bem estudada.

## 8. REFERÊNCIAS\*

ALLAN, J.; HARTMAN, P. G.; CRANE-ROBINSON, C.; AVILES, F. X. The structure of histone H1 and its location in chromatin. **Nature**, 288, n. 5792, p. 675-679, Dec 25 1980.

ARNAOUTAKIS, D.; BISHOP, J.; WESTRA, W.; CALIFANO, J. A. Recurrence patterns and management of oral cavity premalignant lesions. **Oral Oncol**, 49, n. 8, p. 814-817, Aug 2013.

BAGAN, J. V.; JIMENEZ, Y.; MURILLO, J.; GAVALDA, C. *et al.* Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. **J Oral Maxillofac Surg**, 65, n. 1, p. 46-49, Jan 2007.

BANNISTER, A. J.; SCHNEIDER, R.; MYERS, F. A.; THORNE, A. W. *et al.* Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. **J Biol Chem**, 280, n. 18, p. 17732-17736, May 6 2005.

BANNISTER, A. J.; ZEGERMAN, P.; PARTRIDGE, J. F.; MISKA, E. A. *et al.* Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. **Nature**, 410, n. 6824, p. 120-124, Mar 1 2001.

BARBOSA DE PAULO, L. F. **Avaliação da expressão gênica e proteica da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina em amostras de leucoplasia bucal e sua relação com fatores prognósticos com ênfase na transformação maligna.** Tese (Doutorado em Clínica Odontológica Integrada) – Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

BARSKI, A.; CUDDAPAH, S.; CUI, K.; ROH, T. Y. *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. **Cell**, 129, n. 4, p. 823-837, May 18 2007.

BECKER, J. S.; NICETTO, D.; ZARET, K. S. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. **Trends Genet**, 32, n. 1, p. 29-41, Jan 2016.

BEHJATI, S.; TARPEY, P. S.; PRESNEAU, N.; SCHEIPL, S. *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nat Genet**, 45, n. 12, p. 1479-1482, Dec 2013.

BENARD, A.; GOOSSENS-BEUMER, I. J.; VAN HOESEL, A. Q.; DE GRAAF, W. *et al.* Histone trimethylation at H3K4, H3K9 and H4K20 correlates with patient survival and tumor recurrence in early-stage colon cancer. **BMC Cancer**, 14, p. 531, Jul 22 2014.

BENNETT, R. L.; SWAROOP, A.; TROCHE, C.; LICHT, J. D. The Role of Nuclear Receptor-Binding SET Domain Family Histone Lysine Methyltransferases in Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 7, n. 6, Jun 1 2017.

\* Todas as referências foram formatadas de acordo com a NBR 6023

BEWLEY, A. F.; FARWELL, D. G. Oral leukoplakia and oral cavity squamous cell carcinoma. **Clin Dermatol**, 35, n. 5, p. 461-467, Sep - Oct 2017.

BOUQUOT, J. E.; GORLIN, R. J. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 61, n. 4, p. 373-381, Apr 1986.

BRITO, J. A.; GOMES, C. C.; GUIMARAES, A. L.; CAMPOS, K. *et al.* Relationship between microRNA expression levels and histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med**, 43, n. 3, p. 211-216, Mar 2014.

BROUNS, E. R.; BAART, J. A.; BLOEMENA, E.; KARAGOZOGLU, H. *et al.* The relevance of uniform reporting in oral leukoplakia: definition, certainty factor and staging based on experience with 275 patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 18, n. 1, p. e19-26, Jan 1 2013.

CAMARA, P. R.; DUTRA, S. N.; TAKAHAMA JUNIOR, A.; FONTES, K. *et al.* A comparative study using WHO and binary oral epithelial dysplasia grading systems in actinic cheilitis. **Oral Dis**, 22, n. 6, p. 523-529, Sep 2016.

CARROZZA, M. J.; LI, B.; FLORENS, L.; SUGANUMA, T. *et al.* Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. **Cell**, 123, n. 4, p. 581-592, Nov 18 2005.

CERERO-LAPIEDRA, R.; BALADE-MARTINEZ, D.; MORENO-LOPEZ, L. A.; ESPARZA-GOMEZ, G. *et al.* Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 15, n. 6, p. e839-845, Nov 1 2010.

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

CHHER, T.; HAK, S.; KALLARAKKAL, T. G.; DURWARD, C. *et al.* Prevalence of oral cancer, oral potentially malignant disorders and other oral mucosal lesions in Cambodia. **Ethn Health**, 23, n. 1, p. 1-15, Jan 2018.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. **Cell**, 150, n. 1, p. 12-27, Jul 6 2012.

DE FREITAS FILHO, S. A. J.; SERVATO, J. P. S.; DE SA, R. T.; SIQUEIRA, C. S. *et al.* Evaluation of specific modified histones in lip carcinogenesis. **Pathol Res Pract**, 214, n. 6, p. 876-880, Jun 2018.

DE OLIVEIRA, D. H.; DE SOUSA LOPES, M. L.; DE SANTANA SARMENTO, D. J.; QUEIROZ, L. M. *et al.* Relationship between the epithelial expression of hMLH1, MDM2, and p63 and lower lip carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, 43, n. 5, p. 357-363, May 2014.

DIEZ-PEREZ, R.; CAMPO-TRAPERO, J.; CANO-SANCHEZ, J.; LOPEZ-DURAN, M. *et al.* Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). **Oncol Rep**, 25, n. 5, p. 1203-1209, May 2011.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; TAKATA, T.; GRANDIS, J. R. *et al.* The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives. **Hum Pathol**, 66, p. 10-12, Aug 2017.

ELLINGER, J.; BACHMANN, A.; GOKE, F.; BEHBAHANI, T. E. *et al.* Alterations of global histone H3K9 and H3K27 methylation levels in bladder cancer. **Urol Int**, 93, n. 1, p. 113-118, 2014.

ELLINGER, J.; KAHL, P.; VON DER GATHEN, J.; ROGENHOFER, S. *et al.* Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. **Prostate**, 70, n. 1, p. 61-69, Jan 1 2010.

FANG, D.; GAN, H.; WANG, H.; ZHOU, H. *et al.* Probe the function of histone lysine 36 methylation using histone H3 lysine 36 to methionine mutant transgene in mammalian cells. **Cell Cycle**, 16, n. 19, p. 1781-1789, Oct 2 2017.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, 4, n. 2, p. 143-153, Feb 2004.

FERRARI, P.; STRUBIN, M. Uncoupling histone turnover from transcription-associated histone H3 modifications. **Nucleic Acids Res**, 43, n. 8, p. 3972-3985, Apr 30 2015.

FONTEBASSO, A. M.; SCHWARTZENTRUBER, J.; KHUONG-QUANG, D. A.; LIU, X. Y. *et al.* Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. **Acta Neuropathol**, 125, n. 5, p. 659-669, May 2013.

FORNATORA, M.; JONES, A. C.; KERPEL, S.; FREEDMAN, P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 82, n. 1, p. 47-56, Jul 1996.

GASCHE, J. A.; GOEL, A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncol**, 8, n. 11, p. 1407-1425, Nov 2012.

GUO, R.; ZHENG, L.; PARK, J. W.; LV, R. *et al.* BS69/ZMYND11 reads and connects histone H3.3 lysine 36 trimethylation-decorated chromatin to regulated pre-mRNA processing. **Mol Cell**, 56, n. 2, p. 298-310, Oct 23 2014.

GUPTA, P. C. Epidemiologic study of the association between alcohol habits and oral leukoplakia. **Community Dent Oral Epidemiol**, 12, n. 1, p. 47-50, Feb 1984.

HO, T. H.; KAPUR, P.; JOSEPH, R. W.; SERIE, D. J. *et al.* Loss of histone H3 lysine 36 trimethylation is associated with an increased risk of renal cell carcinoma-specific death. **Mod Pathol**, 29, n. 1, p. 34-42, Jan 2016.

HO, T. H.; PARK, I. Y.; ZHAO, H.; TONG, P. *et al.* High-resolution profiling of histone h3 lysine 36 trimethylation in metastatic renal cell carcinoma. **Oncogene**, 35, n. 12, p. 1565-1574, Mar 24 2016.

HOLMSTRUP, P.; VEDTOFTE, P.; REIBEL, J.; STOLTZE, K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol**, 42, n. 5, p. 461-474, May 2006.

JENSEN, E. C. Quantitative analysis of histological staining and fluorescence using ImageJ. **Anat Rec (Hoboken)**, 296, n. 3, p. 378-381, Mar 2013.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, 293, n. 5532, p. 1074-1080, Aug 10 2001.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, 128, n. 4, p. 693-705, Feb 23 2007.

KRISHNA PRIYA, M.; SRINIVAS, P.; DEVAKI, T. Evaluation of the Prevalence of Oral Mucosal Lesions in a Population of Eastern Coast of South India. **J Int Soc Prev Community Dent**, 8, n. 5, p. 396-401, Sep-Oct 2018.

KUDITHIPUDI, S.; JELTSCH, A. Role of somatic cancer mutations in human protein lysine methyltransferases. **Biochim Biophys Acta**, 1846, n. 2, p. 366-379, Dec 2014.

KUJAN, O.; OLIVER, R. J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S. A. *et al.* Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, 42, n. 10, p. 987-993, Nov 2006.

LACHNER, M.; JENUWEIN, T. The many faces of histone lysine methylation. **Curr Opin Cell Biol**, 14, n. 3, p. 286-298, Jun 2002.

LAIRD, P. W. Cancer epigenetics. **Hum Mol Genet**, 14 Spec No 1, p. R65-76, Apr 15 2005.

LESZINSKI, G.; GEZER, U.; SIEGELE, B.; STOETZER, O. *et al.* Relevance of histone marks H3K9me3 and H4K20me3 in cancer. **Anticancer Res**, 32, n. 5, p. 2199-2205, May 2012.

LI, B.; GOGOL, M.; CAREY, M.; LEE, D. *et al.* Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. **Science**, 316, n. 5827, p. 1050-1054, May 18 2007.

LI, F.; MAO, G.; TONG, D.; HUANG, J. *et al.* The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$ . **Cell**, 153, n. 3, p. 590-600, Apr 25 2013.

LI, Q. L.; LEI, P. J.; ZHAO, Q. Y.; LI, L. *et al.* Epigenomic analysis in a cell-based model reveals the roles of H3K9me3 in breast cancer transformation. **Epigenomics**, 9, n. 8, p. 1077-1092, Aug 2017.

LIU, W.; WANG, Y. F.; ZHOU, H. W.; SHI, P. *et al.* Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. **BMC Cancer**, 10, p. 685, Dec 16 2010.

LODI, G.; PORTER, S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. **J Oral Pathol Med**, 37, n. 2, p. 63-69, Feb 2008.

LU, C.; RAMIREZ, D.; HWANG, S.; JUNGBLUTH, A. *et al.* Histone H3K36M mutation and trimethylation patterns in chondroblastoma. **Histopathology**, 74, n. 2, p. 291-299, Jan 2019.

LUGER, K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. **Curr Opin Genet Dev**, 13, n. 2, p. 127-135, Apr 2003.

MANCUSO, M.; MATASSA, D. S.; CONTE, M.; COLELLA, G. *et al.* H3K4 histone methylation in oral squamous cell carcinoma. **Acta Biochim Pol**, 56, n. 3, p. 405-410, 2009.

MARANGO, J.; SHIMOYAMA, M.; NISHIO, H.; MEYER, J. A. *et al.* The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. **Blood**, 111, n. 6, p. 3145-3154, Mar 15 2008.

MASEREJIAN, N. N.; JOSHIPURA, K. J.; ROSNER, B. A.; GIOVANNUCCI, E. *et al.* Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 15, n. 4, p. 774-781, Apr 2006.

MILLER R. T.; KUBIER P.; REYNOLDS B.; TURNBOW H. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. **Applies Immunohistochemcamistry & Molecular Morphology**, 7, n. 1, p. 63-65, 1999.

MORISHITA, M.; DI LUCCIO, E. Cancers and the NSD family of histone lysine methyltransferases. **Biochim Biophys Acta**, 1816, n. 2, p. 158-163, Dec 2011.

MULLER-TIDOW, C.; KLEIN, H. U.; HASCHER, A.; ISKEN, F. *et al.* Profiling of histone H3 lysine 9 trimethylation levels predicts transcription factor activity and survival in acute myeloid leukemia. **Blood**, 116, n. 18, p. 3564-3571, Nov 4 2010.

NAPIER, S. S.; COWAN, C. G.; GREGG, T. A.; STEVENSON, M. *et al.* Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: size (extent) matters. **Oral Dis**, 9, n. 3, p. 129-137, May 2003.

NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **J Oral Pathol Med**, 37, n. 1, p. 1-10, Jan 2008.

NEWBOLD, R. F.; MOKBEL, K. Evidence for a tumour suppressor function of SETD2 in human breast cancer: a new hypothesis. **Anticancer Res**, 30, n. 9, p. 3309-3311, Sep 2010.

PARK, Y. S.; JIN, M. Y.; KIM, Y. J.; YOON, J. H. *et al.* The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. **Ann Surg Oncol**, 15, n. 7, p. 1968-1976, Jul 2008.

PARLATESCU, I.; GHEORGHE, C.; COCULESCU, E.; TOVARU, S. Oral leukoplakia - an update. **Maedica (Buchar)**, 9, n. 1, p. 88-93, Mar 2014.

PISCOPO, M.; CAMPISI, G.; COLELLA, G.; BILANCIONE, M. *et al.* H3 and H3.3 histone mRNA amounts and ratio in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. **Oral Dis**, 12, n. 2, p. 130-136, Mar 2006.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, 28, n. 10, p. 1057-1068, Oct 2010.

RICE, J. C.; ALLIS, C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. **Curr Opin Cell Biol**, 13, n. 3, p. 263-273, Jun 2001.

ROGENHOFER, S.; KAHL, P.; HOLZAPFEL, S.; A, V. O. N. R. *et al.* Decreased levels of histone H3K9me1 indicate poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. **Anticancer Res**, 32, n. 3, p. 879-886, Mar 2012.

SANT'ANA, J. M. A. **Expressão global de histonas ativadoras e repressoras da atividade transcricional de genes em uma amostra de carcinoma epidermóide da cavidade bucal metastático e não metastático e a associação delas com variáveis clínico-patológicas de importância prognóstica.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.t

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

SILVERMAN, S., Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. **J Am Dent Assoc**, 132 Suppl, p. 7S-11S, Nov 2001.

SILVERMAN, S., Jr.; GORSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. **Cancer**, 53, n. 3, p. 563-568, Feb 1984.

SONG, J.; NOH, J. H.; LEE, J. H.; EUN, J. W. *et al.* Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. **APMIS**, 113, n. 4, p. 264-268, Apr 2005.

SONG, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, D. K.; PARK, S. I. *et al.* Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients. **Pathol Int**, 62, n. 3, p. 182-190, Mar 2012.

SUGAR, L.; BANOCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. **Bull World Health Organ**, 41, n. 2, p. 289-293, 1969.

TABY, R.; ISSA, J. P. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin**, 60, n. 6, p. 376-392, Nov-Dec 2010.

TAMAGAWA, H.; OSHIMA, T.; NUMATA, M.; YAMAMOTO, N. *et al.* Global histone modification of H3K27 correlates with the outcomes in patients with metachronous liver metastasis of colorectal cancer. **Eur J Surg Oncol**, 39, n. 6, p. 655-661, Jun 2013.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, 45, n. 4-5, p. 317-323, Apr-May 2009.

VAN DER WAAL, I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 20, n. 6, p. e685-692, Nov 1 2015.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **Lancet Oncol**, 3, n. 12, p. 755-763, Dec 2002.

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

VIRANI, S.; COLACINO, J. A.; KIM, J. H.; ROZEK, L. S. Cancer epigenetics: a brief review. **ILAR J**, 53, n. 3-4, p. 359-369, 2012.

VOLKEL, P.; ANGRAND, P. O. The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. **Biochimie**, 89, n. 1, p. 1-20, Jan 2007.

WAGNER, E. J.; CARPENTER, P. B. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 2, p. 115-126, Jan 23 2012.

WALDRON, C. A.; SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, 36, n. 4, p. 1386-1392, Oct 1975.

WARNAKULASURIYA, S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 582-590, Jun 2018.

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

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

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



XIAO, B.; JING, C.; WILSON, J. R.; WALKER, P. A. *et al.* Structure and catalytic mechanism of the human histone methyltransferase SET7/9. **Nature**, 421, n. 6923, p. 652-656, Feb 6 2003.

YAMAMOTO, D.; SHIMA, K.; MATSUO, K.; NISHIOKA, T. *et al.* Ornithine decarboxylase antizyme induces hypomethylation of genome DNA and histone H3 lysine 9 dimethylation (H3K9me2) in human oral cancer cell line. **PLoS One**, 5, n. 9, p. e12554, Sep 3 2010.

ZHANG, K.; LI, L.; ZHU, M.; WANG, G. *et al.* Comparative analysis of histone H3 and H4 post-translational modifications of esophageal squamous cell carcinoma with different invasive capabilities. **J Proteomics**, 112, p. 180-189, Jan 1 2015.

ZHANG, L.; CHEUNG, K. J., Jr.; LAM, W. L.; CHENG, X. *et al.* Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. **Cancer**, 91, n. 11, p. 2148-2155, Jun 1 2001.

ZHAO, Q.; CABALLERO, O. L.; LEVY, S.; STEVENSON, B. J. *et al.* Transcriptome-guided characterization of genomic rearrangements in a breast cancer cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 6, p. 1886-1891, Feb 10 2009.

ZHAO, Q. Y.; LEI, P. J.; ZHANG, X.; ZHENG, J. Y. *et al.* Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. **Clin Epigenetics**, 8, p. 34, 2016.

## 9. ANEXOS

### 9.1. ANEXO 1



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de alterações epigenéticas em doenças da região bucomaxilofacial.

**Pesquisador:** ADRIANO MOTA LOYOLA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 60858016.1.0000.5152

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.001.481

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERLÂNDIA, 05 de Abril de 2017

---

Assinado por:  
Sandra Terezinha de Farias Furtado  
(Coordenador)