

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/02/2022.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila de Oliveira Barbeiro

Análise da acetilação de histona H3 e sua contribuição para a instabilidade genômica na leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila de Oliveira Barbeiro

Análise da acetilação de histona H3 e sua contribuição para a instabilidade genômica na leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Área de Diagnóstico e Cirurgia

Orientadora: Profa. Dra. Andreia Bufalino
Coorientadora: Profa. Dra Luciana Yamamoto de Almeida

Araraquara

2020

Barbeiro, Camila de Oliveira

Análise da acetilação de histona H3 e sua contribuição para a instabilidade genômica na leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa / Camila de Oliveira Barbeiro. -- Araraquara: [s.n.], 2020
82 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) –
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientadora: Profa. Dra. Andreia Bufalino
Coorientadora: Profa. Dra Luciana Yamamoto de Almeida

1. Leucoplasia oral 2. Histonas 3. Acetilação I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Camila de Oliveira Barbeiro

Análise da acetilação de histona H3 e sua contribuição para a instabilidade genômica na leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Diagnóstico e Cirurgia

Andreia Bufalino

Morgana Stabilli Guimarães

Rose Mara Ortega

Araraquara, 19 de fevereiro de 2020.

DADOS CURRICULARES

Camila de Oliveira Barbeiro

NASCIMENTO: 01/11/1991 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Andréa Gouvêa de Oliveira
Roberto Henrique Barbeiro

2011-2016: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

2013-2014: Iniciação Científica no Departamento de Odontologia Social - Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

2016-2016: Extensão Universitária em Laserterapia para pacientes com doenças bucais e complicações oncológicas junto ao departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

2017-2018: Aperfeiçoamento em Estomatologia pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP e pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SES-SP).

2018-2020: Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas na área de Diagnóstico e Cirurgia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

Dedico esta dissertação primeiramente à Deus, por ter me abençoado com essa conquista e por ter me dado forças para superar as dificuldades que surgiram durante o meu percurso.

Aos meus pais, Andréa Gouvêa de Oliveira e Roberto Henrique Barbeiro por serem os responsáveis por eu ter chegado onde eu cheguei, pelos caminhos que trilhei, pela criação que me deram e por sempre terem me apoiado e me incentivado a estar onde eu estou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que me deu a oportunidade de continuar meus estudos, agora na pós-graduação, de uma das melhores Universidades de Odontologia. Me deu forças para superar as dificuldades e foi a quem eu sempre busquei e me apoiei para conseguir concluir os meus objetivos. Sem Ele as conquistas e batalhas vencidas não teriam sido possíveis.

Aos meus pais **Andréa Gouvêa de Oliveira** e **Roberto Henrique Barbeiro** por sempre me apoiarem, me darem todo amor e atenção e incentivo para eu nunca desistir. Além de todo apoio e ajuda para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Minha mãe que sempre aguentou minhas crises e me ajudou com seu enorme amor e com os melhores conselhos; e meu pai, que além de meu professor da vida, continua sendo o melhor professor que eu poderia ter durante a minha vida acadêmica e agora na pós-graduação. Tive a honra de receber seu infinito conhecimento sobre a nossa profissão. Ambos são meu porto-seguro e á quem eu dedico as minhas vitórias e alegrias. Amo muito vocês!

Quero agradecer aos meus avós queridos e amados, **Jesus Carlos de Oliveira** e **Terezinha Vicência Gouvêa de Oliveira** que também sempre me apoiaram e me deram todo amor e carinho que avós sabem dar.

Agradeço à **Janaina Spreafico** por todo apoio e por ter me dado o melhor presente e a maior alegria durante o meu Mestrado: a Lulu, minha irmã mais linda que eu amo infinitamente.

Ao **Thiago Paiva Fronteira** que sempre viu toda a correria da Faculdade e sempre me apoiou, me desejando muito sucesso e proferindo palavras de incentivo.

Agradeço ao **Augusto Cesar Fiore**, meu companheiro que muitas vezes teve que me aguentar estressada e preocupada, mas sempre me apoiou fazendo eu acreditar que no fim tudo daria certo.

Agradeço à minha professora e orientadora **Andreia Bufalino** por ter sempre compartilhado comigo todo seu conhecimento e por ter sido responsável pela execução e conclusão desta pesquisa, além de ter depositado em mim a sua confiança para fazer parte desta pesquisa. Assim como agradeço a amizade.

À minha coorientadora **Luciana Yamamoto de Almeida** por todo conhecimento compartilhado, pelos ensinamentos, amizade, por toda ajuda e

contribuição para realização desta pesquisa e por todo apoio durante o percurso até aqui.

Agradeço também ao professor **Jorge Esquiche León** por também compartilhar todo seu conhecimento, por sempre estar disposto a ajudar e esclarecer dúvidas, assim como sempre me ofereceu a oportunidade de apresentar trabalhos em Congressos. Agradeço também por ter me dado a oportunidade de participar e acompanhar as atividades desenvolvidas em seu laboratório de histopatologia na FORP-USP.

Aos meus amigos de pós-graduação, **Mariel Ruivo Biancardi, Heitor Albergoni da Silveira, Maria Leticia de Almeida Lança, Larissa Natiele Miotto, Audrey Foster Lefort Rocha, Túlio Morandin Ferrisse, Darcy Fernandes, Analú Barros de Oliveira, Esteban Arroyo, Lais Grifoni** pela amizade, pela parceria nos trabalhos, pela companhia do dia-a-dia e por tornarem os momentos difíceis mais leves.

Agradeço imensamente às meninas do laboratório, **Laura Gonzales, Natalie Fernandes, Mariana Cominotte** por sempre estarem dispostas a ajudar quando eu precisei, por terem me ensinado quase tudo que aprendi dentro do laboratório de Biologia Molecular e também por acreditarem no meu potencial e sempre me incentivarem e também pela companhia do dia-a-dia no laboratório.

Às minhas queridas amigas da graduação e da pós-graduação, **Claudia Carolina Jordão e Camila Jabr** por terem sempre me apoiado, me consolado nos momentos difíceis, compartilhado comigo suas experiências da pós-graduação e principalmente, pela amizade.

À minha amiga **Maria Cristina Barbieri Góes** que me recebeu durante o congresso internacional que eu tive a oportunidade de participar e que sempre me apoiou nos estudos, desde a época do colegial e do cursinho. Obrigada por toda amizade e por todo incentivo.

À minha amiga **Paola Palombo** que mesmo “longe” esteve presente durante meu mestrado, me ajudando com a experiência que adquiriu em seu mestrado e agora no doutorado. Obrigada por me ouvir, me orientar e sempre me estimular com palavras de apoio.

Agradeço á **Andréa Tocci Dias** por todos os anos de acompanhamento, suporte, orientação, carinho e apoio. Obrigada por toda força que sempre me deu e por todos os incentivos.

À **FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/04954-2) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Agradeço também à **Ana Cristina Jorge** da Biblioteca que foi muito atenciosa em me ajudar e me orientar para que eu pudesse fazer a edição e formatação da minha dissertação, bem como à **Marley Cristina Chiusoli Montagnoli** que ajudou com a confecção da ficha catalográfica.

Aos demais **professores do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, assim como os professores do Programa de Ciências Odontológicas e amigos da pós-graduação** que de alguma forma contribuíram para o sucesso desta pesquisa, bem como à minha evolução durante o Mestrado.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, **Cristiano Afonso Lamounier e José Alexandre Garcia** por todo auxílio e disponibilidade durante o meu Mestrado.

Agradeço a **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, UNESP**, na pessoa de sua atual diretora **Elaine Maria Sgavioli Massucato** por todas as oportunidades concedidas.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor nas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.”
Marthin Luther King*

* Marthin Luther King. “I have a dream”; 1963.

Barbeiro CO. Análise da acetilação de histona H3 e sua contribuição para a instabilidade genômica na leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são apresentações clínicas que apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer na cavidade oral, seja ela uma lesão precursora definida ou mucosa clinicamente normal. Dentre as principais DPMOs, a leucoplasia oral (LO) se apresenta como uma placa branca não raspável de risco questionável, podendo ser homogênea ou não homogênea, cuja taxa de transformação maligna varia de 0,2% até 17,5%. Além disso, a LO apresenta os mesmos fatores de riscos que são observados no desenvolvimento de carcinoma espinocelular (CEC) oral, o qual é a principal neoplasia maligna que afeta a cavidade oral. Outra DPMO importante é a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), a qual também se apresenta como uma placa branca não raspável, porém multifocal e possui um comportamento persistente e progressivo para malignidade, com taxa de transformação maligna de 70% até 100% dos casos. Diferente da LO, os fatores de risco como tabaco, álcool e noz de areca não parecem estar associados com o desenvolvimento da LVP. Adicionalmente, a LVP apresenta resposta inadequada a todas as modalidades de tratamento, sofre rápida disseminação pelos sítios orais e muitas vezes demonstra recorrência. Os graus de displasias identificados nas DPMOs são utilizados atualmente como preditores de risco para transformação maligna, no entanto diversos estudos têm mostrado que este não é um preditor fiel. Estudos recentes sugerem ainda que o infiltrado inflamatório associado as DPMOs pode estar associado a sua etiologia e comportamento clínico. Além disso, recentemente, tem-se estudado as alterações epigenéticas envolvendo histonas e metilação de DNA em diferentes tipos de câncer, bem como em algumas DPMOs a fim de descobrir alvos para medidas terapêuticas efetivas. Dentre os diversos fatores indutores de alterações epigenéticas, a inflamação crônica tem sido apontada como um destes fatores. Assim, o presente estudo teve como objetivos específicos: (1) comparar os níveis de acetilação de histona H3, o acúmulo de danos no DNA e os níveis de metilação global de DNA entre LO e LVP; (2) avaliar se os níveis de acetilação de histona H3 em linhagens celulares displásicas e tumorais sofrem alterações pelo contato com as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs); e (3) avaliar se tais alterações são acompanhadas de alterações na proliferação celular e transição epitélio-mesenquimal (TEM). Para alcançar estes objetivos, os níveis de acetilação de histona H3, dano de DNA e metilação foram avaliados por imunofluorescência. Adicionalmente, ensaios de co-cultura celular com PBMCs e linhagens de queratinócitos orais (NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562) foram realizados para avaliar a influência dos PBMCs na aquisição de vantagens para a progressão tumoral. Os resultados da imunofluorescência mostraram que ambas as DPMOs estavam hipoacetiladas em relação ao controle. Contudo, quando realizada uma comparação somente entre LO e LVP, observamos que o grupo LVP está mais hiperacetilado do que LO. Foram observados também que os níveis de dano de DNA e metilação estavam aumentados no grupo LO em relação a LVP. Os experimentos com cultura de células revelaram que o contato dos queratinócitos orais displásicos e normais com os PBMCs, foi capaz de favorecer a TEM. Nossos resultados revelaram dois pontos importantes: 1) ambas as DPMOs apresentam perfil epigenético distintos; 2) o contato

direto de PMBCs com queratinócitos orais normais, displásicos e tumorais parece ser importante em eventos iniciais da tumorigênese como a TEM.

Palavras – chave: Leucoplasia oral. Histonas. Acetilação.

Barbeiro CO. Evaluation of the acetylation status of H3 histone and its contribution to genomic instability in oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Oral potentially malignant disorders (OPMDs) are clinical presentations that present an increased risk of cancer development in the oral cavity, whether in a clinically definable precursor lesion or clinically normal oral mucosa. Among the main OPMDs, oral leukoplakia (OL) presents itself as a non-scratchable white plaque of questionable risk, which can be homogeneous or non-homogeneous, whose malignant transformation rate varies from 0.2% to 17.5%. In addition, OL has the same risk factors that are observed in the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC), which is the main malignant neoplasm affecting the oral cavity. Another important OPMD is proliferative verrucous leukoplakia (PVL), which also presents itself as a white, non-scratchable, but multifocal plaque and has a persistent and progressive behavior for malignancy, with a malignant transformation rate of 70% to 100% of the cases. Unlike OL, risk factors such as tobacco, alcohol and areca nut do not appear to be associated with the development of PVL. Additionally, PVL has a poor response to all treatment modalities, suffers rapid dissemination through oral sites and often shows recurrence. The degree of epithelial dysplasia identified in OPMDs is currently used as a risk predictor for malignant transformation, however several studies have shown that it is not a reliable predictor. Recent studies also suggest that the inflammatory infiltrate associated with OPMD may be due to its etiology and clinical compartment. Furthermore, recently, epigenetic changes involving histones and DNA methylation in different types of cancer have been studied, as well as in some OPMDs in order to discover targets for effective therapeutic measures. Among the several factors inducing epigenetic changes, chronic inflammation has been identified as one of these factors. Thus, the present study had specific objectives: (1) to compare the levels of histone H3 acetylation, the accumulation of DNA damage and the levels of global DNA methylation between OL and PVL; (2) to evaluate whether the levels of histone H3 acetylation in dysplastic and tumor cell lines are altered by the contact with peripheral blood mononuclear cells (PBMCs); and (3) assess whether such changes are accompanied by changes in cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition (EMT). To achieve these goals, the levels of histone H3 acetylation, DNA damage and methylation were assessed by immunofluorescence. In addition, cell co-culture assays with PBMCs and oral keratinocyte lines (NOK-SI, DOK, SCC-25 and Detroit 562) were performed to assess the influence of PBMCs on the acquisition of advantages for tumor progression. The results of the immunofluorescence showed that both OPMDs were hypoacetylated compared to the control. However, when comparing only OL and PVL, we observed that the PVL group was more hyperacetylated than OL. It was also observed that the levels of DNA damage and methylation were increased in the OL group in relation to PVL. The experiments with cell culture revealed that the contact of dysplastic and normal oral keratinocytes with PBMCs was able to favor EMT. Our results revealed two main points: 1) both OPMDs have different epigenetic profiles; 2) the direct contact of PMBCs with normal, dysplastic and tumoral oral keratinocytes seems to be important in early events of tumorigenesis such as EMT.

Keywords: Oral Leukoplakia. Histones. Acetylation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	18
2.1 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	
3.1 Desordens Potencialmente Malignas da Mucosa Oral e Carcinoma Espinocelular	19
3.2 Epigenética e Modificação nas Histonas em Neoplasias Malignas.....	22
4 MATERIAL E MÉTODO	32
4.1 Aprovação do Comitê de Ética	32
4.2 Amostras para Análise de Imunofluorescência	32
4.3 Estágio Morfológico e Classificação das Amostras	32
4.4 Reação de Imunofluorescência	33
4.5 Análise em Cultura Celular	34
4.5.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	34
4.5.2 Cultura celular de queratinócitos orais.....	35
4.5.3 Co-cultura de PBMCs e linhagens celulares de queratinócitos.....	36
4.5.4 Avaliação dos níveis de acetilação de histona H3 por citometria de fluxo.....	36
4.5.5 Avaliação da proliferação celular.....	37
4.5.6 Análise do ciclo celular.....	38
4.5.7 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR).....	38
4.5.7.1 Isolamento e análise da concentração de RNA total.....	39
4.5.7.2 Síntese de cDNA.....	39
4.5.7.3 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)..	40
4.5.7.4 Análise proteica por Western Blot.....	41

4.5.7.5	Análise estatística.....	43
5	RESULTADO	44
5.1	Características Clínico-Patológicas dos Pacientes com LO e LVP	44
5.2	Amostras de LO e LVP Apresentam Hipoacetilação de H3K9	45
5.3	Os Níveis de γ H2A.X estão reduzidos nas Lesões Leucoplásicas de LVP	47
5.4	Os Níveis de Metilação Global do DNA estão Reduzidos em Lesões Leucoplásicas de LVP	49
5.5	A influência dos PBMCs nos Níveis de Acetilação de Histona H3 e na Proliferação Celular de Queratinócitos Orais	51
5.6	A influência dos PBMCs Sobre Marcadores de TEM em Diferentes linhagens de queratinócitos orais	57
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO	80

1 INTRODUÇÃO

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são apresentações clínicas que carregam um risco de transformação para uma neoplasia maligna, mais comumente o carcinoma espinocelular (CEC) oral. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são consideradas DPMOs a leucoplasia, eritoplasia, eritroleucoplasia, queilite actínica, líquen plano, queratose do tabaco sem fumaça, lesões no palato associadas ao fumo invertido, candidíase crônica, além de outras como fibrose submucosa oral, disqueratose congênita, lúpus eritematoso discóide e glossite sifilítica¹.

Existem diferentes fatores de risco que podem levar ao aparecimento das DPMOs, bem como o uso de tabaco e consumo de álcool no caso das leucoplasias, nóz de areca nos casos de fibrose submosa, porém várias DPMOs não possuem um fator etiológico conhecido. As diferentes DPMOs podem acometer qualquer sítio da cavidade oral, porém cada lesão parece apresentar uma predileção por um sítio específico¹.

A leucoplasia oral (LO) apresenta uma taxa de incidência que varia de 1 a 4%, sendo clinicamente caracterizada como uma placa branca não raspável que pode ser homogênea ou não homogênea, de risco questionável, após a exclusão de outras lesões conhecidas¹. Portanto, o termo LO é apenas um termo clínico e o diagnóstico final depende estritamente da realização de uma biópsia e pode ser modificado após a análise histopatológica². Os sítios mais acometidos são o vermelhão do lábio, mucosa jugal e gengiva, sendo os homens acima de 40 anos de idade os mais afetados, embora alguns trabalhos mostrem que não há predileção pelo sexo³. Os fatores de risco associados a LO são similares aos associados com os CECs orais como tabagismo, consumo excessivo de álcool, idade avançada, nóz de betel e exposição a radiação ultravioleta nos casos que acometem o vermelhão do lábio².

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), assim como a LO, apresenta-se clinicamente como uma placa branca não raspável, porém de aspecto não homogêneo, verrucoso, exofítico e de acometimento multifocal na cavidade oral, afetando principalmente a gengiva, mucosa alveolar e palato¹. Contudo, diferentemente das LO convencional, esta DPMO distinta e rara, apresenta comportamento clínico mais agressivo e persistente. Segundo dados da literatura, a LVP possui altas taxas de recorrência e um índice de transformação maligna que varia

de 70 até 100% dos casos após acompanhamento a longo prazo⁴⁻⁶. Interessantemente, esse tipo de lesão é mais comumente observado em mulheres na sexta década de vida que nem sempre são fumantes e o diagnóstico é baseado em múltiplas biopsias periódicas, em locais diferentes que revelam diferentes graus de displasias ou até mesmo a presença de um CEC⁶.

Devemos destacar que o perfil epidemiológico da LVP difere do observado nas lesões de LO convencionais e, por isso, atualmente ela é classificada pela OMS como uma entidade distinta da LO, sendo considerada a DPMO com maior risco de progressão para CEC oral¹. Entretanto, o diagnóstico diferencial e precoce entre lesões de LO e LVP tem sido um desafio pois não existem características clínicas e microscópicas evidentes da doença nas fases iniciais, bem como não existem características microscópicas específicas que detectam alterações que indiquem um maior risco de transformação maligna⁶. No caso das lesões de LVP, o diagnóstico se dá retrospectivamente, com base na observação temporal das lesões por meio de acompanhamentos e biópsias periódicas, além da correlação clínico-patológica, porém em nenhuma dessas lesões é possível prever quais irão de fato progredir para o CEC oral⁷.

As características histopatológicas das biopsias de lesões de LO e de LVP podem variar desde hiperplasia epitelial até CEC, embora existam inúmeras nomenclaturas histológicas que são utilizadas para descrever os diversos estágios das lesões de LVP⁷. Atualmente, o grau de displasia encontrado nessas DPMOs (displasia leve, moderada e severa) é utilizado como fator prognóstico, sendo que os graus de displasia estão associados ao risco de progressão para CEC, porém nem todas as lesões que apresentam displasia irão necessariamente sofrer transformação maligna⁸. Embora tenham sido alcançados muitos avanços nas pesquisas sobre as neoplasias malignas, a incidência do CEC oral continua aumentando e a taxa de sobrevivência de 5 anos permanece para apenas 50% dos casos⁹. Várias alterações moleculares subjacentes, bem como mudanças genéticas e fatores de risco podem estar associadas ao desenvolvimento inicial do CEC oral assim como podem também estar envolvidas neste processo as alterações epigenéticas⁷. Sabe-se que o CEC oral representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral¹⁰, sendo uma doença multifatorial cujos fatores de risco mais importantes são o consumo excessivo de álcool e tabaco, além de outros como inflamações crônicas, inflamações virais, predisposição genética, entre outras. A expressão gênica

desregulada, bem como as mutações genéticas de oncogenes e protooncogenes participa claramente do processo de carcinogênese, porém as fases iniciais deste processo ainda não são bem elucidadas¹¹.

Na última década tem-se estudado as alterações epigenéticas que podem estar associadas ao desenvolvimento e estágios iniciais da carcinogênese¹¹⁻¹⁵. Essas alterações são modificações do genoma, herdáveis durante a divisão celular, mas que não envolve mudança na sequência do DNA e são reversíveis. Normalmente ocorre em resposta a fatores extrínsecos/ambientais, afetando a regulação da expressão de genes. As alterações epigenéticas mais comuns são a metilação do DNA e as modificações nas histonas^{16,17}. Estas proteínas são as principais auxiliadoras no empacotamento do DNA e atuam na regulação da expressão gênica. Dentre as modificações que ocorrem nas histonas, a acetilação e desacetilação são comuns e normalmente estão em equilíbrio. O descontrole desses eventos epigenéticos interferem na expressão e no silenciamento de genes, por meio da modificação conformacional da cromatina, podendo contribuir desta maneira para a transformação maligna^{18,19}. Os fatores de risco ambientais para o desenvolvimento do CEC, como tabaco e álcool, são fatores importante que atuam como gatilho no desenvolvimento de alterações epigenéticas, propiciando eventos importantes na carcinogênese^{11,20}.

Neste contexto, a utilização de técnicas de biologia molecular em estudos com LO e LVP poderiam melhorar acentuadamente a detecção de alterações moleculares relacionadas com estas DPMOs, melhorando a eficácia na identificação dos pacientes com maior risco de transformação maligna²¹. Assim, o entendimento mais aprofundado da natureza molecular e do comportamento destas DPMOs é fundamental para que seja possível o desenvolvimento de potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas em casos de LO e LVP. Além disso, a LVP frequentemente apresenta resposta inadequada a todas as modalidades de tratamento e muitas vezes sofre recorrência. Então, o melhor entendimento dos mecanismos moleculares relacionados a ela, incluindo os mecanismos relacionados as alterações epigenéticas, podem auxiliar no desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficientes.

7 CONCLUSÃO

- Os níveis de acetilação de histona H3K9 foram menores nas lesões de LO;
- Houve maior dano de DNA nas lesões de LO caracterizado pela fosforilação de H2A.X e redução em LVP;
- Os níveis de metilação foram maiores no grupo LO;
- Este estudo evidencia que ambas as DPMOs apresentam perfil epigenético distintos;
- O contato direto de PBMCs com linhagens celulares de queratinócitos normais, displásicos e tumorais não parece influenciar o potencial proliferativo destas células, embora tenha existido uma modulação nos níveis proteicos de proteínas reguladoras do ciclo celular que favorecem a inibição da proliferação celular;
- O contato direto de PBMCs de modo geral interferiu na modulação de TEM quando em contato com as diferentes culturas de queratinócitos orais, sendo mais evidente em NOK-SI e DOK.

REFERÊNCIAS*

1. El Nagggar AK, Chan JCK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017.
2. Villa A, Sonis S. Oral leukoplakia remains a challenging condition. *Oral Dis.* 2018; 24(1-2): 179-83.
3. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8): 770-80.
4. Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis.* 2010; 16(4): 328-32.
5. Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(7): 379-82.
6. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-A diagnostic and management algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 75(4): 723-34.
7. Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Cohen DM, Bilodeau EA, Bhattacharyya I, Lewis JS Jr et al. Inter-observer variability in the diagnosis of proliferative verrucous leukoplakia: clinical implications for oral and maxillofacial surgeon understanding: a collaborative pilot study. *Head Neck Pathol.* 2020; 14(1): 156.165.
8. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10): 987-93.
9. Németh CG, Röcken C, Siebert R, Wiltfang J, Ammerpohl O, Gassling V. Recurrent chromosomal and epigenetic alterations in oral squamous cell carcinoma and its putative premalignant condition oral lichen planus. *PLoS One.* 2019; 9;14(4): e0215055.
10. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15(6): 388-99.
11. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol.* 2012; 8(11): 1407-25.
12. Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis.* 2011; 17 Suppl 1:7-22.
13. Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. *Int J Cancer.* 2015; 1;136(3): 503-15.
14. Audia JE, Campbell RM. Histone modifications and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016; 1;8(4): a019521.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

15. Webber LP, Wagner VP, Curra M, Vargas PA, Meurer L, Carrard VC, et al. Hypoacetylation of acetyl-histone H3 (H3K9ac) as marker of poor prognosis in oral cancer. *Histopathology*. 2017; 71(2): 278-86.
16. Gillenwater AM, Zhong M, Lotan R. Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces apoptosis through both mitochondrial and Fas (Cd95) signaling in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2007; 6(11): 2967-75.
17. Ramassone A, Pagotto S, Veronese A, Visone R. Epigenetics and microRNAs in cancer. *Int J Mol Sci*. 2018; 3;19(2). pii: E459.
18. Blancafort P, Jin J, Frye S. Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules. *Mol Pharmacol*. 2013; 83(3): 563-76.
19. Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, et al. Current Insights into oral cancer epigenetics. *Int J Mol Sci*. 2018; 27;19(3). pii: E670.
20. Oliveira JC. Epigenética e doenças humanas. *Semin: Ciênc Biol Saúde*. 2012; 33(1): 21-34. Formato correto
21. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract*. 2002; 11(1): 32-5.
22. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009; 45(4-5): 317-23.
23. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol*. 2010; 46(6): 423-5.
24. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent*. 2010; 2010:186018.
25. Müller S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018; 125(6): 591-602.
26. Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27(8): 376-81.
27. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985; 60(3): 285-98.
28. Gouvea AF, Moreira AE, Reis RR, de Almeida OP, Lopes MA. Proliferative verrucous leukoplakia, squamous cell carcinoma and axillary metastasis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15(5): e704-8.
29. Cerero-Lapiedra R, Balade-Martinez D, Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez G, Bagan JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010; 15: e839-45.
30. Carrard VC, Brouns ER, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18: e411-3.

31. Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P, et al. Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: Current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018; 125(6): 650-69
32. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med.* 2017; 6(12): 2918-31.
33. Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR, et al. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 29;7: CD001829.
34. D'Souza W, Saranath D. Clinical implications of epigenetic regulation in oral cancer. *Oral Oncol.* 2015; 51(12): 1061-8.
35. Yang H, Jin X, Dan H, Chen Q. Histone modifications in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Oral Dis.* 2019 May 6.
36. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(2): 2331–53.
37. Martins MD, Castilho RM. Histones: Controlling tumor signaling circuitry. *J Carcinog Mutagen.* 2013; 29;1(Suppl 5):1-12.
38. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science.* 2011; 26;333(6046): 1157-60.
39. Murtha M, Esteller M. Extraordinary cancer epigenomics: thinking outside the classical coding and promoter box. *Trends Cancer.* 2016; 2(10): 572-84.
40. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 13;358(11): 1148-59.
41. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell.* 2014; 5;54(5): 716-27.
42. Wainwright EN, Scaffidi P. Epigenetics and cancer stem cells: unleashing, hijacking, and restricting cellular plasticity. *Trends Cancer.* 2017; 3(5): 372-86.
43. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(1): 21-33. Review.
44. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007; 23;128(4): 683-92. Review.
45. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018; 125(6): 612-27.
46. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349(21): 2042–54.
47. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:687-92.

48. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000; 24:88-91.
49. Guan JS, Haggarty SJ, Giacometti E, Dannenberg JH, Joseph N, Gao J, et al. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. 2009; 7;459(7243): 55-60.
50. Baxter J, Sauer S, Peters A, John R, Williams R, Caparros ML et al. Histone hypomethylation is an indicator of epigenetic plasticity in quiescent lymphocytes. *EMBO J*. 2004; 23(22): 4462-72.
51. Giudice FS, Pinto DS Jr, Nör JE, Squarize CH, Castilho RM. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58672.
52. Fink M, Imholz D, Thoma F. Contribution of the serine 129 of histone H2A to chromatin structure. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3589-600.
53. Reddy MA, Park JT, Natarajan R. Epigenetic modifications and diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin Pract*. 2012; 31(3): 139-50.
54. Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*. 2011; 16;146(6): 1016-28.
55. Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res*. 2012; 15;18(10): 2768-79.
56. Ausio J. Histone variants—the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; 5(3): 228–43.
57. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. 1998; 273(10): 5858–68.
58. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12): 957–67.
59. Jeggo PA, Löbrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact?. *Oncogene*. 2007; 26(56): 7717–19.
60. Marti TM, Hefner E, Feeney L, Natale V, Cleaver JE. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(26): 9891–96.
61. Ding D, Zhang Y, Wang J, Zhang X, Gao Y, Yin L, et al. Induction and inhibition of the pan-nuclear gamma-H2AX response in resting human peripheral blood lymphocytes after X-ray irradiation. *Cell Death Discov*. 2016; 2:16011. Published 2016 Mar 21.
62. Palla VV, Karaolanis G, Katafigiotis I, Anastasiou I, Patapis P, Dimitroulis D, et al. gamma-H2AX: can it be established as a classical cancer prognostic factor? *Tumour Biol*. 2017; 39(3):1010428317695931.
63. Pinto DM, Flaus A. Structure and function of histone H2AX. *Subcell Biochem*. 2010; 50: 55-78.

64. Yu T, MacPhail SH, Banáth JP, Klovov D, Olive OL. Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability. *DNA Repair* 2006; 5(8): 935–46.
65. Brustmann H, Hinterholzer S, Brunner A. Expression of phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) in normal and neoplastic squamous epithelia of the uterine cervix: an immunohistochemical study with epidermal growth factor receptor. *Int J Gynecol Pathol* 2011; 30(1): 76–83.
66. Wasco MJ, Pu RT, Yu L, Su L, Ma L. Expression of gamma-H2AX in melanocytic lesions. *Hum Pathol*. 2008; 39 (11): 1614–20.
67. Sedelnikova OA, Bonner WM. GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle* 2006; 5: 2909–13.
68. Turinetto V, Pardini B, Allione A, Fiorito G, Viberti C, Guarrera S, et al. H2AX phosphorylation level in peripheral blood mononuclear cells as an event-free survival predictor for bladder cancer. *Mol Carcinog*. 2016; 55(11):1833-42.
69. Lund AH, van Lohuizen M. Epigenetics and cancer. *Genes Dev*. 2004; 18(19):2315-35.
70. Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, et al. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. *Mol Cell Biol*. 2006; 26(21): 7913-28.
71. Verdone L, Caserta M, Di Mauro E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochem Cell Biol*. 2005; 83(3): 344-53.
72. Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, et al. Histone deacetylase-1 and -2 expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *J Oral Pathol Med*. 2011; 40(9): 706-14.
73. Wade PA, Kikyo N. Chromatin remodeling in nuclear cloning. *Eur J Biochem*. 2002; 269(9): 2284-7.
74. Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 983: 84-100.
75. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(2): 143-53.
76. Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res*. 2002; 86:41-65.
77. Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer*. 2004; 112(2): 171-8.
78. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature*. 2005; 435(7046): 1262-6
79. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol*. 2007; 1(1):1 9-25.

80. Yuan Y, Wei Y, Yu J, Huang LQ. Relationship of epigenetic and Dao-di herbs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2015; 40(13): 2679-83.
81. Martin D, Abba MC, Molinolo AA, Vitale-Cross L, Wang Z, Zaida M, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget*. 2014; 5(19): 8906-23.
82. Siqueira IR, Elsner VR. I Introdução à epigenética: conceitos básicos. In: Elsner VR, Siqueira IR, Organizadoras. *Epigenética aplicada à saúde e à doença: princípios fundamentais baseados em evidências atuais*. Porto Alegre: Ed. Universidade Metodista IPA; 2016. p. 17-28.
83. Halkidou K, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN. Putative involvement of the histone acetyltransferase Tip60 in ribosomal gene transcription. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(5): 1654-65.
84. Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(9): 2203-10.
85. Yoshikawa M, Hishikawa K, Marumo T, Fujita T. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(1): 58-65.
86. Lombaerts M, van Wezel T, Philippo K, Dierssen JW, Zimmerman RM, Oosting J, et al. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer*. 2006; 13;94(5): 661-71.
87. Peña C, García JM, García V, Silva J, Domínguez G, Rodríguez R, et al. The expression levels of the transcriptional regulators p300 and CtBP modulate the correlations between SNAIL, ZEB1, E-cadherin and vitamin D receptor in human colon carcinomas. *Int J Cancer*. 2006; 119(9): 2098-104.
88. Bedi U, Mishra VK, Wasilewski D, Scheel C, Johnsen SA. Epigenetic plasticity: a central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Oncotarget*. 2014; 5(8): 2016-29.
89. Chen YW, Kao SY, Wang HJ, Yang MH. Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013; 119(24):4259-67.
90. Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MY. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol*. 2009; 45(7): 610-4.
91. Sakuma T, Uzawa K, Onda T, Shiiba M, Yokoe H, Shibahara T, et al. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2006; 29(1): 117-24.
92. Noguchi A, Li X, Kubota A, Kikuchi K, Kameda Y, Zheng H, et al. SIRT1 expression is associated with good prognosis for head and neck squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013; 115(3): 385-92.
93. Toh Y, Ohga T, Endo K, Adachi E, Kusumoto H, Haraguchi M, et al. Expression of the metastasis-associated MTA1 protein and its relationship to deacetylation of the histone H4 in esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2004; 110(3): 362-7.

94. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol.* 2011; 7(2): 263-83.
95. Qiu T, Zhou L, Zhu W, Wang T, Wang J, Shu Y, et al. Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials. *Future Oncol.* 2013; 9(2): 255-69.
96. Karagiannis TC, El-Osta A. Clinical potential of histone deacetylase inhibitors as standalone therapeutics and in combination with other chemotherapeutics or radiotherapy for cancer. *Epigenetics.* 2006; 1(3): 121-6.
97. Kim J, Guan J, Chang I, Chen X, Han D, Wang CY. PS-341 and histone deacetylase inhibitor synergistically induce apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(7): 1977-84.
98. Erlich RB, Kherrouche Z, Rickwood D, Endo-Munoz L, Cameron S, Dahler A, et al. Preclinical evaluation of dual PI3K-mTOR inhibitors and histone deacetylase inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2012; 106(1): 107-15.
99. Brower V. Epigenetics: unravelling the cancer code. *Nature.* 2011; 471(7339): S12-3.
100. Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ Jr, Costa MR, Damante JH, et al. Patients with oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59(6): 819-28.
101. Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2014; 145(1): 45–56.
102. Kaur J, Jacobs R. Proinflammatory cytokine levels in oral lichen planus, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2015; 41(4): 171-5.
103. Shanmugam MK, Sethi G. Role of epigenetics in inflammation-associated diseases. *Subcell Biochem.* 2013; 61:627-57.
104. Niwa T, Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. *Adv Genet.* 2010; 71:41-56.
105. Dillenburg CS, Martins MA, Almeida LO, Meurer L, Squarize CH, Martins MD et al. Epigenetic modifications and accumulation of DNA double-strand breaks in oral lichen planus lesions presenting poor response to therapy. *Medicine.* 2015; 94(30): e997.
106. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002; 420(6917): 860-7.
107. Almeida LO, Abrahao AC, Rosseli-Murai LK, Giudice FS, Zagni C, Leopoldino AM, et al. NFκB mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Biol.* 2013; 4: 96–104.
108. Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(5): 219.
109. Roman-Blas JA, Jimenez SA: NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14:839-848.

110. Vanden Berghe W, Ndlovu MN, Hoya-Arias R, Dijsselbloem N, Gerlo S, Haegeman G: Keeping up NF-kappaB appearances: epigenetic control of immunity or inflammation-triggered epigenetics. *Biochem Pharmacol* 2006, 72:1114-31.
111. Sacconi S, Natoli G: Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev.* 2002; 16(17): 2219-24.
112. Hodge DR, Peng B, Cherry JC, Hurt EM, Fox SD, Kelley JA, et al: Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* 2005; 65(11): 4673-82.
113. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Smith H, Ueno Y, Patel T: The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem.* 2007; 282(11): 8256-64.
114. Meng F, Wehbe-Janek H, Henson R, Smith H, Patel T: Epigenetic regulation of microRNA-370 by interleukin-6 in malignant human cholangiocytes. *Oncogene.* 2008; 27(3): 378-86.
115. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(3): 127-33.
116. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119(6):1420–8.
117. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(4): 265–73.
118. Dave B, Mittal V, Tan NM, Chang JC. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(1): 202.
119. Sklenicka S, Gardiner S, Dierks EJ, Potter BE, Bell RB. Survival analysis and risk factors for recurrence in oral squamous cell carcinoma: does surgical salvage affect outcome? *J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 68(6): 1270-5.
120. de Freitas Filho SAJ, Servato JPS, de Sá RT, Siqueira CS, de Faria PR, Loyola AM, Cardoso SV. Evaluation of specific modified histones in lip carcinogenesis. *Pathol Res Pract.* 2018; 214(6): 876-80.
121. Nagelkerke A, Span PN. Staining Against Phospho-H2AX (γ -H2AX) as a Marker for DNA Damage and Genomic Instability in Cancer Tissues and Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 899:1-10.
122. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008; 319(5868): 1352-55.
123. Oka K, Tanaka T, Enoki T, Yoshimura K, Ohshima M, Kubo M, et al. DNA damage signaling is activated during cancer progression in human colorectal carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2010; 9(3): 246-52.
124. Koorstra JB, Hong SM, Shi C, Meeker AK, Ryu JK, Offerhaus GJ, et al. Widespread activation of the DNA damage response in human pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* 2009; 22(11): 1439-45.
125. Chou SJ, Alawi F. Expression of DNA damage response biomarkers during oral carcinogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 111:346-353.

126. Di Micco R, Fumagalli M, Cicalese A, Piccinin S, Gasparini P, Luise C et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*. 2006; 30;444(7119): 638-42.
127. Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell*. 2009; 4;5(3): 279-89.
128. Zhu M, Liu W, Shi L, Xiao X, Wu W, Wu L, et al. Expression of DNA doublestrand repair proteins in oral leukoplakia and the risk of malignant transformation. *Oncol Lett*. 2018; 15(6): 9827-35.
129. Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44(3): 143-54.
130. McCabe MT, Brandes JC, Vertino PM. Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009; 15;15(12): 3927-37.
131. Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res*. 2002; 15;62(18): 5295-300.
132. Saito M, Tanaka R, Arishima S, Matsuzaki T, Ishihara S, Tokashiki T, et al. Increased expression of OX40 is associated with progressive disease in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*. 2013; 7; 10:51.
133. Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*. 2004; 14(1): 11-6.
134. Shridhar K, Walia GK, Aggarwal A, Gulati S, Geetha AV, Prabhakaran D, et al. DNA methylation markers for oral pre-cancer progression: A critical review. *Oral Oncol*. 2016; 53:1-9.
135. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74.
136. Birajdar SS, Radhika M, Paremala K, Sudhakara M, Soumya M, Gadivan M. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014; 18(2): 169-76.
137. Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009; 100(7): 1128-34.
138. Maheshwari V, Sharma S, Narula V, Verma S, Jain A, Alam K. Prognostic and predictive impact of Ki-67 in premalignant and malignant squamous cell lesions of oral cavity. *Int J Head Neck Surg*. 2013; 4:5.
139. Suwasini S, Chatterjee K, Purkait SK, Samaddar D, Chatterjee A, Kumar M. Expression of P53 Protein and Ki-67 Antigen in Oral Leukoplakia with Different Histopathological Grades of Epithelial Dysplasia. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2018; 8(6): 513-22.
140. Reddy VM, Kamath A, Radhakrishnan RA. p53 immunoprofiling of potentially malignant oral disorders: a case series analysis. *Indian J Cancer*. 2012; 49(1):27-32.
141. Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer*. 2002; 15;87(2): 129-33.

142. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3): 222-31.
143. Fecher LA, Amaravadi RK, Schuchter LM, Flaherty KT. Drug targeting of oncogenic pathways in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009; 23(3): 599-618.
144. Li W, Sanki RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology*. 2006; 38(4): 287-301.
145. Masamha CP, Benbrook DM. Cyclin D1 degradation is sufficient to induce g1 cell cycle arrest despite constitutive expression of cyclin e2 in ovarian cancer Cells. *Cancer Res*. 2009; 69(16): 6565-72.
146. van Riggelen J, Felsher DW. Myc and a Cdk2 senescence switch. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(1): 7-9.
147. De Paola F, Maria Vecci A, Maria Granato A, Liverani M, Monti F, Maria Innoceta A, et al. P27^{kip1} expression in normal epithelium, benign and neoplastic breast lesions. *J Pathol*. 2002; 196: 26-31
148. Zhang H, Sun XF. Loss of p27 expression predicts poor prognosis in patients with Dukes' B stage or proximal colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2001; 19(1): 49-52.
149. Guan G, Bakr MM, Firth N, Love RM. Expression of cyclin D1 correlates with p27(KIP1) and regulates the degree of oral dysplasia and squamous cell carcinoma differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018; 126(2): 174-83.
150. Thambiah LJ, Bindushree RV, Anjum A, Pugazhendi SK, Babu L, Nair RP. Evaluating the expression of p16 and p27 in oral epithelial dysplasias and oral squamous cell carcinoma: a diagnostic marker for carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018; 22(1): 59-64.
151. Antsiferova M, Werner S. The bright and the dark sides of activin in wound healing and cancer. *J Cell Sci*. 2012; 1;125(Pt 17): 3929-37.
152. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420–8.
153. Schäfer M, Werner S. Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(8):628-38.
154. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139:871–90.
155. Dmello C, Sawant S, Chaudhari PR, Dongre H, Ahire C, D'Souza ZC, et al. Aberrant expression of vimentin predisposes oral premalignant lesion derived cells towards transformation. *Exp Mol Pathol*. 2018; 105(3): 243-51.
156. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014; 50(1):1-6