



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



DANYELLA THAYS CAVALCANTE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HISTONA DESACETILASE 6 NO
PROCESSO DE CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL EM MODELO
MURINO**

Uberlândia

2025

DANYELLA THAYS CAVALCANTE OLIVEIRA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HISTONA DESACETILASE 6 NO
PROCESSO DE CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL EM MODELO
MURINO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Odontologia

Orientador: Paulo Rogério de Faria

Uberlândia

2025

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

O48 2025	Oliveira, Danyella Thays Cavalcante, 2002- EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HISTONA DESACETILASE 6 NO PROCESSO DE CARCINOGENESE BUCAL EXPERIMENTAL EM MODELO MURINO [recurso eletrônico] / Danyella Thays Cavalcante Oliveira. - 2025.
	<p>Orientador: Paulo Rogério de Faria . Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Odontologia. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Odontologia. I. , Paulo Rogério de Faria,1976-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Odontologia. III. Título.</p>

CDU: 616.314

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Comissão Permanente de Supervisão dos Trabalhos de Conclusão
de Curso da Graduação em Odontologia
Av. Pará, 1720, Bloco 4LA, Sala 42 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8116 - tcc@foufu.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Odontologia				
Defesa de:	Trabalho de Conclusão de Curso II - FOUFU 31003				
Data:	12/12/2025	Hora de início:	16h	Hora de encerramento:	16h50
Matrícula do Discente:	12111ODO038				
Nome do Discente:	Danyella Thays Cavalcante Oliveira				
Título do Trabalho:	Expressão imunohistiquímica de Histona Desacetilase 6 no processo de carcinogênese bucal experimental em modelo murino				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Reuniu-se na Sala de Aula nº 31, Vila Digital, da Faculdade de Odontologia, Bloco 4L anexo A, último andar, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Curso de Graduação em Odontologia, composta pelos professores doutores: **Murilo de Sousa Menezes** (FOUFU); **João Cesar Guimarães Henriques** (FOUFU); e **Paulo Rogério de Faria** (FOUFU) - orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da Banca examinadora, Prof. Dr. **Paulo Rogério de Faria**, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, além de agradecer a presença do público e concedeu ao discente a palavra, para a exposição do seu trabalho.

A seguir, o presidente da Banca concedeu a palavra, pela ordem, sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca Examinadora, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a)

OU

Reprovado (a)

Nada mais havendo a tratar, foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata, que após lida, foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Rogerio de Faria, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/12/2025, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **João Cesar Guimarães Henriques, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/12/2025, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Murilo de Sousa Menezes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 12/12/2025, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6909481** e o código CRC **99B202FA**.

Referência: Processo nº 23117.086048/2025-51

SEI nº 6909481

Dedico este trabalho aos meus avós Antônia Moreira Cavalcante e Francisco Cavalcante Vieira, que, mesmo sem terem tido a oportunidade de estudar, nunca deixaram de acreditar no valor da educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pelo amparo e orientação durante todo este percurso. Sempre me senti profundamente amada pelo Espírito Santo, e acredito que cada gesto de carinho que recebo possa se refletir no cuidado e na dedicação que coloco em minhas mãos ao exercer minha profissão.

À minha mãe, Cleusimar, minha base, meu porto seguro e maior inspiração: você sempre me apoiou, me impulsionou a ser melhor e nunca mediu esforços para me ver sorrir. Mamãe, se algum dia eu for metade da mulher que a senhora é, já serei muito. Seu amor me ensinou que coragem é o que eu preciso para chegar onde eu quiser.

Papai, cito Carlos Drummond de Andrade: “*Ando pendido para o lado esquerdo, pois carrego em meu peito todos os meus mortos*”. Esta pesquisa é a forma que encontrei para honrar sua memória e contribuir para que, um dia, o câncer não leve tão cedo os pais de outras jovens meninas. Agradeço por me pajejar daí de cima, por sempre me proteger e iluminar o meu caminho.

Agradeço aos meus irmãos, Gabryella e João Gabryel, meus primeiros melhores amigos, que me entendem e me amam em minha totalidade. Vocês são o meu sangue. Mesmo quando estamos distantes, sinto a presença e o apoio de vocês em cada passo que dou, e sei que grande parte da força que carrego veio de tudo o que vivemos juntos.

À família Cavalcante, especialmente aos meus avós, tios e padrinhos, que correram sob o sol para que nós, mais novos, pudéssemos caminhar sob a sombra: vocês são meus maiores incentivadores. Saber que posso contar com vocês me dá coragem para tentar, falhar e tentar novamente, sabendo que eu sempre tenho para onde voltar. Aos meus primos, com quem cresci e compartilhei tantas memórias preciosas, agradeço por cada momento, por cada risada e por serem presença constante e grandes exemplos em minha vida.

Ao longo da vida, sempre tive a sorte de caminhar ao lado de bons amigos, daqueles que permanecem próximos mesmo quando os caminhos se tornam desafiadores. Aos amigos da infância e da adolescência, que acompanharam grandes fases da minha vida, agradeço por cada risada, cada segredo compartilhado e por terem me ensinado o valor da amizade verdadeira.

Aos amigos que fiz durante a faculdade, que dividiram comigo noites em claro de estudo, desafios, e pequenas vitórias do dia a dia, meu agradecimento especial. Vocês tornaram a jornada

mais leve, mais alegre e mais significativa, celebrando comigo cada conquista como se fosse também de vocês. Vocês são a minha família de Uberlândia.

À minha dupla de faculdade e companheira de apartamento, Keila, agradeço por compartilhar cada curva dessa estrada, bem como as risadas das piadas que nem sempre tiveram tanta graça e os momentos que tornaram a faculdade mais especial. Sem você, esta fase não teria sido a mesma.

Agradeço ao meu orientador, Paulo, pelos ensinamentos, paciência e por compartilhar seu conhecimento com generosidade e paixão. À Dra. Anaira, sou grata por me guiar nos trabalhos do laboratório com dedicação e presteza, mostrando que ensinar com coração é ensinar para a vida.

Agradeço ao Laboratório de Patologia, ao PET Odontologia UFU e à Liga de Reabilitação Oral, entidades das quais tive a honra de fazer parte, por proporcionar experiências e aprendizados que vão além do conteúdo acadêmico, por me ensinar que ciência e humanidade caminham juntas e por me apresentar pessoas tão especiais que levarei para a vida.

Agradeço ao corpo docente da Universidade por transmitir conhecimento com carinho, paciência e entusiasmo. Mais bonito do que saber muito, é saber inspirar outras pessoas a aprender com amor, e todos vocês fizeram isso comigo. Tive a honra de conviver com grandes profissionais, que se tornaram também grandes amigos. Muito obrigada por acreditarem em mim nos momentos em que eu mesma não acreditei.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Uberlândia, por oferecer um curso de graduação tão completo e por me proporcionar a oportunidade de viver uma das fases mais intensas, felizes e transformadoras da minha vida. Cada experiência vivida aqui, ficará guardada na memória e em meu coração.

“Porque eu sou do tamanho do que vejo
E não do tamanho da minha altura...”

(Pessoa, 1993, p. 32)

RESUMO

Introdução: A carcinogênese oral é um processo multifatorial mediado por alterações genéticas e epigenéticas. A Histona Desacetilase 6 (HDAC6), uma enzima com diversificadas funções citoplasmáticas, tem sido associada à progressão de neoplasias, mas seu perfil de expressão na sequência que vai da displasia ao carcinoma oral ainda não está completamente elucidado. **Objetivo:** Analisar a imunomarcação de HDAC6 em mucosa normal, DE e CCE murino induzido pelo carcinógeno 4NQO e etanol, buscando identificar marcadores epigenéticos com potencial diagnóstico, prognóstico e terapêutico. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 120 camundongos C57BL/6J, distribuídos em oito grupos experimentais de acordo com o tratamento (4NQO/EtOH, 4NQO/H₂O, PPG/EtOH, PPG/H₂O) e o sexo. Após 25 semanas, as línguas foram processadas para análise histopatológica (classificando-se mucosa normal - MN, displasia branca - DBR, displasia acentuada - DAR e carcinoma de células escamosas - CCE) e subsequentemente submetidas à imuno-histoquímica para HDAC6. A quantificação da marcação foi realizada por morfometria digital. **Resultados:** A expressão de HDAC6 demonstrou um perfil dinâmico ao longo da carcinogênese. Foi observado, em ambos os sexos,

um aumento significativo da imunomarcação nas lesões displásicas (DBR e DAR) quando comparadas aos CCE, que exibiram padrão heterogêneo e menor imunorreatividade. Embora tenham sido notadas tendências de variação na expressão relacionadas ao sexo e ao agente carcinogênico, essas diferenças não alcançaram significância estatística. **Conclusão:** A HDAC6 apresenta expressão aumentada nas fases iniciais da carcinogênese oral experimental, com marcante redução nos carcinomas estabelecidos. Este padrão sugere um papel relevante da enzima na fase pré-maligna, posicionando-a como um potencial marcador de interesse para estudos futuros sobre a progressão tumoral oral.

Palavras-chave: Carcinogênese; Epigenética; Desacetilase 6 de Histona; 4-Nitroquinolina-1-Óxido; Carcinoma de Células Escamosas Bucal.

ABSTRACT

Introduction: Oral carcinogenesis is a multifactorial process mediated by genetic and epigenetic alterations. Histone Deacetylase 6 (HDAC6), an enzyme with diverse cytoplasmic functions, has been associated with neoplasm progression, but its expression profile in the sequence from dysplasia to oral carcinoma is not yet fully elucidated. **Objective:** To analyze HDAC6 immunostaining in normal mucosa, epithelial dysplasia (ED), and oral squamous cell carcinoma (OSCC) in a murine model induced by 4NQO and ethanol, seeking to identify epigenetic markers with diagnostic, prognostic, and therapeutic potential. **Materials and Methods:** A total of 120 C57BL/6J mice were used, distributed into eight experimental groups according to treatment (4NQO/EtOH, 4NQO/H₂O, PPG/EtOH, PPG/H₂O) and sex. After 25 weeks, the tongues were processed for histopathological analysis (classified as normal mucosa - NM, mild dysplasia - MiD, severe dysplasia - SeD, and squamous cell carcinoma - SCC) and subsequently subjected to immunohistochemistry for HDAC6. Staining quantification was performed by digital morphometry. **Results:** HDAC6 expression demonstrated a dynamic profile throughout carcinogenesis. In both sexes, a significant increase in immunostaining was observed in dysplastic lesions (MiD and SeD) when compared to SCCs, which exhibited a heterogeneous pattern and lower immunoreactivity. Although trends of variation in expression related to sex and the carcinogenic agent were noted, these differences did not reach statistical significance. **Conclusion:** HDAC6 shows increased expression in the initial phases of experimental oral carcinogenesis, with a marked reduction in established carcinomas. This pattern suggests a relevant role of the enzyme in the pre-malignant phase, positioning it as a potential marker of interest for future studies on oral tumor progression.

Keywords: Carcinogenesis; Epigenetics; Histone Deacetylase 6; 4-Nitroquinoline-1-Oxide; Oral Squamous Cell Carcinoma.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Ensaio in vivo	14
2.2 Análise Histopatológica	16
2.3 Ensaio Imunohistoquímico	17
2.4 Análise Imunohistoquímica	17
2.5 Análises Estatísticas	18
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	26
6. REFERÊNCIAS	27
7. ANEXOS	32

1. INTRODUÇÃO

A carcinogênese é compreendida como um processo multifatorial e dinâmico, no qual diferentes mecanismos, de forma progressiva, alteram várias funções celulares que transformam uma célula normal em uma célula maligna (1). Entre essas capacidades, destacam-se a autossuficiência nos sinais de crescimento, a insensibilidade a sinais inibidores e a evasão à apoptose, que, em conjunto, são responsáveis pela sobrevivência dos clones neoplásicos (2). Cada uma dessas características associadas ao câncer é regulada por vias específicas de sinalização celular. A plasticidade e a redundância presentes nessas vias de sinalização costumam contribuir tanto para a recidiva dos tumores quanto para a resistência aos tratamentos quimioterápicos tradicionais (2). Nesse contexto, torna-se relevante identificar moléculas reguladoras fundamentais envolvidas nessas vias de sinalização, com o propósito de aprofundar a compreensão dos mecanismos que sustentam a tumorigênese e, ao mesmo tempo, de desenvolver estratégias terapêuticas de maneira mais específica e eficiente contra as células tumorais.

A transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa com potencial invasivo geralmente não ocorre de maneira imediata. Na verdade, trata-se de um processo gradual. Durante esse percurso, é habitual que surjam etapas intermediárias, reconhecíveis morfologicamente como lesões pré-malignas (1). Quando localizadas na mucosa oral, essas alterações são denominadas como desordens bucais potencialmente malignas (3,4). Essas alterações são definidas como condições clínicas associadas a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer oral, precedendo-o na maioria dos casos (5,6). Entre essas lesões, a displasia epitelial oral ocupa posição importante, por representar um estágio intermediário à transformação tumoral durante a carcinogênese. Essa condição se caracteriza por um conjunto progressivo de alterações morfológicas que refletem distúrbios genéticos e epigenéticos acumulados ao longo do processo, precedendo a transformação maligna (7).

Nesse sentido, a epigenética tem se destacado como uma área de investigação em rápida expansão, de modo a oferecer novas perspectivas para a compreensão dos processos biológicos que sustentam o binômio saúde-doença (8, 9). A epigenética dedica-se ao estudo de alterações na expressão gênica que não resultam de modificações na sequência de DNA, mas de alterações químicas no próprio DNA ou em proteínas a ele associadas, capazes de influenciar, de forma significativa, a diferenciação celular, o desenvolvimento tecidual e a suscetibilidade a diversas patologias (8).

Modificações pós-traducionais de histonas são adicionadas e removidas de maneira altamente

regulada por enzimas modificadoras de histonas, compondo um sistema capaz de influenciar diretamente processos essenciais como transcrição, reparo e replicação do DNA, portanto, são reconhecidas como moléculas capazes de induzirem alterações epigenéticas no DNA (9). Nesse sentido, mudanças nos padrões dessas marcas ou na expressão dos reguladores epigenéticos podem desencadear efeitos profundos e favorecer a indução e manutenção de diferentes tipos de câncer, uma vez que distorcem o equilíbrio transcrecional necessário à homeostase celular (9).

Assim como ocorre na variabilidade celular normal, mecanismos epigenéticos, sobretudo modificações reversíveis de histonas e padrões de metilação do DNA, originam múltiplos estados transcrecionais, os quais resultam em populações tumorais marcadamente dinâmicas e heterogêneas (10). Essa plasticidade permite que o epigenoma consiga se adaptar para favorecer a sobrevivência celular, mesmo diante de tratamentos quimioterápicos, como enzimas de reparo e proteínas anti-apoptóticas, o que contribui para a emergência de clones resistentes e para a ineficácia de terapias citotóxicas direcionadas (10).

As proteínas histonas, tanto em suas caudas quanto em seus domínios globulares, podem apresentar ampla variedade de modificações pós-traducionais, incluindo metilação, acetilação e fosforilação de seus resíduos de aminoácidos (11). Essas modificações modulam de forma direta a compactação da cromatina e a acessibilidade ao DNA, influenciando a expressão gênica e, consequentemente, processos relacionados ao crescimento celular, diferenciação, renovação proteica e mecanismos de morte celular (11, 12). A inativação epigenética de genes essenciais a essas funções constitui uma marca central de diversas patologias humanas, especialmente do câncer (12).

Entre essas modificações, a acetilação de histonas destaca-se como uma das mais relevantes, sendo regulada principalmente pela ação coordenada das enzimas histonas acetiltransferases (HATs) e as histonas desacetilases (HDACs) (13,14). O equilíbrio entre acetilação e desacetilação dos resíduos de lisina é determinante para a manutenção da homeostase celular; do contrário, pode favorecer tanto a aquisição de fenótipo maligno quanto a progressão tumoral (15). Portanto, a modulação farmacológica das HDACs representa uma estratégia essencial, já que a inibição dessas enzimas tende a restaurar padrões de expressão gênica capazes de reverter anormalidades relacionadas à proliferação, migração, vascularização e sobrevivência celular (12).

Entre as diversas HDACs já identificadas, a HDAC6 (Histona Desacetilase 6) ocupa posição

singular, primeiro, por atuar predominantemente no citoplasma, e, segundo, por regular tanto proteínas histonas quanto não histonas, incluindo a α -tubulina (12). A expressão aumentada de HDAC6 já foi observada em neoplasias como câncer de mama, linfomas difusos de grandes células B e linfomas periféricos de células T e em tumores mais avançados quando comparado com tumores em estágios iniciais (14). Dessa forma, a HDAC6 se coloca como importante regulador epigenético capaz de modular proliferação, migração e resistência celular, características fundamentais das células tumorais.

A análise da carcinogênese em modelos experimentais, embora apresente limitações quanto à extração direta dos resultados para a espécie humana, oferece condições controladas que permitem observar fenômenos biomoleculares com mínima interferência de fatores ambientais. Essa abordagem possibilita caracterizar de maneira sistemática os efeitos de uma agressão química contínua e monitorar, ao longo do tempo, as alterações periódicas que ocorrem no epitélio, favorecendo a compreensão detalhada das interações entre diferentes tipos celulares e seus microambientes (16, 17). Assim, modelos de animais capazes de reproduzir de forma fidedigna à carcinogênese oral humana tornam-se ferramentas fundamentais para a compreensão dos mecanismos que governam o aparecimento de desordens bucais potencialmente malignas em humanos e para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas (16).

Embora nenhum modelo animal seja perfeitamente transponível ao cenário humano, o modelo murino induzido por 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO) é amplamente reconhecido por mimetizar características morfológicas, histológicas, genômicas e moleculares da carcinogênese oral (16, 17). Seu sucesso decorre, em grande parte, da reproduzibilidade experimental, da baixa variabilidade entre animais, da possibilidade de estudos longitudinais com intervenções invasivas ou manipulações gênicas e da obtenção de amostras representativas de todos os estágios da transformação neoplásica, especialmente das lesões pré-malignas (17). O 4NQO é um potente agente mutagênico que desencadeia alterações no DNA semelhantes às provocadas pelos carcinógenos do tabaco. Esse modelo reproduz de forma fiel a progressão tumoral clínica e microscópica, permitindo acompanhar desde mudanças arquiteturais iniciais no epitélio até o estabelecimento da invasão (17). Apesar disso, poucos estudos investigaram como agentes iniciadores e promotores clássicos da carcinogênese oral, como o tabaco e o álcool, modulam a paisagem epigenética do epitélio de revestimento bucal ao longo desse processo.

Diante de tudo que foi exposto acima, o presente estudo tem como objetivo analisar a imunomarcação de HDAC6 em mucosa normal, displasia epitelial (DE) e carcinoma de células

escamosa oral (CCEO) em murino induzido por 4NQO e etanol, buscando identificar marcadores epigenéticos com potencial diagnóstico, prognóstico e terapêutico para os CCEO que acometem os seres humanos, a neoplasia maligna epitelial mais frequente da cavidade oral, representando cerca de 95% dos tumores dessa região (18,19).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ensaio *in vivo*

Sessenta camundongos machos e sessenta camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem C5BL6/J, com 6 semanas de vida e pesando em média 25mg, foram submetidos ao protocolo de carcinogênese química induzida em mucosa de língua pela 4-nitroquinoléina-N-óxido (4NQO) e etanol a 8% (EtOH), conforme proposto por Nazário et al. (2025) (13). Os animais foram tratados, inicialmente, com solução contendo 4NQO diluída em propilenoglicol (PPG) e água de beber a 100ug/mL por 10 semanas, seguido de EtOH 8% por 15 semanas. As soluções foram ofertadas em mamadeiras de 330 mL acopladas por mini-isolador e protegidas da luz, em regime ad. libitum. Com o objetivo de realizar o controle do tratamento, utilizou-se solução de PPG diluída em água de beber a 5mg/mL para o tratamento com 4NQO, enquanto foi utilizada água filtrada (H₂O) para controle do tratamento de EtOH 8%. Desta forma, os animais de cada sexo foram alocados em quatro subgrupos aleatoriamente, de acordo com cada tratamento recebido. Logo, totalizaram-se 08 grupos experimentais (4NQO/EtOH, 4NQO/H₂O, PPG/H₂O, PPG/EtOH), com 15 animais cada (Figura 1).

O número de amostras foi estimado com base nos dados de Tang et al. (2004) (22). Foram consideradas as diferenças na proporção de incidência de CCEO de língua entre os grupos experimental ($n = 10$) e controle ($n = 5$), observadas após 28 semanas de experimento, correspondendo a 100% e 0%, respectivamente. Admitindo-se $\alpha = 5\%$, poder estatístico de 80%, teste de hipótese monocaudal e uma expectativa de perda de 30% das amostras do grupo experimental, determinou-se o número de 15 amostras por grupo.

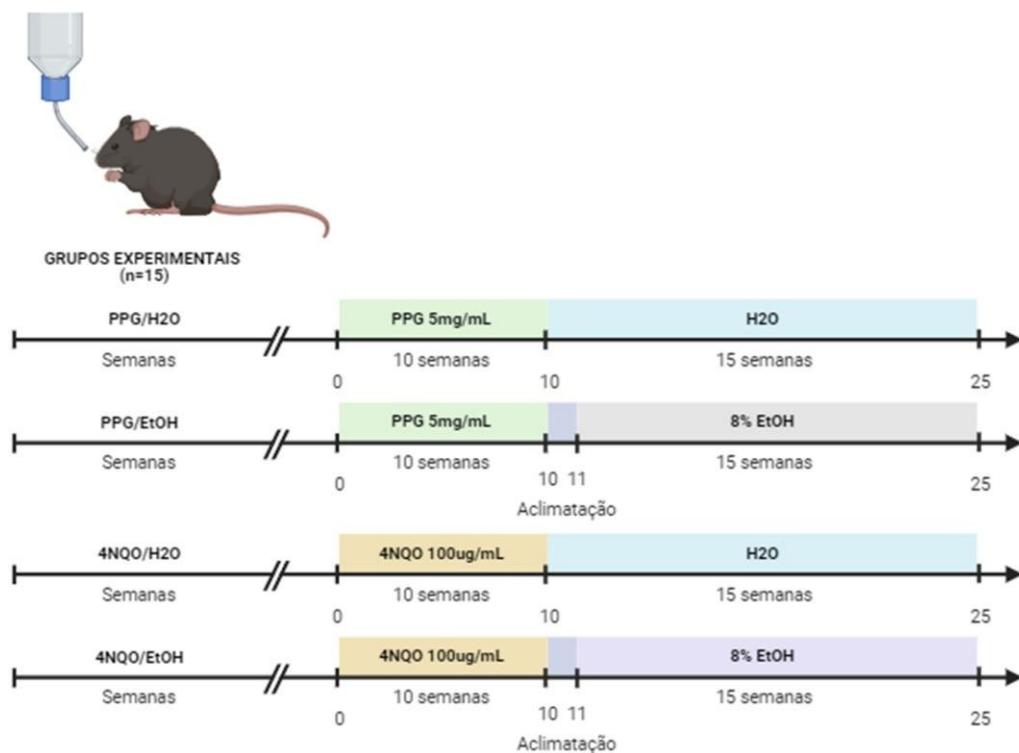


Figura 1 - Delineamento experimental de indução de carcinogênese bucal proposto no estudo.

A fase de experimentação animal foi desenvolvida nas instalações do Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU), localizado no bloco 4C do Campus Umuarama, em Uberlândia (MG). Os animais foram mantidos em mini-isoladores VentLife® com dimensões de 32 × 20 × 21 cm, sendo alocados cinco espécimes por unidade. Cada isolador continha cama de maravalha e dispunha de sistema de ventilação com entrada e exaustão de ar filtradas, sob condições controladas de temperatura (22 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. A ração comercial para pequenos roedores foi disponibilizada ad libitum pelo REBIR-UFU.

Durante todo o ensaio pré-clínico, realizou-se monitoramento semanal do peso corporal e do consumo hídrico dos animais. A partir da vigésima semana de tratamento, os espécimes passaram a ser avaliados a cada 12 horas para detecção de indicadores de sofrimento, incluindo redução $\geq 20\%$ do peso corporal, vocalização excessiva, alterações nas excretas, espasmos, alopecia, piloereção, diminuição do turgor cutâneo, cifose vertebral, redução do grooming, hipoatividade e prostração. A intensidade da dor foi mensurada segundo a Mouse Grimace Scale, conforme parâmetros estabelecidos pelo National Centre for the Replacement & Reduction of Animals in Research (NC3Rs). A ocorrência de quaisquer desses sinais resultou na aplicação imediata do ponto final humanitário.

Ao término de 25 semanas de experimento, os animais foram submetidos à anestesia geral mediante administração intraperitoneal de cetamina (90 mg/kg) associada à xilasina (10 mg/kg), utilizando seringas de insulina de 1 mL. Posteriormente, procedeu-se à coleta sanguínea pelas vias retro-orbital e cardíaca. Após essa etapa, foi realizada eutanásia mecânica por deslocamento cervical, seguida de necrópsia completa. As amostras de língua foram removidas e pesadas em balança semi-analítica.

As línguas foram analisadas macroscópicamente para a detecção de lesões superficiais. Quando presentes, estas foram hemisseccionadas longitudinalmente na região correspondente à maior área lesada; na ausência de alterações visíveis, a secção foi efetuada na linha média do dorso lingual. Após o processamento, um dos fragmentos foi fixado em solução de paraformaldeído a 10% por 24 h e incluso em parafina, enquanto a porção remanescente foi submetida à criopreservação em nitrogênio líquido e posteriormente armazenada em freezer a –80 °C.

Todos os procedimentos experimentais *in vivo* adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU), sob o protocolo nº 020/21 (Anexo 1). As atividades foram conduzidas em conformidade com a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas estabelecidas pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme a Resolução Normativa nº 30 do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA). O delineamento experimental foi elaborado segundo as recomendações ARRIVE 2.0 (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments).

2.2 Análise Histopatológica

Para a análise das alterações epiteliais na mucosa lingual, os blocos incluídos em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 3 μm de espessura, montados em lâminas de vidro e posteriormente às etapas de desparafinação, reidratação e coloração por hematoxilina e eosina (HE), com o objetivo de permitir a avaliação microscópica. As lâminas coradas foram digitalizadas em aumento de 400 \times utilizando o equipamento Slide Scanner Aperio AT2 (Leica Biosystems Imaging, Inc., Nussloch, Alemanha). Foram coletadas informações referentes à quantidade de lesões observadas e à sua distribuição nas regiões dorsal e/ou ventral da língua, abrangendo os terços anterior, médio e posterior. Em seguida, procedeu-se à classificação histopatológica das alterações em displasia epitelial e carcinoma de células escamosas.

A DE foi classificada em dois grupos, utilizando um sistema binário simplificado: displasia de baixo risco (DBR), com alterações displásicas restritas ao terço inferior do epitélio, e displasia de alto risco (DAR), com alterações displásicas presentes do terço médio ao terço superior do epitélio. O CEC foi definido como epitélio escamoso neoplásico que ultrapassou a membrana basal e invadiu a submucosa subjacente (20, 21).

2.3 Ensaio Imunohistoquímico

O ensaio imuno-histoquímico foi realizado em cortes de 3 μm , utilizando o Rabbit-on-Rodent HRP-Polymer Detection System (Biocare Medical, Concord, CA). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 10% de peróxido de hidrogênio (v/v), aplicado três vezes por 10 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão a 100–110°C por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,4) e incubadas com Rodent Block M (Biocare Medical) por 30 minutos à temperatura ambiente, a fim de bloquear IgG endógena e reduzir sinais inespecíficos de fundo. Posteriormente, os cortes foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida a 4°C durante a noite. Os anticorpos utilizados foram: HDAC6 (ab1440, Abcam; diluição 1:1000). A amplificação do sinal e a marcação seguiram o protocolo do sistema Rabbit-on-Rodent HRP-Polymer. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos. Como controles positivos, utilizaram-se tecidos de rim e fígado de camundongo para HDAC6. Por fim, como controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário.

2.4 Análise Imunohistoquímica

Fotomicrografias com resolução de 2592 \times 1944 pixels foram obtidas por meio de uma câmera digital C-Mount de 5,1 megapixels (modelo TA-0120-B) acoplada a um microscópio Nikon E200 MVR, sob aumento de 400 \times . Para cada amostra analisada, foram registradas até dez áreas de mucosa normal (NM) provenientes dos grupos PPG/H₂O e PPG/EtOH, enquanto dez áreas DBR, DAR e CEC foram sequencialmente capturadas a partir dos grupos 4NQO/H₂O e 4NQO/EtOH.

A quantificação da porcentagem de área nuclear com coloração positiva para cada anticorpo foi realizada utilizando o software ImageJ (versão 1.54m), conforme metodologia descrita por Schneider et al. (2012) (27). A média da área positiva foi calculada considerando todas as fotomicrografias adquiridas para cada tipo de lesão e para os animais do grupo controle.

2.5 Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram conduzidas utilizando os softwares GraphPad Prism, versão 8.2 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA), e R Statistical Software, versão 4.4.2 (R Core Team, 2021), adotando-se nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Na análise imuno-histoquímica, as diferenças na porcentagem de área nuclear positiva entre os grupos experimentais foram avaliadas por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste pós-hoc de Dunn para comparações múltiplas. As diferenças intragrupos, considerando cada categoria histológica, foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

3. RESULTADOS

Os dados sobre frequência das DEs (DBR e DAR) e CECs foram publicadas anteriormente por Nazário et al. 2025 (13).

A expressão de HDAC6 variou nas fêmeas nos diferentes grupos, mas sem alcançar significância estatística. Percebe-se, no entanto, que a expressão da enzima foi maior nos grupos controles quando comparado com o grupo 4NQO/H₂O, mas não em relação ao grupo 4NQO/EtOH, o qual apresentou uma maior imunoexpressão (Figura 1A). Entre as fêmeas tratadas com 4NQO/H₂O, observou-se que as DBR e DAR exibiram maior intensidade de expressão da HDAC6 em relação à MN, enquanto os CECs apresentaram os menores níveis de expressão, com diferenças estatisticamente significantes entre eles (Figura 1B). No grupo 4NQO/EtOH, quando comparado com as fêmeas tratadas com 4NQO/H₂O, a expressão de HDAC6 manteve-se semelhante no grupo MN, manteve-se similar na DBR e aumentou um pouco mais DAR, e novamente reduziu sua expressão no CEC (Figura 1C), com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

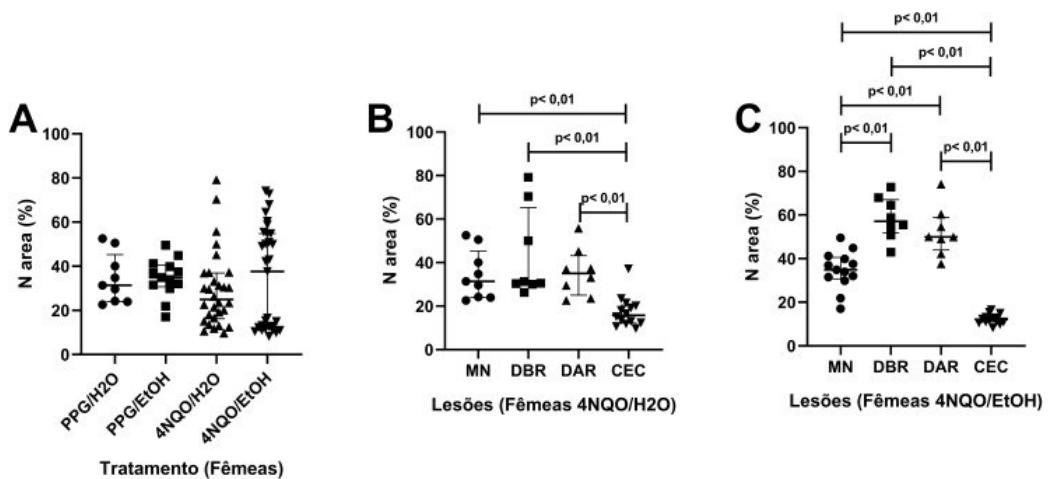


Figura 1 - Expressão de HDAC6 nas fêmeas. (A) Comparação entre os grupos controle e experimental. (B) Comparação entre MN, lesões displásicas e CEC no grupo experimental 4NQO/H₂O. (C) Comparação entre MN, lesões displásicas e CEC no grupo experimental 4NQO/EtOH.

Nos machos, diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos controles e experimentais. Nos grupos controles, observou-se uma maior expressão de HDAC6 que nos grupos experimentais, cuja expressão foi significativamente menor. Além disso, uma diferença estatisticamente significante foi observada entre os grupos experimentais (Figura 2A).

Nos animais machos do grupo 4NQO/H₂O, as lesões DBR e DAR e também MN apresentaram níveis de expressão de HDAC6 semelhantes entre si, mas elevados em comparação aos CECs, que exibiram os menores índices de expressão (Figura 2E). De modo análogo, nos machos do grupo 4NQO/EtOH, MN, DBR e DAR mostraram expressão comparável, porém significativamente superior à observada nos CECs (Figura 2F).

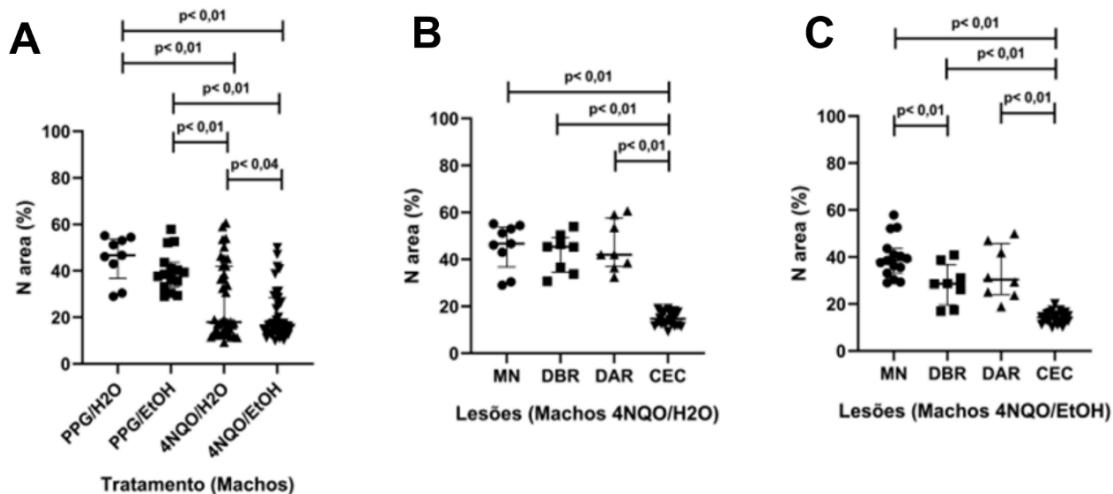


Figura 2 - Expressão de HDAC6 nos machos. (A) Comparação entre os grupos controle e experimental. (B) Comparação entre MN, lesões displásicas e CEC no grupo experimental 4NQO/H₂O. (C) Comparação entre MN, lesões displásicas e CEC no grupo experimental 4NQO/EtOH.

Na comparação entre os sexos, verificou-se que os machos do grupo PPG/H₂O apresentaram níveis mais elevados de expressão de HDAC6 em relação às fêmeas submetidos ao mesmo tratamento. Nos demais grupos, entretanto, não foram observadas diferenças significativas associadas ao sexo (Figura 3).

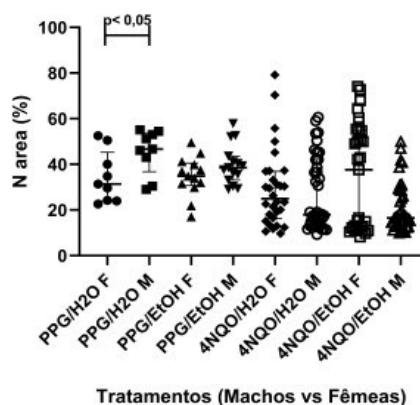


Figura 3 - Comparação entre os sexos e grupos controle e experimental quanto à expressão de HDAC6.

A Figura 4 mostra algumas imagens representativas da imunorreatividade da HDAC6 nas MNs, DBRs/DARs e CECs. Na MN, a imunomarcação localizou-se, principalmente, no citoplasma dos queratinócitos das camadas basal e suprabasal, com discreta intensidade nas papilas filiformes. Nas lesões DBR e DAR, observou-se um aumento evidente da imunorreatividade quando comparado com a MN, caracterizado por marcação citoplasmática difusa e mais intensa nos queratinócitos, embora áreas negativas também foram observadas. Já nos CECs, a imunorreatividade mostrou-se variável, mas menor que na displasia e na MN, alternadas a áreas negativas, refletindo a heterogeneidade tumoral comumente descrita na literatura para a expressão de HDAC6 no epitélio escamoso.

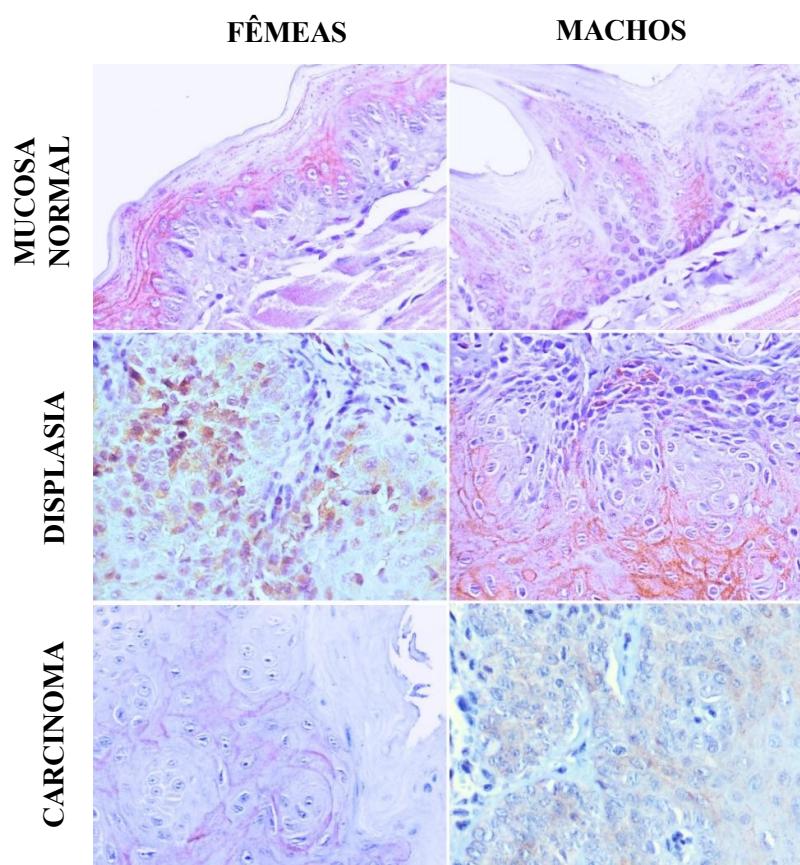


Figura 4 - Expressão imunohistoquímica da HDAC6 nos diferentes estágios da carcinogênese oral experimental. (A, B) Epitélio normal, com imunomarcação fraca a moderada nas camadas basal e suprabasal. (C, D) Displasia epitelial, apresentando marcação citoplasmática intensa e difusa, tanto em graus leves quanto acentuados. (E, F) Carcinoma de células escamosas, com

expressão baixa e heterogênea de HDAC6. Aumento original: (A, B) 100x; (C, D, E, F) 400x.

4. DISCUSSÃO

A expressão de HDAC6 ao longo da tumorigênese oral experimental torna-se relevante devido ao seu papel central na resposta celular. Embora atue majoritariamente no citoplasma, essa enzima regula diversas proteínas, incluindo histonas, como já mencionado, e não histonas. Dessa forma, ela participa de processos essenciais para a progressão tumoral como organização do citoesqueleto, degradação de proteínas mal conformadas e manutenção da homeostase frente a agressões químicas (15).

A modulação epigenética induzida por agentes carcinogênicos como 4NQO e etanol tem sido amplamente reconhecida como determinante na progressão das lesões orais pré-malignas, uma vez que ambos desencadeiam estresse oxidativo, dano ao DNA, inflamação persistente e desregulação de proteínas alvo das HDACs. Evidências mostram que o 4NQO reproduz assinaturas moleculares semelhantes às observadas em tumores associados ao tabaco, enquanto o etanol atua amplificando respostas inflamatórias e favorecendo expansão clonal (28).

Além disso, a literatura aponta que a carcinogênese oral apresenta comportamento distinto entre machos e fêmeas, influenciado por diferenças hormonais, metabólicas, imunes e epigenéticas, que modulam tanto a suscetibilidade quanto a intensidade das respostas teciduais ao dano químico (13, 29). Nesse contexto, enzimas como as HDACs, incluindo a HDAC6, podem ser diferencialmente reguladas entre os sexos e entre diferentes exposições carcinogênicas, refletindo mecanismos adaptativos e padrões específicos de progressão tumoral.

Os achados do presente estudo apontam para tais diferenças sexuais na expressão de HDAC6 durante a carcinogênese oral experimental. Nas fêmeas, a marcação para HDAC6 variou entre os grupos, com discreta tendência a aumento nos grupos controles do que os experimentais, embora no grupo 4NQO/EtOH uma elevação na sua expressão foi notada. No entanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, nos machos, observou-se padrão distinto, com maior expressão nos grupos controles em relação experimentais, com diferenças estatisticamente significantes. Esse comportamento reforça um perfil sexualmente dimórfico já descrito em modelos murinos, nos quais machos e fêmeas apresentam diferenças importantes em vias inflamatórias, acetilação de histonas e vulnerabilidade às alterações epiteliais induzidas quimicamente (13,28). Além disso, esses achados também dialogam com estudos em humanos que apontam que HDACs, incluindo a HDAC6, podem apresentar expressão variável conforme sexo, estágio tumoral e microambiente inflamatório, influenciando desfechos clínicos

e resposta terapêutica (31).

Não obstante a isso, a literatura aponta que machos e fêmeas apresentam diferenças epigenéticas constitutivas, incluindo padrões específicos de acetilação de histonas e expressão gênica ligada à proliferação, inflamação e metabolismo celular, o que pode influenciar a linha de base de enzimas reguladoras como as HDACs (32). Em modelos murinos de carcinogênese oral, essas diferenças sexuais se manifestam também na progressão das lesões, intensidade da inflamação e sensibilidade ao 4NQO e ao etanol (13,28). Assim, a maior expressão basal de HDAC6 nas fêmeas, como observado nos grupos controles, pode refletir mecanismos intrínsecos, possivelmente relacionados a variações hormonais, metabólicas ou epigenéticas, que modulam a atividade dessa proteína antes mesmo da exposição aos agentes carcinogênicos, o que influencia a maneira como cada sexo responde às agressões químicas subsequentes.

O perfil de imunomarcação revelou aumento de HDAC6 nas DBR e DAR quando comparadas ao epitélio morfologicamente normal, seguida por redução acentuada nos CECs nos dois grupos experimentais tanto em macho quanto nas fêmeas. Esse comportamento sugere que a HDAC6 atua de maneira dinâmica ao longo da tumorigênese, sendo modulada de forma distinta nas fases iniciais e tardias da progressão, mas similar entre os sexos. A literatura demonstra que a HDAC6 pode assumir funções distintas no câncer. Em diversos modelos tumorais, essa desacetilase encontra-se aumentada ao longo da progressão neoplásica, associando-se ao crescimento celular e à piora dos desfechos clínicos (31, 33). Em CCEO, estudos mostram elevação da HDAC6 em tumores mais avançados e associação entre alta expressão e menor sobrevida global, reforçando seu potencial como biomarcador prognóstico (34, 35). Além disso, linhagens celulares escamosas orais frequentemente exibem aumento da enzima no desenvolvimento da carcinogênese, enquanto sua inibição reduz proliferação, migração e capacidade tumorigênica (36).

No estudo de Weichert, 51% dos casos de CCEO apresentam positividade para HDAC6, predominantemente citoplasmática, com maior expressão em tumores de estágio avançado (31). De maneira semelhante, Tseng et al. observaram aumento da enzima em amostras humanas de CCEO de maior grau histológico (34). Esses achados contrastam parcialmente com os resultados apresentados neste estudo, em que a expressão de HDAC6 se mostrou reduzida e heterogênea nos carcinomas, diferindo do padrão de aumento descrito em parte da literatura clínica. Por outro lado, outros tumores exibem padrões distintos. No câncer de mama, Zhang et al. identificou maiores níveis de mRNA ou proteína HDAC6 em tumores menores, de baixo grau de malignidade e positivos para receptores hormonais, revelando que a enzima nem sempre está

associada a fenótipos mais agressivos (33). Já no linfoma cutâneo de células T, a expressão citoplasmática de HDAC6 também é descrita como variável, com parte dos casos exibindo marcação intensa e outros apenas fraca (31). No presente estudo, pode-se dizer que o padrão encontrado, reduzido nos carcinomas e elevado nas displasias, pode também estar relacionado com o fato de que no modelo murino se produz apenas tumores bem diferenciados, inviabilizando uma análise comparativa com tumores menos diferenciados.

Uma outra explicação é que a dinâmica epigenética permite que células derivadas do mesmo genoma adotem múltiplos estados transcricionais. Essa plasticidade gera populações tumorais intrinsecamente heterogêneas, fenômeno amplamente documentado por Wilting e Dannenberg (10). A expressão de HDAC6 acompanha esse comportamento, como demonstram análises transcriptômicas de tumores humanos, que evidenciam ampla oscilação de seus níveis conforme o estágio, o grau de diferenciação e o microambiente inflamatório (34,35,37). Essa diversidade biológica pode explicar por que tumores podem apresentar aumento da enzima, enquanto outros exibem expressão reduzida ou irregular, especialmente os tumores pouco diferenciados. Essa diversidade nos leva a concluir que a HDAC6 pode desempenhar papel adaptativo nas fases iniciais, coerente com sua função de manter homeostase frente ao dano químico, e assumir padrões mais irregulares nas fases tardias.

5. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu concluir que a expressão da HDAC6 é dinâmica ao longo da carcinogênese oral experimental. O achado mais consistente foi o aumento significativo da imunomarcação de HDAC6 nas lesões displásicas em comparação com os CECs, que apresentaram expressão notavelmente reduzida. Este padrão sugere um papel potencialmente relevante da HDAC6 na fase pré-maligna do processo em modelo murino, possivelmente atuando em mecanismos de resposta adaptativa ao estresse e ao dano químico induzido pelos carcinógenos. A escassez de estudos prévios correlacionando diretamente a expressão dessa enzima com a sequência de progressão das lesões orais destaca a originalidade e a contribuição deste achado. A redução da marcação no CEC, em contraste com a alta expressão na displasia, abre um novo campo de investigação para entender os mecanismos epigenéticos que governam a transição entre esses estágios.

Embora tenham sido observadas tendências que apontam para uma modulação diferencial da expressão de HDAC6 pelo sexo biológico, é crucial destacar que estas variações não alcançaram significância estatística. Portanto, dentro dos limites deste modelo experimental, a influência desses fatores na regulação da HDAC6 permanece como uma observação preliminar que carece de confirmação em estudos futuros com maior poder amostral.

Em síntese, a HDAC6 demonstra um perfil de expressão alterado durante a carcinogênese oral, com um pico na fase displásica. Este resultado a posiciona como uma molécula de interesse para investigações futuras, visando elucidar seu papel exato na progressão do câncer bucal e sua viabilidade como um biomarcador para o risco de transformação maligna ou mesmo como um alvo para estratégias de intervenção precoce.

6. REFERÊNCIAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. janeiro de 2000;100(1):57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. março de 2011;144(5):646–74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
3. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. junho de 2018;125(6):582–90. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.011>
4. Van Der Waal I. Historical perspective and nomenclature of potentially malignant or potentially premalignant oral epithelial lesions with emphasis on leukoplakia—some suggestions for modifications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. junho de 2018;125(6):577–81. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.11.023>
5. Organisation mondiale de la santé, Centre international de recherche sur le cancer, organizadores. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: International agency for research on cancer; 2017. (World health organization classification of tumours; v. 9).
6. Warnakulasuriya S. Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. *Oral Oncol*. março de 2020;102:104550. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104550>
7. Rastogi V, Puri N, Mishra S, Arora S, Kaur G, Yadav L. An Insight to Oral Epithelial Dysplasia. *Int J Head Neck Surg*. 2013;4(2):74–82. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10001-1144>
8. Farsetti A, Illi B, Gaetano C. How epigenetics impacts on human diseases. *Eur J Intern Med*. agosto de 2023;114:15–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2023.05.036>
9. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell*. julho de 2012;150(1):12–27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
10. Wilting RH, Dannenberg JH. Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance. *Drug Resist Updat*. fevereiro de 2012;15(1–2):21–38.

<https://doi.org/10.1016/j.drup.2012.01.008>

11. Li B, Carey M, Workman JL. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. fevereiro de 2007;128(4):707–19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
12. Benedetti R, Conte M, Altucci L. Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We? *Antioxid Redox Signal*. julho de 2015;23(1):99–126. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5776>
13. Nazário WR, Costa ARGF, De Oliveira Santos D, Del Nero NRD, Rodrigues TS, Borges LDF, et al. Sex-Related Differences in Histone Acetylation and Tumor Development in a 4-Nitroquinoline 1-Oxide and Ethanol-Induced Oral Squamous Cell Carcinoma Mouse Model. *J Oral Pathol Med*. novembro de 2025;54(10):1074–84. <https://doi.org/10.1111/jop.70062>
14. Kaur S, Rajoria P, Chopra M. HDAC6: A unique HDAC family member as a cancer target. *Cell Oncol*. outubro de 2022;45(5):779–829. <https://doi.org/10.1007/s13402-022-00704-6>
15. Li T, Zhang C, Hassan S, Liu X, Song F, Chen K, et al. Histone deacetylase 6 in cancer. *J Hematol Oncol Hematol Oncol*. dezembro de 2018;11(1):111. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0654-9>
16. The 4-NQO mouse model: An update on a well-established in vivo model of oral carcinogenesis. Em: *Methods in Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2021 [citado 25 de novembro de 2025]. p. 197–229. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X20301783>. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2020.09.004>
17. Zigmundo GCDO, Schuch LF, Schmidt TR, Silveira FM, Martins MAT, Carrard VC, et al. 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO) induced oral carcinogenesis: A systematic literature review. *Pathol - Res Pract*. agosto de 2022;236:153970. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2022.153970>
18. Jiang S, Dong Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. *Curr Probl Cancer*. setembro de 2017;41(5):323–7. <https://doi.org/10.1016/j.currproblcancer.2017.02.006>

19. Guedes C do CFV, Santana RC, Leles AC. *Scientia Generalis*. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL: uma revisão de literatura. 2021;2(2):165–76. ISSN 2675-2999.

20. SELLÆG K, SCHWIENBACHER R, KRANZ M, *et al.* 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral epithelial lesions exhibit time- and stage-dependent changes in the tumor immune microenvironment. *Front Oncol*. 2024;14:1343839. doi:[10.3389/fonc.2024.1343839](https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1343839)

21. SANTOS DDO, COSTA ARGF, DUARTE PVS, *et al.* Depth of invasion of oral squamous cell carcinoma in Nos2-knockout mice correlated to alterations in systemic inflammatory markers following 4NQO treatment. *J Oral Pathology Medicine*. 2024;53(3):208-216. doi:[10.1111/jop.13523](https://doi.org/10.1111/jop.13523)

22. Nobrega T, Queiroz S, Santos E, Costa A, Pereira-Pinto L, De Souza L. Clinicopathological evaluation and survival of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. 2018;0–0. <https://doi.org/10.4317/medoral.22421>

23. Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol*. outubro de 2014;110(5):551–74. <https://doi.org/10.1002/jso.23724>

24. Tang XH, Knudsen B, Bemis D, Tickoo S, Gudas LJ. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1º de janeiro de 2004;10(1 Pt 1):301–13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-0999-3>

25. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. setembro de 1989;18(8):432–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1989.tb01339.x>

26. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, *et al.* Oral Squamous Cell Carcinoma: Histologic Risk Assessment, but Not Margin Status, Is Strongly Predictive of Local Disease-free and Overall Survival. *Am J Surg Pathol*. fevereiro de 2005;29(2):167. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000149687.90710.21>

27. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. julho de 2012;9(7):671–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

28. Costa ARGF, De Oliveira Santos D, Pereira IM, Rosa RB, De Castro EF, De Jesus IDO, et al. Comparative Analysis of 4NQO - and Ethanol-Induced Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma in Male and Female Mice: Association With Peripheral Blood Inflammatory Markers. *J Oral Pathol Med*. fevereiro de 2025;54(2):100–11. <https://doi.org/10.1111/jop.13602>

29. Li H, Jiang W, Liu S, Yang M, Chen S, Pan Y, et al. Connecting the mechanisms of tumor sex differences with cancer therapy. *Mol Cell Biochem*. fevereiro de 2024;479(2):213–31. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04723-1>

30. Guo Y, Wang X, Zhang X, Sun Z, Chen X. Ethanol Promotes Chemically Induced Oral Cancer in Mice through Activation of the 5-Lipoxygenase Pathway of Arachidonic Acid Metabolism. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2 de novembro de 2011;4(11):1863–72. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0206>

31. Weichert W. HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*. agosto de 2009;280(2):168–76. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.047>

32. Rubin JB, Abou-Antoun T, Ippolito JE, Llaci L, Marquez CT, Wong JP, et al. Epigenetic developmental mechanisms underlying sex differences in cancer. *J Clin Invest*. 1º de julho de 2024;134(13):e180071. <https://doi.org/10.1172/JCI180071>

33. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, et al. HDAC6 Expression Is Correlated with Better Survival in Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. 22 de outubro de 2004;10(20):6962–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0455>

34. Tseng CC, Huang SY, Tsai HP, Wu CW, Hsieh TH. HDAC6 is a prognostic biomarker that mediates IL-13 expression to regulate macrophage polarization through AP-1 in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 22 de junho de 2022;12:10513. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14052-w>

35. Pharmacological blockade of HDAC6 attenuates cancer progression by inhibiting IL-1 β and modulating immunosuppressive response in OSCC. *Int Immunopharmacol*. 10 de maio de 2024;132:111921. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2024.111921>

36. Chang I, Wang CY. Inhibition of HDAC6 Protein Enhances Bortezomib-induced Apoptosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) by Reducing Autophagy.

J Biol Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.717793>

37. Mahale A, Regula S, Chanchlani B, Ghosh B, Kulkarni OP. HDAC6 inhibition attenuates RIPK1/RIPK3/MLKL signalling and improves anti-tumor immune response in oral cancer. *Int Immunopharmacol.* 10 de dezembro de 2025;167:115634. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2025.115634>

7. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética na Utilização de Animais



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo do perfil de acetilação de histonas em modelo murino de carcinogênese lingual induzida por 4-nitroquinoleína-1-óxido e etanol**”, protocolo nº **020/21**, sob a responsabilidade de **Adriano Mota Loyola** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA)** da **UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**, em reunião **15 de outubro de 2021**.

(We certify that the project entitled “**Estudo do perfil de acetilação de histonas em modelo murino de carcinogênese lingual induzida por 4-nitroquinoleína-1-óxido e etanol**” protocol **020/21**, under the responsibility of **Adriano Mota Loyola** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for **ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA)** from **FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA**, in meeting of **october 15th, 2021**).

Vigência do Projeto	Inicio: 01/02/2022 Término: 01/02/2025
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico C57BL6/J
Número de animais	120
Peso / Idade	25 – 30 gramas/ 6 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	REBIR – UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR - UFU

Uberlândia, 18 de outubro de 2021.

Prof. Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais
Coordenador da CEUA
Portaria R N° 1114/2020