

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

MARIA LAURA MIRANDA SILVA

O PAPEL DA HISTONA DESACETILASE 2 EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ORAL

Uberlândia

2026

MARIA LAURA MIRANDA SILVA

O PAPEL DA HISTONA DESACETILASE 2 EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Coorientadora: Dra. Débora de Oliveira Santos

Uberlândia

2026

MARIA LAURA MIRANDA SILVA

O PAPEL DA HISTONA DESACETILASE 2 EM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Coorientadora: Dra. Débora de Oliveira Santos

Uberlândia, 11 de março de 2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso – (UFU)

Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki – (UFU)

Prof. Dr. Paulo Rogério de Faria – (UFU)

RESUMO

Evidências demonstram que alterações epigenéticas, incluindo as modificações de histonas, desempenham um papel determinante no desenvolvimento e progressão tumoral, influenciando a expressão de oncogenes e genes supressores tumorais. A acetilação de histonas, uma das principais modificações epigenéticas, é regulada pelas enzimas histona acetiltransferases (HAT) e histonas desacetilases (HDACs), e afeta diretamente a estrutura da cromatina e transcrição gênica. O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é um dos principais tipos de câncer de cabeça e pescoço e representa um importante problema de saúde pública e as modificações epigenéticas são importantes eventos durante sua carcinogênese e progressão tumoral. Sendo assim, o presente trabalho avaliou a expressão imuno-histoquímica da histona desacetilase-2 (HDAC2) em 85 amostras de pacientes com CCEO registrados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia de 2006 a 2013, segregados em casos sem metástases em linfonodos cervicais (PNM, $n = 39$) e casos metastáticos (PM, $n = 46$), comparados com 17 amostras de mucosa oral normal (MN), com a técnica de *tissue microarray*. Os resultados mostraram que a porcentagem de área nuclear marcada pela enzima foi significativamente maior em amostras de pacientes PNM comparados aos casos PM. A análise da curva ROC demonstrou capacidade discriminatória adequada entre PNM e PM utilizando essa enzima como parâmetro, embora não houve diferença na análise comparativa entre as amostras de CCEO e MN. Além disso, verificou-se maior expressão de HDAC2 em estágios iniciais e em amostras ≤ 4 cm. Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que a diminuição da expressão de HDAC2 pode ser um evento importante para a ocorrência de metástases em CCEO e, desse modo, considerado um potencial biomarcador prognóstico.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas oral; histona desacetilase-2; metástase; alterações epigenéticas; acetilação de histonas.

ABSTRACT

Evidence shows that epigenetic alterations, including histone modifications, play a decisive role in tumor development and progression, influencing the expression of oncogenes and tumor suppressor genes. Histone acetylation is one of the main epigenetic modifications, it is regulated by histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), and directly affects chromatin structure and gene transcription. Oral squamous cell carcinoma (CCEO) is one of the main types of head and neck cancer and represents an important public health problem and epigenetic modifications are important events during its carcinogenesis and tumor progression. Therefore, the present study evaluated the immunohistochemical expression of histone deacetylase-2 (HDAC2) in 85 samples from patients with OSCC registered at the Laboratório de Patologia Bucal of the Universidade Federal de Uberlândia from 2006 to 2013, segregated in samples from patients without cervical lymph node metastases (PNM, $n = 39$) when compared to metastatic cases (PM, $n = 46$) compared with 17 samples of normal oral mucosa (MN), with tissue microarray technique. The results showed that the percentage of nuclear area marked by the enzyme was significantly higher in samples from patients PNM compared to PM. The ROC curve analysis demonstrated adequate discriminatory capacity between PNM and PM using this enzyme as a parameter, although there was no difference in the comparative analysis between CCEO and MN samples. In addition, higher HDAC2 expression was observed in early stages and in samples ≤ 4 cm. The results found in this study suggest that decreased HDAC2 expression may be an important event for the occurrence of metastasis in SCC and, thus, considered a potential prognostic biomarker.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma; histone deacetylase-2; metastasis; epigenetic modifications; histone acetylation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 Carcinoma de Células Escamosas Oral.....	7
1.2 Epigenética e o papel da Histona desacetilase 2 no câncer	8
2. OBJETIVO GERAL	10
3. METODOLOGIA.....	10
3.1 Amostras.....	10
3.2 Microtissue Array (TMA).....	11
3.3 Imuno-histoquímica	12
3.4 Análise e avaliação das imagens.....	12
3.5 Estatística	12
4. RESULTADOS	13
4.1 Caracterização da amostra	13
4.2 Expressão imuno-histoquímica de HDAC2.....	14
5. DISCUSSÃO	18
6. CONCLUSÃO.....	19
APÊNDICE A – ANÁLISE QUANTITATIVA DAS IMAGENS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ.....	27
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	31

1. INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de Células Escamosas Oral

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é uma neoplasia que origina-se de populações de células epiteliais com capacidade proliferativa e de autorrenovação do epitélio escamoso estratificado da boca e da orofaringe, sendo a boca o sítio anatômico mais frequentemente acometido e, dentro dessa categoria, a língua a localização mais comum (Faria et al., 2003; Jham; Freire, 2021; Leemans; Snijders; Brakenhoff, 2018; Sánchez-Danés; Blanpain, 2018). Apesar da disponibilidade de tratamentos com potencial curativo, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, especialmente nos casos diagnosticados em estágios iniciais, uma parcela significativa dos CCEOs ainda é identificada tardiamente (Mody et al., 2021). O diagnóstico tardio está associado a elevadas taxas de mortalidade e redução significativa da sobrevida (Ariyanon et al., 2025). Além disso, em razão da localização anatômica, as lesões podem comprometer de forma permanente a funcionalidade e a estética das regiões afetadas nos pacientes sobreviventes (Rivera; Venegas, 2014).

No ano de 2022, os cânceres de lábio e boca figuraram entre os três tipos de cânceres mais prevalentes em países de baixo e médio desenvolvimento (Bray et al., 2024). Em 2023, ocorreram 7.172 óbitos por cânceres de boca no Brasil e estima-se que surjam 17.190 novos casos de câncer de boca por ano no triênio de 2026 a 2028, fazendo com que este seja considerado o sétimo tipo de câncer mais incidente, sem considerar o câncer de pele não melanoma (Brasil, INCA, 2026). O CCEO corresponde a mais de 95% dos casos de câncer de cabeça e pescoço (Munjal et al., 2020; Chen et al., 2008) e acomete principalmente homens, idosos e indivíduos de baixa condição socioeconômica (Barsouk et al., 2023).

Clinicamente, o CCEO é diversificado, de coloração vermelha, branca ou ambas e, inicialmente, as lesões podem ser assintomáticas ou discretamente dolorosas, podendo apresentar-se como crescimento exofítico papilar ou verrucoso ou como lesão endofítica de aspecto ulcerado ou não (Tan et al., 2023).

A carcinogênese do CCEO consiste no processo de transformação de células epiteliais normais em células malignas, decorrente do acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas nos queratinócitos. Além da predisposição genética individual, as células do epitélio da boca apresentam elevada suscetibilidade a fatores carcinogênicos associados ao estilo de vida, como o hábito de fumar, mascar ou inalar produtos derivados do tabaco, o consumo de álcool, infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e a exposição à radiação

ultravioleta (Badwelan et al., 2023; Chen et al., 2008; Lewandowska et al., 2019; Neves Neto, 2024; Stasiewicz; Karpiński, 2022). As mutações somáticas induzidas por esses fatores de risco podem culminar no desenvolvimento de lesões potencialmente malignas, geralmente precursoras do CCEO, caracterizadas histopatologicamente pela presença de displasia epitelial (Braun et al., 2025; Neves Neto, 2024).

Assim, o câncer configura-se como uma doença complexa e multifatorial, resultante da interação dinâmica entre alterações genéticas e epigenéticas, fatores ambientais, hábitos de vida e influências do microambiente tumoral. A progressão tumoral não depende exclusivamente de mutações somáticas, envolvendo também processos como reprogramação epigenética, inflamação crônica, plasticidade celular, senescência e interações com o microambiente, os quais favorecem a aquisição de características fundamentais para a malignidade (Hanahan, 2022). Os avanços na biologia molecular têm possibilitado a identificação de padrões anormais de expressão gênica e proteica em diferentes tipos de câncer, viabilizando o uso de biomarcadores no rastreamento da doença, na avaliação de risco, na compreensão da carcinogênese, na predição de recorrência, na detecção de invasão e metástase, bem como no prognóstico e no monitoramento da resposta terapêutica (Ghaderi et al., 2024; Sarhadi; Armengol, 2022).

1.2 Epigenética e o papel da Histona desacetilase 2 no câncer

O material genético é praticamente idêntico em todas as células do organismo e encontra-se armazenado de forma altamente compactada em longas 46 moléculas de DNA enovelada em proteínas, na estrutura conhecida como cromatina (Millán-Zambrano et al., 2022; Nacev et al., 2019). A organização da cromatina por meio do enovelamento do DNA permite que esse material permaneça condensado e estável em um espaço reduzido, ao mesmo tempo em que possibilita seu acesso quando necessário. Esse processo de compactação é viabilizado pelas proteínas histonas, que associam o DNA a sua menor unidade estrutural e funcional, o nucleossomo. O nucleossomo consiste em um octâmero de histonas — duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4 — em torno do qual a fita de DNA se enrola (Millán-Zambrano et al., 2022).

O termo epigenética descreve alterações herdáveis e modificáveis na expressão gênica, sem alterar a sequência do DNA. Essas alterações podem ocorrer por diferentes mecanismos, como modificações de histonas, metilação do DNA e ação de RNAs não codificantes, os microRNAs (Cazzato et al., 2024). Fisiologicamente, as modificações pós-traducionais de histonas (MPTH) — que incluem acetilação, desacetilação, metilação, ADP-ribosilação e

fosforilação, do material genético — envolvem complexas vias de sinalização e atividade enzimática que desempenham papel central na regulação da transcrição gênica, permitindo o controle da ativação ou repressão de genes e, conseqüentemente, da expressão genética. Dessa forma, é frequente que uma doença como o câncer apresente alterações na cromatina (Millán-Zambrano et al., 2022; Nacev et al., 2019; Zaib; Rana; Khan, 2022).

Diferentes tipos de vias de sinalização podem levar às MPTH e elas se interconectam. As vias de sinalização escritoras envolvem enzimas que catalisam algum tipo de modificação pós-traducional (MPT), as leitoras reconhecem uma MPT por meio de domínios específicos e a via apagadora que contém enzimas que removem MPT. As enzimas envolvidas nessas vias dependem de cofatores que expressam o estado metabólico celular. Resíduos de proteínas histonas localizados em ou perto de MPT, bem como as enzimas envolvidas nas vias de sinalização supracitadas, são mutados em alguns tipos de câncer e essa descoberta permite estudá-los como fatores oncogênicos (Millán-Zambrano et al., 2022; Nacev et al., 2019).

As histonas acetiltransferases (HAT) e as histonas desacetilases (HDAC) — que geralmente ativam e desativam a transcrição gênica, respectivamente —, são exemplos de enzimas modificadoras de histona. Ao retirar o grupo acetil-CoA da região N-terminal da cauda do resíduo de lisina, as HDACs, encontradas no núcleo celular, permitem que o DNA e as histonas se liguem fortemente, o que torna a cromatina condensada e reprime a transcrição gênica. Desse modo, as HDACs estão presentes em muitos processos fisiológicos, como metabolismo celular e envelhecimento, mas em doenças, como o câncer (Liu et al., 2023).

As HDACs são classificadas em quatro grupos de acordo com sua função e atividade catalítica: as classes I, II e IV possuem sítio ativo dependente de zinco, enquanto a classe III é dependente de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NAD). A HDAC2 pertence à classe I, classe esta que é bem estudada e interage com diversos fatores de transcrição. A HDAC2 pode regular a expressão de diversos genes e contribuir para o desenvolvimento de doenças, evidenciando seu papel tumorigênico e de marcador prognóstico para vários tipos de câncer (Jo et al., 2023).

A elevada expressão de HDAC2 foi observada em câncer de mama humano (Garpis et al., 2022), câncer de pulmão (Zheng et al., 2023), câncer gástrico (Shetty et al., 2021), melanoma uveal (Levidou et al., 2021) e câncer colorretal metastático humano (Jo et al., 2023). Ademais, a expressão de HDAC2 está relacionada com metástase de câncer de vesícula biliar (Feng; Zheng, 2025), de câncer pancreático (Kraub et al., 2021), de câncer de mama (Xu et al.,

2021). Em vários tipos de câncer, a inibição de HDAC pode ativar genes supressores do tumor (Shetty et al., 2021). Os inibidores de histona desacetilase (HDACi), classificados entre derivados de ácido hidroxâmico, benzamidas, peptídeos cíclicos, derivados de ácido carboxílico e cetonas, são drogas recentemente estudadas por apresentarem potencial como terapia oncológica que possuem formas químicas variadas e se adaptam à conformação das diferentes classes de histona, causando a hiperacetilação de proteínas histonas e não histonas levando a alterações epigenéticas no tumor, que pode levar à apoptose, parada do ciclo celular e senescência (Parveen; Harihar; Chatterji, 2023).

O CCEO é uma doença complexa e multifatorial que possui como fatores de risco para sua carcinogênese condições ambientais e hábitos de vida (Garcia Junior, 2020; Hanahan, 2022). As modificações epigenéticas são importantes para o seu desenvolvimento e progressão (Munshi et al., 2024), e, considerando que a acetilação de histonas é uma das principais modificações epigenéticas, evidencia-se a importância do estudo de enzimas modificadoras de histonas no CCEO.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou avaliar a expressão de HDAC2 em CCEO e mucosa normal, correlacionando dados demográficos e fatores clinicopatológicos.

3. METODOLOGIA

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

3.1 Amostras

As amostras selecionadas para o estudo incluíram 85 pacientes acometidos pelo CCEO, registrados no Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Uberlândia de 2006 a 2013 e que possuíam acompanhamento por, no mínimo, 2 anos, dados sociodemográficos, clinicopatológicos e de progressão da doença completos e disponibilidade de amostra biológica suficiente para realização dos ensaios imuno-histoquímicos. Do prontuário médico de cada paciente, foram coletadas as seguintes informações: idade, sexo, consumo de álcool, tabagismo, sintomatologia, histórico familiar de câncer, localização e tamanho do tumor, estadiamento da

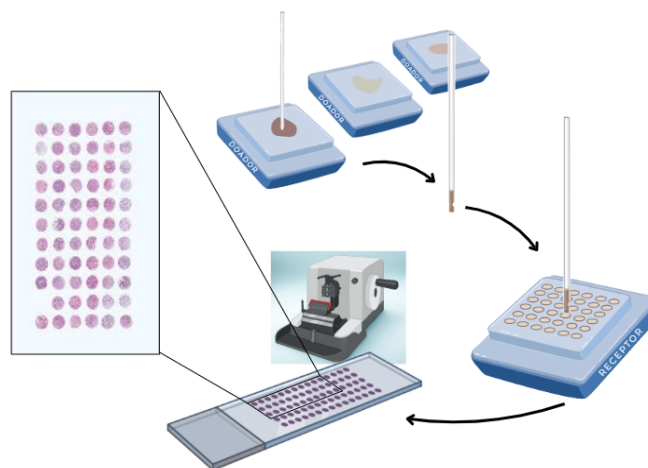
doença e evolução da doença, tipo de tratamento empregado, presença de recidivas, presença de metástase, e condição clínica na última consulta. As amostras de mucosa normal foram obtidas do arquivo do mesmo laboratório e compreendiam fragmentos de tecido epitelial sem alterações histopatológicas advindas de margens não comprometidas de CCEO (n=9) ou fragmentos de mucosa normal enviados ao Laboratório de Patologia Bucal para investigação de diagnóstico, mas sem qualquer alteração (n=6) ou doadas espontaneamente para o estudo (n=2).

A presença de metástase locorregional foi estabelecida por exame histopatológico dos linfonodos coletados durante o esvaziamento cervical. A confirmação de metástase foi usada para categorizar os pacientes com CCEO em dois grupos: aqueles com tumores primários não metastáticos (PNM) e primários metastáticos (PM).

3.2 Microtissue Array (TMA)

Para o estudo da expressão de HDAC2, realizou-se a técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais (*tissue microarray*- TMA). Para organização do TMA, duas áreas com maior quantidade de tecido tumoral foram selecionadas de acordo com as lâminas coradas em HE, coletadas com agulha de captura de 1mm de diâmetro e transferidas para bloco receptor a partir do qual foi realizada microtomia para obtenção de secções de 3 μ m de espessura que, finalmente, foram posicionados em lâminas silanizadas para o procedimento de imunohistoquímica (Figura 1).

FIGURA 1. Esquema da técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais indicando a inserção da agulha no bloco doador e a posterior inserção no bloco receptor



Fonte: AUTORA, 2026.

3.3 Imuno-histoquímica

O ensaio imuno-histoquímico foi realizado em cortes de 3 μm utilizando o sistema de polímero indireto ligado à peroxidase (*Horseradish Peroxidase- HRP*). Inicialmente, as lâminas foram submetidas à temperatura de 75°C por uma hora em estufa histológica, desparafinadas em xilol por uma hora e hidratadas em soluções de etanol em concentração decrescente (99,5%, 95%, 80%, 70%, cinco minutos em cada solução) . Realizou-se a remoção do pigmento formólico em solução de hidróxido de amônio e etanol 95% durante 10 minutos, seguida de recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) em panela de pressão a 100-110°C por 10 minutos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com 3,5% (v/v) de peróxido de hidrogênio (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha) durante 10 minutos, e então as lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4) e incubadas com bloqueador de proteínas inespecíficas contendo caseína a 0,4% em PBS (Leica Biosystems) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-HDAC2 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, 1:1000, policlonal) em câmara úmida a 4°C, durante 18 horas. A amplificação do sinal e a marcação seguiram o protocolo Novolink Polymer Detection Systems® (Leica Biosystems). Para revelação da reação, foi aplicado cromógeno 3,3'-tetrahidrocloroto de diaminobenzidina por 3 minutos, e por fim, as secções foram contra coradas com hematoxilina (Leica Biosystems) por oito minutos. Como controle positivo foi utilizada amostra de carcinoma de mama e os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário.

3.4 Análise e avaliação das imagens

Inicialmente, as lâminas submetidas às reações imuno-histoquímicas foram capturadas em microscópio óptico Eclipse E200 (Nikon, Tóquio, Japão) utilizando ampliação de 400x. Para cada amostra, cinco a dez campos histológicos foram fotografadas para análise, conforme a disponibilidade de material tumoral.

A análise quantitativa das imagens foi realizada usando o software ImageJ, versão 1.54g e descrita detalhadamente no Apêndice A.

3.5 Estatística

Os testes foram processados utilizando os softwares GraphPad Prism versão 10.6.1 e MedCalc Statistical Software versão 22.021, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. Para comparações entre três grupos independentes, foram utilizados testes não paramétricos Kruskal-Wallis para

comparação da distribuição dos dados em relação a mediana dos dados, com aplicação de teste pós-hoc de Dunn com correção Bonferroni para identificação das diferenças entre os grupos, para a comparação entre dois grupos utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Adicionalmente, a capacidade discriminatória entre PNM e PM utilizando a expressão de HDAC2 como parâmetro foi avaliada por meio de curva ROC, com determinação da área sob a curva (AUC), intervalo de confiança de 95%, ponto de corte pelo método de Youden, sensibilidade e especificidade.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

Os dados demográficos e clinicopatológicos estão descritos na Tabela 1. Dos 85 casos de CCEO analisados, 64 (75,3%) eram provenientes de pacientes do sexo masculino e 21 (24,7%) de pacientes do sexo feminino. A média de idade foi de 59 anos, com variação entre 34 e 99 anos. A maioria dos pacientes relatou histórico de tabagismo (90,6%) e consumo de álcool (80%). No momento do diagnóstico, 82,3% dos pacientes apresentavam sintomatologia relacionada à doença, 74,4% tinham mais de 3 meses de evolução e 71,8% foram diagnosticados com a doença já avançada. O sítio anatômico principal das lesões foi a língua (38,8%). A terapia trimodal foi o principal esquema de tratamento oncológico, adotado em 28 (32,9%) dos pacientes. No período de acompanhamento, a recorrência foi observada em 19 casos (22,4%) e 60% dos pacientes estavam vivos.

Das 17 amostras de mucosa normal, 10 (58,8%) eram do sexo masculino e o restante (41,2%) eram do sexo feminino. Os demais dados sociodemográficos e clinicopatológicos não foram coletados para esse grupo.

TABELA 1. Análise descritiva dos dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos 85 pacientes com CCEO

Variáveis		Pacientes (N=85)	PNM (N=39)	PM (N=46)
Sexo	Masculino	64 (75,3%)	27 (69,2%)	37 (80,4%)
	Feminino	21 (24,7%)	12 (30,8%)	9 (19,6%)
Idade	≤ 45 anos	12 (14,1%)	6 (15,4%)	6 (13,0%)
	> 45 anos	73 (85,9%)	33 (84,6%)	40 (87,0%)
Tabagista	Sim	77 (90,6%)	34 (87,2%)	43 (93,5%)
	Não	6 (7,1%)	3 (7,7%)	3 (6,5%)
	NI	2 (2,3%)	2 (5,1%)	0 (0%)
Etilismo	Sim	68 (80%)	30 (76,9%)	38 (82,6%)
	Não	15 (17,6%)	7 (18,0%)	8 (17,4%)
	NI	2 (2,4%)	2 (5,1%)	0 (0%)
	Sim	36 (42,3%)	15 (38,5%)	21 (45,7%)

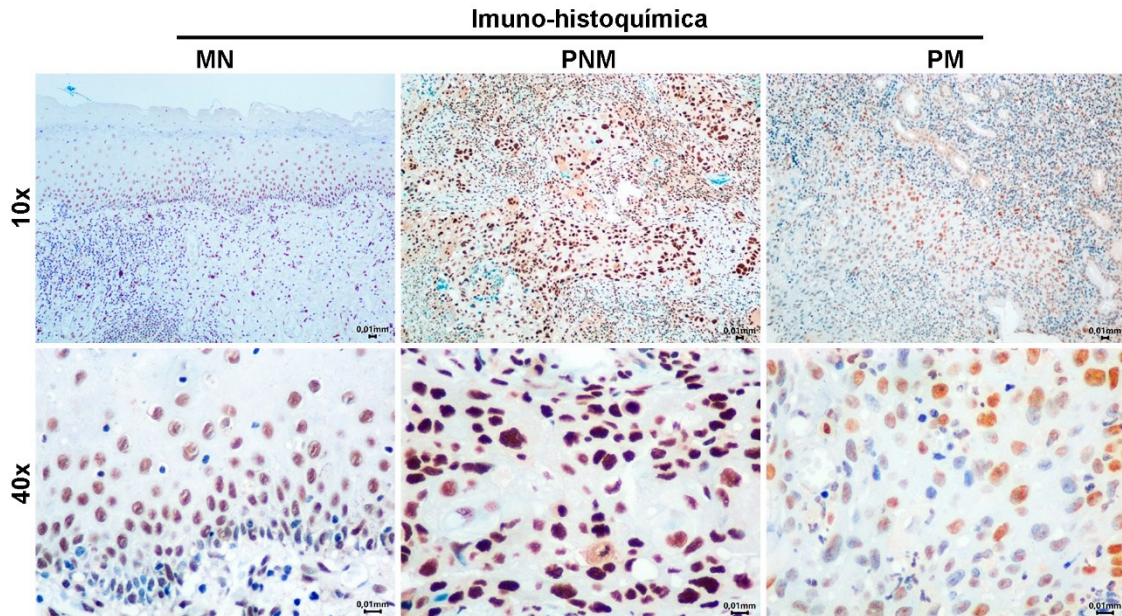
Histórico de câncer na família	Não	40 (47,1%)	17 (43,6%)	23 (50,0%)
	NI	9 (10,6%)	7 (17,9%)	2 (4,3%)
Sintomatologia	Presente	70 (82,3%)	29 (74,4%)	41 (89,1%)
	Ausente	11 (12,9%)	7 (17,9%)	4 (8,7%)
	NI	4 (4,7%)	3 (7,7%)	1 (2,2%)
Evolução	≤ 3 meses	19 (22,3%)	9 (23,0%)	10 (21,7%)
	> 3 meses	64 (75,3%)	29 (74,4%)	35 (76,1%)
	NI	2 (2,4%)	1 (2,6%)	1 (2,2%)
Localização	Língua	33 (38,8%)	14 (35,9%)	19 (41,3%)
	Assoalho bucal	24 (28,2%)	13 (33,3%)	11 (23,9%)
	Outro local	28 (33,0%)	12 (30,8%)	16 (34,8%)
Tamanho	≤ 4 cm	37 (43,5%)	20 (51,3%)	17 (37,0%)
	> 4 cm	34 (40,0%)	11 (28,2%)	23 (50,0%)
	NI	14 (16,5%)	8 (20,5%)	6 (13,0%)
Estágio clínico	Inicial	23 (27,1%)	19 (48,7%)	4 (8,7%)
	Avançado	61 (71,8%)	19 (48,7%)	42 (91,3%)
	NI	1 (1,1%)	1 (2,6%)	0 (0%)
Recidiva	Presente	19 (22,4%)	12 (30,8%)	7 (15,2%)
	Ausente	46 (54,1%)	17 (43,6%)	29 (63,1%)
	NI	20 (23,5%)	10 (25,6%)	10 (21,7%)
Tratamento	Cirurgia	10 (11,8%)	10 (25,6%)	0 (0%)
	Radioterapia	10 (11,8%)	3 (7,7%)	7 (15,2%)
	Cirurgia + radioterapia	11 (12,9%)	6 (15,4%)	5 (11,0%)
	Cirurgia + quimioterapia	1 (1,2%)	1 (2,6%)	0 (0%)
	Quimioterapia + radioterapia	21 (24,7%)	7 (17,9%)	14 (30,4%)
	Trimodal	28 (32,9%)	10 (25,5%)	18 (39,1%)
	NI	4 (4,7%)	2 (5,1%)	2 (4,3%)
Condição clínica	Vivo com doença	22 (25,9%)	11 (28,2%)	11 (23,9%)
	Vivo sem doença	29 (34,1%)	18 (46,2%)	11 (23,9%)
	Óbito	34 (40,0%)	10 (25,6%)	24 (52,2%)

NI: não informado; PNM, grupo primário não metastático; PM, grupo primário metastático
 Fonte: dados da pesquisa.

4.2 Expressão imuno-histoquímica de HDAC2

Imagens representativas da expressão imuno-histoquímica de HDAC2 podem ser observadas na Figura 2. Nas amostras de mucosa normal, a marcação foi nuclear e a intensidade das células marcadas foi homogênea e predominante na camada basal, parabasal e intermediária do tecido epitelial. Já nos casos de CCEO, a imunomarcação foi predominantemente nuclear e a intensidade de marcação nuclear foi heterogênea.

FIGURA 2. Expressão imuno-histoquímica de HDAC2 em mucosa normal (MN), tumor primário não metastático (PNM), tumor primário metastático (PM). Aumento de 100 e 400x.



Fonte: dados da pesquisa.

Os resultados da expressão de HDAC2 de acordo com os fatores clinicopatológicos foram descritos na Tabela 2. Observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0202$) na porcentagem de área nuclear marcada por HDAC2 em relação ao tamanho (≤ 4 cm ou > 4 cm), sendo maior (mediana = 87,40%) em pacientes com lesões menores ou iguais a de 4 cm. De forma similar, observou-se significância ($p=0,0250$) nos casos de estadiamento clínico inicial (mediana= 87,70 %) quando comparados com o estágio avançado da doença (mediana = 79,40%).

TABELA 2. A mediana da expressão de HDAC2 de acordo com fatores clinicopatológicos dos 85 pacientes acometidos por CCEO

Variáveis (n*)		HDAC2 (m ¹)	Valor de p**
Sexo	Masculino (64)	83,80	0,4400 A
	Feminino (21)	82,10	
Idade	≤ 45 anos (12)	72,65	0,1603 A
	> 45 anos (73)	84,10	
Tabagismo	Sim (77)	83,50	0,3535 A
	Não (6)	77,45	
Etilismo	Sim (68)	83,65	0,4197A

	Não (15)	82,10	
Histórico de câncer na família	Sim (36)	78,10	0,6508A
	Não (40)	83,65	
Sintomas	Presente (70)	81,80	0,0908 A
	Ausente (11)	88,40	
Evolução	≤ 3 meses (19)	76,80	0,4367 A
	>3 meses (64)	84,10	
Localização	Língua (33)	87,40	0,1756 B
	Assoalho bucal (24)	85,75	
	Outra (28)	77,55	
Tamanho	≤ 4 cm (37)	87,40	0,0202 A
	> 4 cm (34)	73,10	
Estadiamento clínico	Inicial (23)	87,70	0,0250 A
	Avançado (61)	79,40	
Recidiva	Presente (19)	85,80	0,7180 A
	Ausente (46)	82,95	
Desfecho	Vivo (51)	84,20	0,3657A
	Óbito (34)	81,80	

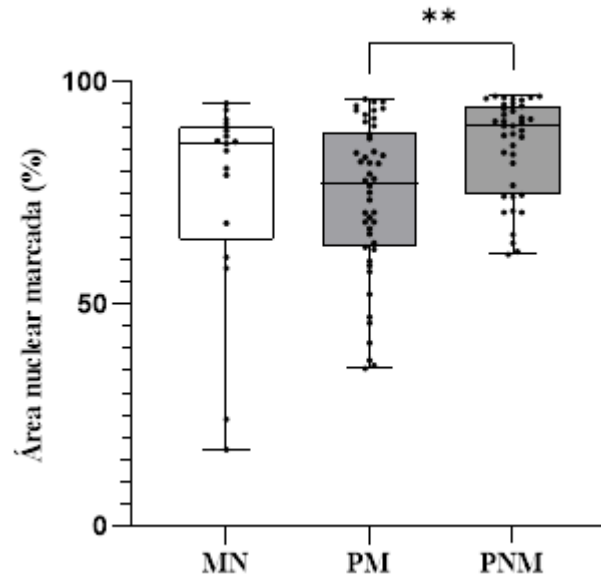
* - Corresponde aos casos em que a informação necessária para a categorização estava disponível.

** - (A) Teste de Mann-Whitney; (B) Teste de Kruskal-Wallis; 1 - número (mediana);

Fonte: dados da pesquisa.

Quanto aos grupos de interesse, todas as amostras de mucosa normal apresentaram imunorreatividade nuclear para HDAC2, com mediana de 86,20% de área nuclear marcada. Nos casos de CCEO, também todas as amostras apresentaram positividade nuclear para HDAC2, com mediana de 83,5%. Quando consideramos os casos PM e PNM, a mediana de porcentagem de marcação foi, respectivamente, 77,30% e 90,20%. Foi identificada diferença estatisticamente significativa ($p=0,0029$) entre os grupos PNM e PM, conforme se observa na Figura 3.

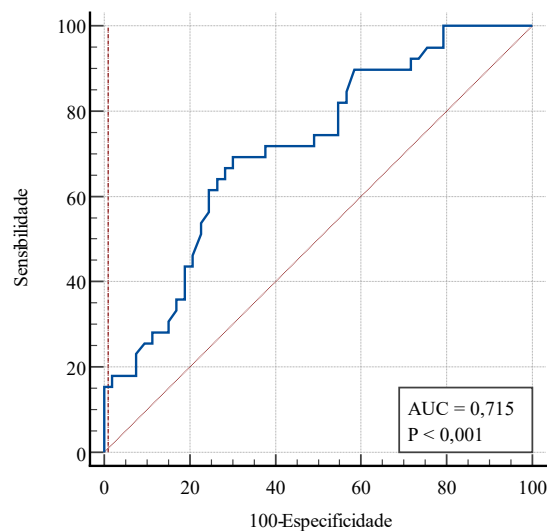
FIGURA 3. Expressão de HDAC2 em mucosa normal (MN), tumor primário metastático e tumor primário não metastático.



Fonte: dados da pesquisa. Legenda: Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. **p=0,0029

A análise da curva ROC indicou capacidade discriminatória adequada entre PNM e PM utilizando a expressão de HDAC2 como parâmetro (Figura 4), com AUC de 0,715 ($p < 0,001$, Youden index $J = 0,3904$, sensibilidade=69,23%, especificidade=69,81%).

FIGURA 4. A análise da curva ROC para discriminação de PM e PNM



Fonte: dados da pesquisa. Legenda: Foi utilizado como parâmetro a expressão de HDAC2. AUC = 0,715, $p < 0,001$.

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a expressão de HDAC2 em amostras de mucosa normal e em CCEO por técnica imuno-histoquímica e análise quantitativa de área nuclear marcada. Os resultados demonstraram que não há diferença significativa na imunomarcação da enzima entre os dois grupos. Contudo, a análise comparativa entre casos de CCEO que apresentaram ou não metástase em linfonodos cervicais evidenciou uma maior expressão dessa enzima nos casos não metastáticos. Desse modo, os resultados sugerem que a HDAC2 pode não estar relacionada aos eventos iniciais da transformação maligna, mas à progressão tumoral e aquisição de caráter metastático.

Estudo prévio de nosso laboratório avaliou o mesmo grupo de pacientes com base na presença e ausência de metástases em linfonodos cervicais, e foi encontrada uma associação significativa entre o tamanho do tumor, estágio clínico e o tempo de seguimento (Matsuo et al., 2018). O presente estudo avaliou um número menor de casos (n=85) do que o reportado anteriormente (n=90), devido à perda de cinco amostras durante os experimentos.

Alterações no funcionamento da HDAC2 podem levar ao silenciamento de genes supressores tumorais, como a p53, e já foi demonstrado que em diferentes tipos de câncer, o tratamento com inibidores de HDAC2 podem reativar a expressão de genes supressores de tumor responsáveis por apoptose, parada do ciclo celular e inibição de angiogênese e metástase (Shetty et al., 2021). Estudos prévios demonstraram o aumento da expressão de HDAC2 em diferentes neoplasias, incluindo câncer de mama (Garpis et al., 2022), câncer de pulmão (Zheng et al., 2023), câncer gástrico (Mutze et al., 2010) e CCEO (Krishna et al., 2020).

Alguns estudos já demonstraram que o aumento da expressão de HDAC2 está relacionado com a ocorrência de metástases em diferentes tipos de câncer, como câncer pancreático (Kraub et al., 2021) e câncer colorretal (Qi et al., 2021), paradoxalmente, outros trabalhos relatam efeito oposto. Hu et al. (2020), demonstraram uma menor expressão de HDAC2 em lesões primárias de câncer colorretal quando comparados com tecidos metastáticos e uma menor expressão da enzima também foi correlacionada com pior prognóstico em pacientes com esse tipo de câncer. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão de HDAC2 e E-caderina. No mesmo trabalho, experimentos *in vivo*, utilizando camundongos nocautes para HDAC2, demonstrou que a perda da expressão do gene leva a um aumento de metástases colorretais. No presente trabalho, assim como no artigo anteriormente citado, a expressão de HDAC2 foi menor em tumores metastáticos quando comparados a tumores não metastáticos (Figura 3), reforçando que o papel dessa enzima na progressão tumoral e ocorrência de metástase ainda precisa ser elucidado.

O papel da HDAC2 no desenvolvimento de metástase é complexo e multifatorial, envolvendo mecanismos como a modulação de E-caderina (Von Burstin et al., 2009), um marcador negativo de transição epitélio-mesenquimal e metástases, regulação de metaloproteinases de matriz (MMPs), responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular (Wang et al., 2013), regulação de fatores de crescimento (Kiweler et al., 2018) e modificação de histonas (Edwards et al., 2021).

O desempenho diagnóstico de um teste ou a sua precisão para discriminar casos patológicos de casos normais ou, como no resultado do presente estudo, na identificação de casos potencialmente mais agressivos, pode ser avaliado usando a análise da curva ROC. Neste trabalho, uma vez que os grupos metastático e não metastático apresentaram diferença estatística na porcentagem de área nuclear marcada para HDAC2, nós utilizamos esta análise como parâmetro para discriminar PM e PNM (Figura 4). A análise por curva ROC demonstrou capacidade discriminatória adequada, indicando potencial de aplicabilidade como biomarcador auxiliar de prognóstico. Entretanto, o valor de AUC não configura excelente, sugerindo que este seja utilizado associado a outros biomarcadores em CCEO.

A correlação de expressão da enzima e parâmetros clinicopatológicos indicou também diferença significativa que corresponde à menor expressão de HDAC2 em tumores maiores que 4 cm e em estadiamento clínico avançado (Tabela 2). Em contraste aos achados do nosso trabalho, Krishna et al., (2020) demonstrou que a expressão de HDAC2 foi maior em CCEO e lesão pré-maligna do que em mucosa normal e, ao comparar as lesões, a expressão foi significativamente maior em CCEO do que em lesões pré-malignas. Além disso, a maior expressão de HDAC2 está correlacionada com a menor sobrevida dos pacientes.

Entre as limitações do estudo, pode-se citar que o número amostral, principalmente das amostras de mucosa normal, possa não representar a população. Ademais, não foi possível acompanhar o seguimento dos pacientes desde a última pesquisa com essa população.

Apesar das limitações, os resultados sugerem que a HDAC2 desempenha papel relevante no CCEO, principalmente na sua distinção entre tumores metastáticos e não metastáticos. A integração dessa enzima a outros marcadores epigenéticos moleculares poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias prognósticas mais precisas.

6. CONCLUSÃO

Em suma, a análise quantitativa, por meio da análise de porcentagem de área nuclear marcada de HDAC2, demonstrou que não há diferença significativa na expressão dessa enzima entre mucosa normal e CCEO. Entretanto, a análise comparativa entre casos que apresentaram

metástase em linfonodos cervicais e casos que não apresentaram metástase demonstrou diferenças significativas e atestou que os casos com metástase expressam menos HDAC2, sugerindo que a enzima está associada a estágios iniciais da carcinogênese do CCEO. Desse modo, esses resultados apontam que a expressão da enzima pode ser utilizada como biomarcador de prognóstico na progressão tumoral, se associada a outros biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIYANON, Tapanut et al. Survival outcomes of surgically treated oral cavity squamous cell carcinoma patients at tertiary care hospital in Northern Thailand. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, [S.l.], v. 126, n. 3, p. 102166, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2024.102166>

BADWELAN, Mohammed et al. Oral squamous cell carcinoma and concomitant primary tumors: what do we know? A review of the literature. **Current Oncology**, [S.l.], v. 30, n. 4, p. 3721–3734, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/curroncol30040283>.

BARSOUK, Adam et al. Epidemiology, risk factors, and prevention of head and neck squamous cell carcinoma. **Medical Sciences**, [S.l.], v. 11, n. 2, p. 42, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/medsci11020042>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2026: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2026.

BRAUN, Timothy et al. Diagnostic, prognostic, and metastatic value of chemokines as biomarkers for oral squamous cell carcinoma and their precursor lesions: a systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [S.l.], v. 211, p. 104738, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2025.104738>.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Hoboken, v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.

CAZZATO, Gerardo et al. Epigenetics and control of tumor angiogenesis in melanoma: an update with therapeutic implications. **Cancers**, [S.l.], v. 16, n. 16, p. 2843, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers16162843>.

CHEN, Yin-Ju et al. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. **Cancer Science**, [S.l.], v. 99, n. 8, p. 1507–1514, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00863.x>.

EDWARDS, C. M.; JOHNSON, R. W. Targeting histone modifications in bone and lung metastatic cancers. *Current Osteoporosis Reports*, [S.l.], v. 19, n. 3, p. 230–246, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11914-021-00670-2>.

FARIA, Paulo Rogério de et al. Clinical presentation of patients with oral squamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital in Brazil. **Clinical Oral Investigations**, [S.l.], v. 7, n. 1, p. 46–51, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00784-002-0181-4>.

FENG, Ji; ZHENG, Xueyong. Histone deacetylase 2 stabilizes SPARC-related modular calcium binding 2 to promote metastasis and stemness in gallbladder cancer. **Current Molecular Medicine**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 56–68, 2025. DOI: <https://doi.org/10.2174/0115665240257970231013094101>.

GARCIA JUNIOR, Marcelo Augusto. **Modificações pós-traducionais das histonas H3S10ph, H3K9ac e H4K12ac associadas às enzimas Aurora B e GCN5 em carcinoma de células escamosas bucal**. 2020. Dissertação (Mestrado em Odontologia Integrada) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

GARMPIS, Nikolaos et al. Clinical significance of the histone deacetylase 2 (HDAC-2) expression in human breast cancer. **Journal of Personalized Medicine**, [S.l.], v. 12, n. 10, p. 1672, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/jpm12101672>.

GHADERI, Hamid et al. Oral squamous cell carcinoma: focus on biomarkers for screening. **Journal of Dentistry**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 1–16, 2024. DOI: <https://doi.org/10.30476/dentjods.2023.96159.1924>.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

HU, X. T. et al. HDAC2 inhibits EMT-mediated cancer metastasis by downregulating the long noncoding RNA H19 in colorectal cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, [S.l.], v. 39, n. 1, p. 270, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01783-9>

JHAM, Bruno C.; FREIRE, Adriana R. S. **Sequelas orais pós-radioterapia em pacientes tratados por tumores de cabeça e pescoço.** *Archives of Health Investigation*, [S.l.], v. 10, n. 6, p. 981–985, 2021. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v10i6.5050>

JO, Hyein et al. HDAC2 as a target for developing anti-cancer drugs. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [S.l.], v. 21, p. 2048–2057, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.03.016>.

KIWELER, N. et al. The histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 are required for the growth and survival of renal carcinoma cells. *Archives of Toxicology*, [S.l.], v. 92, n. 7, p. 2227–2243, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2229-5>.

KRAUß, Lukas et al. HDAC2 facilitates pancreatic cancer metastasis. **Cancer Research**, [S.l.], v. 82, n. 4, p. 695–707, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3209>.

KRISHNA, Akhilesh et al. Upregulated histone deacetylase 2 gene correlates with the progression of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Biomarkers**, [S.l.], v. 29, n. 4, p. 543–552, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3233/CBM-190729>.

LEEMANS, C. René; SNIJDERS, Peter J. F.; BRAKENHOFF, Ruud H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, [S.l.], v. 18, n. 5, p. 269–282, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11>.

LEVIDOU, Georgia et al. Histone deacetylase (HDAC)-1, -2, -4, and -6 in uveal melanomas: associations with clinicopathological parameters and patients' survival. **Cancers**, [S.l.], v. 13, n. 19, p. 4763, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13194763>.

LEWANDOWSKA, Anna et al. Environmental risk factors for cancer: review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [S.l.], v. 26, n. 1, p. 1–7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>.

LIU, R. et al. Post-translational modifications of histones: mechanisms, biological functions, and therapeutic targets. **MedComm**, [S.l.], v. 4, n. 3, p. e292, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/mco2.292>.

MATSUO, Flávia Sayuri et al. Pathologic significance of AKT, mTOR, and GSK3 β proteins in oral squamous cell carcinoma-affected patients. **Virchows Archiv**, [S.l.], v. 472, n. 6, p. 983–997, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2318-0>.

MILLÁN-ZAMBRANO, Gonzalo et al. Histone post-translational modifications: cause and consequence of genome function. **Nature Reviews Genetics**, [S.l.], v. 23, n. 9, p. 563–580, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00468-7>.

MODY, Mayur D. et al. Head and neck cancer. **The Lancet**, [S.l.], v. 398, n. 10318, p. 2289–2299, 2021. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01550-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01550-6)

MUNJAL, Manish et al. Epidemiology of head and neck neoplasms: a review. **International Journal of Community Medicine and Public Health**, [S.l.], v. 7, n. 11, p. 4639, 2020. DOI: <https://doi.org/10.18203/2394-6040.ijcmph20204767>.

MUNSHI, Maha Assad et al. Genetic and environmental factors in susceptibility to oral diseases. **Journal of Healthcare Sciences**, [S.l.], v. 4, n. 11, p. 616–621, 2024. DOI: <https://doi.org/10.52533/johs.2024.41109>.

MUTZE, Kathrin et al. Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 expression and chemotherapy in gastric cancer. **Annals of Surgical Oncology**, [S.l.], v. 17, n. 12, p. 3336–3343, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1182-1>

NACEV, Benjamin A. et al. The expanding landscape of “oncohistone” mutations in human cancers. **Nature**, [S.l.], v. 567, n. 7749, p. 473–478, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1038-1>.

NEVES NETO, Belmiro Ferreira. **Análise do microambiente tumoral em câncer de boca associado e não associado ao papiloma vírus humano (HPV)**. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Jataí, Jataí, 2024.

PARVEEN, Roza; HARIHAR, Divya; CHATTERJI, Biswa Prasun. Recent histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. **Cancer**, [S.l.], v. 129, n. 21, p. 3372–3380, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.34974>.

- QI, Z. P. et al. HDAC2 promotes the EMT of colorectal cancer cells via the modular scaffold function of ENSG00000274093.1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, [S.l.], v. 25, n. 2, p. 1190–1197, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.16186>.
- RIVERA, César; VENEGAS, Bernardo. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (review). *Oncology Letters*, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 7–11, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2103>
- SÁNCHEZ-DANÉS, Adriana; BLANPAIN, Cédric. Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nature Reviews Cancer*, [S.l.], v. 18, n. 9, p. 549–561, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0024-5>.
- SARHADI, Virinder Kaur; ARMENGOL, Gemma. Molecular biomarkers in cancer. *Biomolecules*, [S.l.], v. 12, n. 8, p. 1021, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12081021>.
- SHETTY, Manasa Gangadhar et al. Histone deacetylase 2 selective inhibitors: a versatile therapeutic strategy as next generation drug target in cancer therapy. *Pharmacological Research*, [S.l.], v. 170, p. 105695, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105695>.
- STASIEWICZ, Mark; KARPIŃSKI, Tomasz M. The oral microbiota and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, [S.l.], v. 86, p. 633–642, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.11.002>.
- TAN, Yunhan et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *International Journal of Oral Science*, [S.l.], v. 15, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41368-023-00249-w>.
- VON BURSTIN, J. et al. E-cadherin regulates metastasis of pancreatic cancer in vivo and is suppressed by a SNAIL/HDAC1/HDAC2 repressor complex. *Gastroenterology*, [S.l.], v. 137, n. 1, p. 361–371.e5, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.04.004>.
- WANG, F. et al. HDAC inhibitor trichostatin A suppresses esophageal squamous cell carcinoma metastasis through HDAC2-reduced MMP-2/9. *Clinical and Investigative Medicine*, [S.l.], v. 36, n. 2, p. E87–E94, 2013. DOI: <https://doi.org/10.25011/cim.v36i2.19571>.

XU, Pengfei et al. Histone deacetylase 2 knockout suppresses immune escape of triple-negative breast cancer cells via downregulating PD-L1 expression. **Cell Death & Disease**, [S.l.], v. 12, n. 8, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04047-2>.

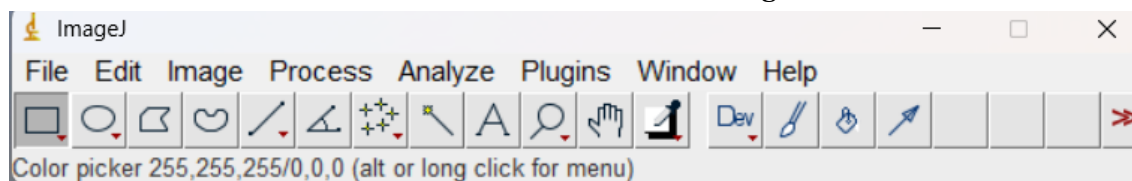
ZAIB, Sumera; RANA, Nehal; KHAN, Imtiaz. Histone modifications and their role in epigenetics of cancer. **Current Medicinal Chemistry**, [S.l.], v. 29, n. 14, p. 2399–2411, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867328666211108105214>.

ZHENG, Xiang et al. The HDAC2-SP1 axis orchestrates protumor macrophage polarization. **Cancer Research**, [S.l.], v. 83, n. 14, p. 2345–2357, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-1270>.

APÊNDICE A – ANÁLISE QUANTITATIVA DAS IMAGENS UTILIZANDO O SOFTWARE IMAGEJ

Inicialmente, abriu-se a tela inicial do software (Figura 1) e imagem de interesse de quantificação da imunomarcagem (Figura 2) e realizou-se a separação dos canais RGB das imagens para selecionar o canal de cor que melhor representa as áreas nucleares e apresenta menos artefatos. O canal escolhido foi o azul. Para isso, selecionou-se a imagem e a opção *Image > Color > Split Channels* (Figura 3). Em sequência, a área nuclear total foi selecionada no canal azul através da ferramenta *Image > Adjust > Threshold* e convertida em uma seleção com a ferramenta *Edit > Selection > Create Selection > Add to ROI Manager* (Figura 4). Posteriormente, utilizou-se o plugin Colour Deconvolution 2 (Figura 5) para separar os vetores de hematoxilina e DAB da imagem original, selecionou-se novamente a área nuclear marcada com DAB através da ferramenta *Threshold* (Figura 6). A seleção da área nuclear total criada no vetor azul foi então aplicada à imagem de DAB, sendo calculado o percentual de área nuclear marcada através da opção *Measure* do ROI Manager (Figura 7). Por último, foi obtida a média da área nuclear marcada dos casos a partir das fotomicrografias individuais (Figura 8).

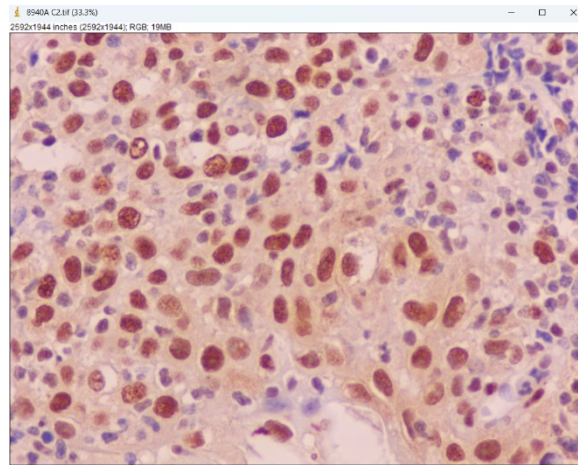
FIGURA 1. Tela inicial do *ImageJ*



Fonte: AUTORA, 2026.

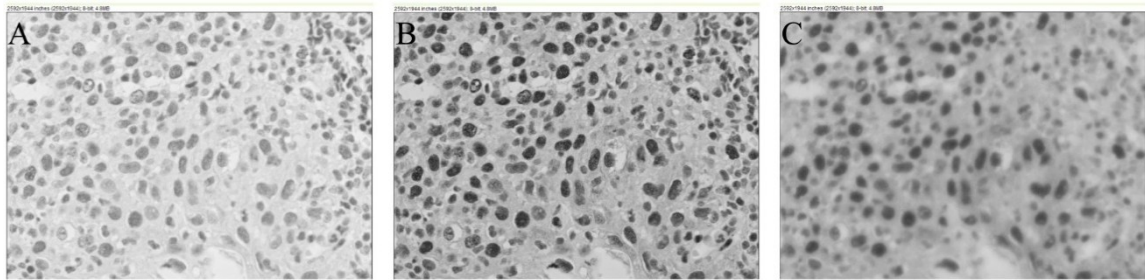
Após carregar as imagens de interesse para análise quantitativa da expressão de HDAC2 (Figura 2), é necessário separar a imagem original em canais RGB — que são os três componentes básicos da cor: vermelho, verde e azul — para selecionar o canal de cor que melhor representa a área nuclear e que mostre poucos artefatos e os grânulos de queratina presentes no CCEO.

FIGURA 2. Imagem para quantificar imunomarcção



Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026.

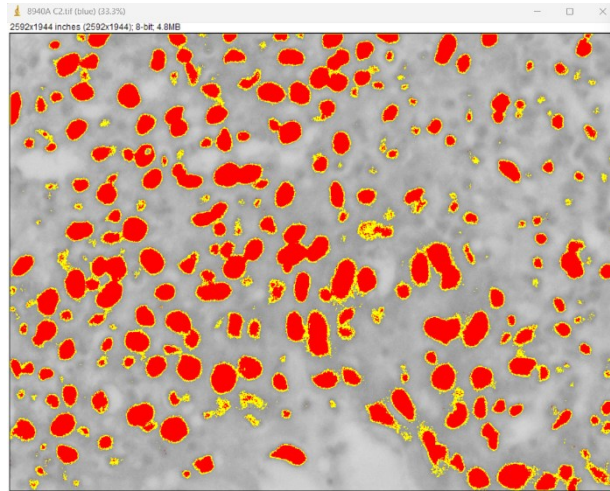
FIGURA 3. Imagem separada entre os canais vermelho (A), verde (B) e azul (C)



Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026.

Após escolher a imagem cujo canal de cores melhor representa as áreas nucleares, cria-se a seleção da área nuclear sobre essa imagem, para que seja possível avaliar a marcação de DAB dentro da área nuclear.

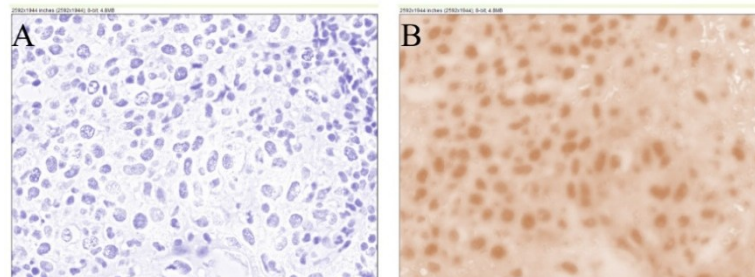
FIGURA 4. Linha amarela contornando os núcleos celulares



Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026.

Ademais, procedeu-se a deconvolução da imagem utilizando o *plugin Colour deconvolution*, optando pelo vetor HDAB que separa a coloração da imagem em três: coloração do DAB, coloração da hematoxilina e o branco e/ou imagem residual

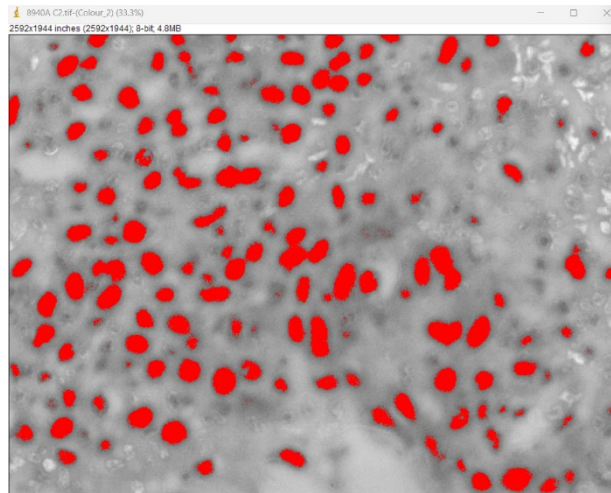
FIGURA 5. Deconvolução da imagem em hematoxilina (A) e DAB (B)



Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026.

É necessário colocar a imagem de DAB manualmente em 8 bit e selecionar toda a área marcada pelo DAB utilizando a ferramenta *threshold*.

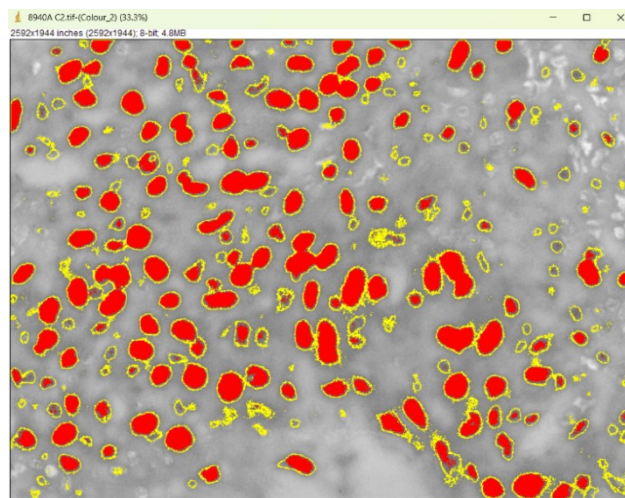
FIGURA 6. Seleção da área de marcação do DAB



Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026.

Por último, reposicionou-se a seleção da área nuclear criada a partir da imagem que teve o canal RGB separado por cima da imagem de área de marcação do DAB e obtém-se a porcentagem de área nuclear marcada pelo DAB.

FIGURA 7. Representação da área marcada pelo DAB em vermelho e a área nuclear total contornada em amarelo



Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026.

FIGURA 8. Resultado em porcentagem da marcação de DAB em relação à área nuclear total

Results			
File	Edit	Font	Results
	Area	%Area	
1	996110	59.524	

Fonte: A autora no Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade Federal de Uberlândia, 2026

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: ADRIANO MOTA LOYOLA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60858016.1.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.001.481

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: As modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas. Evidências recentes sugerem a participação de componentes epigenéticos também em lesões cancerizáveis. Esse estudo foi desenvolvido para analisar as alterações epigenéticas associadas à carcinogênese humana na região bucomaxilofacial. Padrões dessas alterações têm sido observados em amostras dessas neoplasias. A identificação e caracterização desses distintos padrões se faz essencial para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes e efetivas, além de proporcionar a tentativa de explicar a etiopatogenia, e detectar possíveis influências das mesmas no comportamento desses tumores. Até recentemente, o sequenciamento de DNA para identificar mutações genéticas em neoplasias era impraticável e caro. Os recentes avanços tecnológicos nesse processo, como a criação do método de sequenciamento de última geração, baseada no uso de semicondutores Ion Proton, otimizou o custo e o tempo do sequenciamento, além de oferecer resultados mais confiáveis.

Usando o Ion Proton, os pesquisadores sequenciarão genes mais comumente relacionados às alterações em histonas, buscando identificar o papel dessas alterações epigenéticas em amostras de tumores benignos e malignos de glândula salivar (adenomas, carcinomas e adenocarcinomas), carcinomas de mucosa bucal, tumores benignos e malignos odontogênicos e lesões cancerizáveis

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144

UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.864.897, de 05 de Dezembro de 2016, foram atendidas.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

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

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

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

• O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_804983.pdf	14/12/2016 20:23:48		Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1864897.pdf	14/12/2016 20:23:12	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Respostas_pendencias_CEP.pdf	14/12/2016 20:22:32	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	14/12/2016 20:18:20	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	14/12/2016 20:17:07	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	07/10/2016 11:31:04	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito
Outros	Questionario.pdf	06/10/2016 13:03:59	ADRIANO MOTA LOYOLA	Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br



Continuação do Parecer: 2.001.481

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 05 de Abril de 2017

Assinado por:

**Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)**

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br