

João Lucas Trindade Fernandes dos Santos

Análise de imunofluorescência de H3K9 e H2AX em lesões displásicas orais

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



João Lucas Trindade Fernandes dos Santos

Análise de imunofluorescência de H3K9 e H2AX em lesões displásicas orais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientador: Prof (a) Dr (a) Andreia Bufalino

Araraquara
2023

S237a Santos, João Lucas
Análise de imunofluorescência de H3K9 e H2AX em
lesões displásicas orais / João Lucas Santos. -- Araraquara,
2023
38 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Andreia Bufalino

1. Medicina Bucal. 2. Neoplasias bucais. 3. Leucoplasia
pilosa. 4. Leucoplasia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

João Lucas Trindade Fernandes dos Santos

Análise de imunofluorescência de H3K9 e H2AX em lesões displásicas orais

Orientador: Prof (a) Dr (a) Andreia Bufalino

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 30 de novembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, João Raphael e Adriana Camila que sempre acreditaram em mim e me deram todo o suporte que podiam para que conseguisse alcançar meus objetivos. Agradeço também a toda a minha família que sempre me deu muito carinho e apoio. E claro, a minha namorada Laura de Cássia que esteve comigo em todos os momentos me dando força e suporte para que eu chegasse onde estou agora.

Agradeço também a todos os meus amigos que fiz em Araraquara, em especial a Ana Beatriz, Ana Luiza, Felipe Camargo, Bruno Costa, Pedro Salvajoli e Lucas Palhares, que foram parte da minha família durante esses anos e me ajudaram muito com o suporte acadêmico e compartilharam momentos de amizade sincera que vou lembrar pelo resto da vida. E por fim agradecer aos meus irmãos da república Boate Azul que tornaram minha faculdade muito mais divertida e muito mais leve, me fazendo sentir parte de uma família de verdade que levarei para sempre, sem eles eu não teria chegado onde cheguei, agradeço especialmente aos que formam comigo Mateus Gabriel, Matheus Medeiros, João Victor, Davi Rafael e a minha dupla de faculdade que sempre me ajudou, me ensinou muito e que vou levar pra vida Aleksander Pereira.

À minha orientadora Andreia Bufalino que me ajudou muito e me deu todo o suporte durante nossa pesquisa.

À **FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2017/01438-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Santos JLTF. Análise de imunofluorescência de H3K9 e H2AX em lesões displásicas orais [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

Desordens potencialmente malignas orais (DPMO) são apresentações clínicas que apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de câncer. Atualmente, o grau de displasia epitelial é baseado em alterações epiteliais arquitetônicas e citológicas e é utilizado para prever a transformação maligna dessas lesões. No entanto, prever qual DPMO irá de fato progredir para um tumor maligno é muito desafiador. Neste sentido, os infiltrados inflamatórios podem favorecer o desenvolvimento de um câncer, e estudos recentes sugerem que essa associação com DPMO pode estar relacionada à etiologia e/ou comportamento clínico agressivo dessas lesões. Alterações epigenéticas, como modificações de histonas, podem mediar a inflamação crônica e também favorecer as células tumorais na resistência e evasão imunológica. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre acetilação de histonas (H3K9ac) e danos ao DNA no contexto de lesões displásicas com inflamação crônica proeminente. Neste estudo, leucoplasias orais (LO, n=24) classificadas como “baixo risco” (n=12) e “alto risco” (n=12) e hiperplasia fibrosa inflamatória (n=10), como grupo controle, foram submetidas à análise de imunofluorescência para avaliação dos níveis de acetilação de histonas e danos ao DNA através da fosforilação de H2AX (γ H2AX). Os resultados deste estudo demonstraram que nas amostras de LO classificadas como de “alto risco” as células inflamatórias subepiteliais foram bem mais frequentes do que nas amostras classificadas como de “baixo risco”. Adicionalmente, lesões displásicas orais mostraram hipoacetilação de H3K9 e baixos níveis de γ H2AX em comparação ao controle. Concluímos que a presença de inflamação crônica associada a lesões displásicas é capaz de promover alterações epigenéticas, que por sua vez podem favorecer o processo de transformação maligna.

Palavras – chave: Medicina bucal. Neoplasias bucais. Leucoplasia pilosa. Leucoplasia.

Santos JLTf. Immunofluorescence analysis of H3K9 and H2AX in oral dysplastic lesions [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Potentially Malignant Oral Disorders (PMODs) are clinical presentations that bear an increased risk of cancer development. Presently, the degree of epithelial dysplasia is based on architectural and cytological epithelial alterations and is utilized to predict the malignant transformation of these lesions. However, predicting which PMOD will indeed progress to a malignant tumor is highly challenging. In this regard, inflammatory infiltrates may foster cancer development, and recent studies suggest that this association with PMODs may be related to the etiology and/or aggressive clinical behavior of these lesions. Epigenetic changes, such as histone modifications, may mediate chronic inflammation and also favor tumor cells in resistance and immune evasion. This study aimed to evaluate the relationship between histone acetylation (H3K9ac) and DNA damage in the context of dysplastic lesions with prominent chronic inflammation. In this study, oral leukoplakia (OL, n=24) classified as "low risk" (n=12) and "high risk" (n=12) and inflammatory fibrous hyperplasia (n=10), as a control group, underwent immunofluorescence analysis to assess histone acetylation levels and DNA damage through phosphorylation of H2AX (γ H2AX). The results of this study demonstrated that in samples of OL classified as "high risk," subepithelial inflammatory cells were much more frequent than in samples classified as "low risk." Furthermore, oral dysplastic lesions showed H3K9 hypoacetylation and low levels of γ H2AX compared to the control. We conclude that the presence of chronic inflammation associated with dysplastic lesions can promote epigenetic changes, which in turn may favor the malignant transformation process.

Keywords: Oral medicine. Mouth neoplasms. Leukoplakia, Hairy, leukoplakia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 PROPOSIÇÃO.....	9
3 REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1 Desordens Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular	10
3.2 Epigenética e Modificação nas Histonas em Neoplasias Malignas.....	13
4 MATERIAL E MÉTODO.....	21
4.1 População de Estudo	21
4.2 Ensaio de Imunofluorescência.....	21
5 RESULTADO.....	24
6 DISCUSSÃO.....	26
7 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

A presença de desordens potencialmente malignas orais (DPMO) indica um risco aumentado de desenvolver câncer de lábio ou cavidade oral durante a vida do paciente; apesar disso, apenas uma pequena proporção destas lesões realmente progride para um câncer¹. Considerando todos as DPMO, a taxa global de transformação maligna estimada é de 7,9%². Análise histopatológica de biópsias DPMO pode mostrar evidências de displasia epitelial que fornece informações importantes sobre o prognóstico da condição^{3,4}. No entanto, prever quais lesões DPMO irão de fato progredir para um tumor maligno é muito desafiador.

A displasia epitelial é um espectro de alterações epiteliais arquitetônicas e citológicas causada pelo acúmulo de alterações genéticas e está associada a um risco aumentado de progressão para carcinoma espinocelular oral (CEC)^{1,4}. O estabelecimento do grau de displasia epitelial em DPMO é baseado nas características celulares epiteliais individuais e nas mudanças arquitetônicas que ocorrem no tecido epitelial⁴. Conseqüentemente, o termo displasia epitelial é aplicado a uma lesão na qual parte ou toda a espessura epitelial é substituída por células que apresentam graus variados de atipia celular⁵. Neste sentido, o sistema de três graus e o sistema binário são atualmente as principais ferramentas aplicadas propostas para prever a transformação maligna em DPMO⁴. Os eventos epigenéticos são responsáveis por regular a expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA, e pode ser observada durante a transformação maligna e carcinogênese⁵. A acetilação de histonas é um dos eventos epigenéticos mais estudados e parece influenciar vários processos celulares importantes, como a progressão do ciclo celular, reparo de DNA e apoptose⁶⁻⁸. As respostas imunológicas podem suprimir a tumorigênese, mas também contribuem para o início e progressão do câncer, sugerindo uma interação complexa entre o sistema imunológico e o câncer. As células cancerosas utilizam o silenciamento epigenético de genes relacionados ao sistema imunológico para escapar da resposta imune. Lesões inflamatórias crônicas como como líquen plano oral, leucoplasia, esôfago de Barrett e doenças inflamatórias intestinais estão associados à transformação maligna⁹. Assim, parece importante estudar a participação do infiltrado inflamatório nos processos celulares das lesões displásicas com o potencial de sofrer transformação maligna.

Neste contexto, o sistema imunológico pode identificar e destruir células pré-neoplásicas em um processo chamado imunovigilância do câncer, que funciona como uma importante defesa contra o desenvolvimento do câncer¹⁰⁻¹². Recentemente, dados obtidos de investigações em modelos tumorais em camundongos e em humanos com câncer oferecem evidências convincentes de que certos tipos de células do sistema imunológico, moléculas efetoras e vias específicas de imunidade inata e adaptativa podem às vezes funcionar coletivamente como mecanismos extrínsecos de supressão de tumor. No entanto, o sistema imunológico também pode promover a progressão do tumor por meio de um mecanismo chamado escape, na qual células pré-cancerosas ou cancerosas promovem a evasão imunológica^{10,13,14}. Assim, surgiu o conceito de imunoedição do câncer, o qual é constituído de três fases. Compreende a fase de eliminação, aquela em que o sistema imunológico reconhece e mata as células malignas; a fase de equilíbrio, na qual uma seleção imunológica de células tumorais ocorre em decorrência de uma imunogenicidade reduzida; e a fase de escape do desenvolvimento do tumor, na qual o sistema imunológico atua favorecendo a progressão tumoral¹⁰.

O conceito de imunovigilância tumoral pressupõe que o sistema imunológico pode reconhecer células potencialmente malignas e, na maioria dos casos, destruí-las antes que se tornem clinicamente aparente. Se a imunovigilância desempenha um papel importante na supressão tumoral, então poderíamos supor que os pacientes com DPMO exibiriam respostas imunológicas vigorosas para eliminar essas células anormais. Por outro lado, o infiltrado inflamatório também pode impactar os queratinócitos orais, resultando em alterações que podem favorecer os fenótipos tumorais e a transformação maligna do DPMO. No entanto, estudos que avaliam a participação do infiltrado inflamatório no processo de transformação maligna do displásico as lesões são escassos.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a acetilação de histonas (H3K9ac) e danos no DNA no contexto de lesões de displasia com inflamação crônica proeminente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para validar a pesquisa é importante definir alguns temas como as DPMPOs e a epigenética.

3.1 Desordens Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são apresentações clínicas que possuem risco aumentado de transformação maligna, seja em uma lesão clinicamente definida ou em uma mucosa clinicamente normal¹⁵. São consideradas como as principais 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 discoide e glossite sífilítica¹⁵⁻¹⁷. A leucoplasia oral (LO) é a principal DPMO, a qual possui uma incidência de 3,4% e uma taxa de transformação maligna que varia de 0,2% até 17,5%^{18,17}. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LO é definida como "uma placa branca de risco questionável definida após a exclusão de outras doenças ou distúrbios conhecidos que mimetizam este aspecto clínico, mas que não carregam nenhum risco conhecido para o câncer"¹⁵. Portanto, leucoplasia é considerado atualmente um termo clínico usado temporariamente como hipótese diagnóstica que implica na exclusão de outras lesões de aspecto similar e normalmente requer a realização de uma biópsia. A LO é mais frequente entre homens caucasianos acima de 40 anos, fumantes e sua prevalência aumenta com o avanço da idade¹⁹. As LOs podem exibir características clínicas similares entre si, mas apresentam um considerável grau de heterogeneidade microscópica. Segundo a OMS 2017, a LO pode se apresentar microscopicamente com aspectos que variam de hiperqueratose, hiperplasia sem ou com variados graus de displasia (leve, moderada ou severa) até um carcinoma *in situ*; sendo assim, a realização de uma biópsia é mandatória para o estabelecimento do diagnóstico definitivo e correto estabelecimento da conduta clínica¹⁵. Atualmente a avaliação destes achados microscópicos, a presença e severidade de mudanças arquitetônicas e de atipia celular, a displasia epitelial oral é utilizada para predizer o risco de transformação maligna deste grupo de lesões²⁰. No entanto, não há métodos objetivos ainda disponíveis para tipificar lesões displásicas e permitir resultados consistentes e

reprodutíveis, uma vez que nem todas as lesões orais com displasia progridem para uma neoplasia maligna²¹. Além disto, a utilidade desta subdivisão de displasia tem sido questionada devido à grande variabilidade inter e intra observador no que diz respeito a avaliação de presença/ausência e grau de displasia^{22,23}. Vale a pena destacar que a maioria das LOs convencionais permanecem benignas ao longo do tempo, caracterizando-se por acantose ou hiperqueratose com um pequeno grupo de lesões progredindo para displasias de alto grau ou carcinoma superficialmente invasivo^{16,17}. Assim, um dos maiores desafios entre os casos de LOs é o dilema de tentar prever quais lesões irão de fato progredir para uma neoplasia maligna, em particular o CEC oral.

Interessantemente, existe uma variante rara entre as leucoplasias que apresenta um comportamento único de persistente progressão para malignidade, conhecida como leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). O termo LVP foi definido pela primeira vez por Hansen e colaboradores²⁴ (1985), que descreveram uma desordem agressiva de etiologia desconhecida e tendência a se tornar multifocal ao longo do tempo. A LVP é caracterizada por placas brancas difusas e múltiplas, com prevalência quatro vezes maior no gênero feminino, sendo frequentemente diagnosticada a partir da sexta década de vida em indivíduos usualmente não fumantes, apresenta alta taxa de recorrência e um índice de transformação maligna que varia de 70 até 100% dos casos após acompanhamento a longo prazo²⁵⁻²⁸. Devemos destacar que o perfil epidemiológico da LO convencional se aproxima do observado no CEC oral, sendo associado ao uso do tabaco e apresentando maior incidência entre os homens. Em contrapartida na LVP isso parece não ocorrer, demonstrando um possível padrão biológico distinto entre LO e LVP. Esta apresentação clínica distinta associada ao comportamento biológico agressivo permitem que a LVP seja classificada como uma entidade distinta da LO convencional, sendo descrita pela OMS como a DPMO com maior risco de progressão para Carcinoma Verrucoso e CEC oral. Contudo, o diagnóstico definitivo da LVP deve ser realizado de forma retrospectiva com base na observação temporal das lesões, baseado em achados clínicos e histológicos que se desenvolve ao longo dos anos, embora as características clínicas nem sempre são fornecidas para conclusão do diagnóstico histológico²². Os vários estágios de evolução dentro do espectro histopatológico de LVP leva a dificuldade em estabelecer um diagnóstico final. Critérios foram já reformulados para permitir o diagnóstico precoce e melhor manejo

da doença, mas a inexistência de características clínicas e microscópicas específicas nas fases iniciais, juntamente com a terminologia diversa, faz com que o diagnóstico diferencial das lesões de LVP seja um desafio^{22,29,30}. O estudo de Upadhyaya JD e colaboradores²² (2019) mostrou que existe uma importante variabilidade interobservadores entre os patologistas no diagnóstico dos vários aspectos histológicos que as lesões de LVP podem apresentar, além da falta de terminologia padronizada, a qual causa dúvidas em relação ao manejo adequado dos pacientes com LVP.

Devemos destacar ainda, que a classificação proposta pela OMS enfatiza apenas os critérios microscópicos para definir o estágio clínico das DPMOs, baseado-se no grau de displasia¹⁵. Porém até o momento não existem preditores clínicos e histopatológicos validados para prever quais lesões irão de fato evoluir e progredir para malignidade. Neste contexto, a utilização de técnicas de biologia molecular em estudos com LO e LVP para melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes poderiam melhorar acentuadamente a eficácia na identificação dos pacientes com maior risco de transformação maligna^{31,32}. 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 disto, 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 LVP, podem auxiliar no desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficientes. O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide, representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral³³. Essa neoplasia maligna está associada com morbidade significativa e mortalidade. Mesmo com tratamentos abrangentes que incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a taxa de sobrevivência de 5 anos ainda compõe apenas 50% dos casos^{34,32}. Esses dados desanimadores estão atribuídos a vários fatores, os quais incluem estágio avançado da lesão no momento do diagnóstico, cancerização de campo e agressividade biológica inerente que inclui propensão a crescimento invasivo e disseminação metastática de linfonodos. Além disso, os tratamentos instituídos para este tipo de neoplasia maligna envolvem vários efeitos colaterais como complicações e morbidades que afetam a qualidade de vida dos pacientes³⁵. Por isso, tanto a prevenção primária que diz

respeito sobre evitar os fatores de risco como tabaco e álcool, quanto a prevenção secundária, a qual se dá por meio da detecção e gerenciamento precoce de lesões precursoras, conhecidas como DPMOs^{36,32}.

A transição de um epitélio normal para as DPMOs e para CEC oral é resultado de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que se tornam aberrantes e causam rearranjo cromossômico, mutações, metilação, entre outros, as quais afetam a expressão dos protocongenes e genes supressores de tumor³⁷⁻³⁹. Além disso, os aspectos clínicos e a presença de displasia epitelial são resultados de alterações moleculares que se acumulam com o tempo, levando a transformação maligna.

3.2 Epigenética e Modificação nas Histonas em Neoplasias Malignas

A partir da descoberta dos oncogenes no final da década de 1980 até o sequenciamento do genoma do câncer durante o *Cancer Genome Project* para os recentes achados usando a tecnologia de sequenciamento de DNA conhecidas como *Next Generation Sequencing* (NGS), é evidente que a paisagem genômica do câncer é muito mais complexa do que o previsto⁴⁰⁻⁴². Além das mutações genéticas, a carcinogênese pode ser influenciada por modificações nos mecanismos herdáveis e potencialmente reversíveis, denominados de mecanismos epigenéticos, que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA. Essas modificações epigenéticas podem provocar alterações globais na cromatina alterando a atividade transcricional através de metilação do DNA, ação de RNAs não codificadores e modificação de histonas⁴²⁻⁴⁴. Alterações nesses fatores podem contribuir para padrões epigenéticos anormais que podem favorecer a desregulação de genes críticos envolvidos na proliferação, morte celular programada e diferenciação celular^{45,46}. Evidências sugerem que a reprogramação epigenética de células tronco de câncer é um passo fundamental para as primeiras fases da progressão tumoral. Isto, promove a expansão clonal de células aberrantes, propensas a alterações genéticas e epigenéticas subsequentes, as quais estão associadas com a evolução neoplásica^{47,48}. Dessa forma, a combinação de alterações genéticas com as alterações epigenéticas, incluindo as modificações em histonas, estão associadas a evolução das DPMOs para o CEC oral, bem como as fases iniciais da carcinogênese^{39,49}. Dessa forma, as DPMOs são consideradas condições que

apresentam mudanças histopatológicas e moleculares as quais podem evoluir para o CEC oral⁵⁰.

As evidências de que há um silenciamento anormal de genes nas células de câncer foi um dos motivos pelo qual os estudos foram se redirecionando para as alterações epigenéticas⁴⁹. Um dos motivos para essa mudança no silenciamento de genes envolve a metilação do DNA em regiões promotoras, a qual tem como importante mecanismo a inativação de genes supressores de tumor⁵¹. Embora existam apenas 4 bases de DNA, há uma modificação covalente do DNA pós replicativo, o qual produz uma quinta base. Reações utilizando doadores de metil são catalisadas por uma enzima chamada DNA metiltransferase (DNMT), a qual adiciona um grupo metil ao anel de citosina. Essa modificação nos humanos ocorre apenas nas citosinas que precedem uma guanina, o que é conhecido como dinucleotídeo CpG⁵¹. Nas células de câncer a enzima DNMT1 parece ser responsável pela maior parte da capacidade de metilação do DNA e por isso pressupõe-se que ela seja o principal fator na manutenção da metilação anormal de genes promotores nas células neoplásicas⁵². Alguns trabalhos revelaram que as DNMTs podem contribuir para a cromatina transcricionalmente inativa junto com outras proteínas, como as histonas desacetilases, levando ao silenciamento da transcrição de genes⁵³.

As modificações envolvendo histona ocorrem pela acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação e sumoilação, influenciando diretamente o empacotamento do DNA e conseqüentemente aumentando ou reduzindo a transcrição⁴². Tais modificações são detectadas durante a plasticidade celular normal nos neurônios e linfócitos e desempenham um papel importante no comportamento do tumor⁵⁴⁻⁵⁶. Nas células tumorais, as modificações envolvendo histonas promovem dinamicamente a transcrição de proto-oncogenes e silenciam os genes supressores de tumores para apoiar a fisiologia desregulada do câncer^{37,38}. Contudo, devido aos poucos estudos avaliando as alterações epigenéticas em DPMOs, tem sido desafiador identificar marcadores epigenéticos iniciais associados ao desfecho clínico destas lesões e por isso, identificar a presença dessas alterações nos ajudaria a compreender os eventos epigenéticos que determinam a iniciação e progressão tumoral dentro das DPMOs.

Os nucleossomos são compostos por DNA, o qual se enrola em proteínas chamadas histonas que auxiliam no empacotamento do DNA e funcionam como uma matriz na qual o DNA se enrola. Elas estão associadas a funções importantes, incluindo a regulação da expressão de genes em vários tipos de tecidos. A

compactação do DNA é regulada em partes por meio de modificações pós-traducionais que ocorrem nas caudas das histonas, o que vai promover ou restringir a expressão de genes alvos⁵⁷. Ao compactarem o DNA, as histonas permitem que os genomas eucarióticos de grandes dimensões caibam dentro do núcleo das células. Atualmente, são reconhecidas 5 famílias de histonas, a H1 que auxilia a ligação entre os nucleossomos e a fita de DNA, e as histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam um octômero de histonas onde o DNA se enrola. Por exemplo, a Histona H3 e H4 estão diretamente relacionadas com a transcrição dos genes sendo altamente expressas^{58,59}. As histonas exibem caudas, agrupamentos amino-terminal (n-terminal), contendo diversos resíduos de aminoácidos conservados, principalmente de lisina (lis), serina (ser) e arginina (arg). Essas caudas se projetam para fora dos nucleossomos e, portanto, estão sujeitas a um número grande de modificações pós-traducionais^{42,60,61}.

A histona H2AX é uma variante da H2A, que junto com as outras histonas citadas acima, compõe o octâmero⁶². A H2A.X representa 2-25% do total de H2A e seus níveis são dependentes do tipo celular e do tecido [63]. Por meio do mecanismo de regulação translacional, níveis suficientes de H2A.X em G0 e G1 garantem o ciclo celular⁶⁴. O dano de DNA pode ocorrer como resultado de vários eventos como radiação ionizante, radioterapia, medicamentos, bem como também pode ocorrer como parte de processos fisiológicos⁶⁴⁻⁶⁵. As quebras de dupla fita de DNA refletem o dano ao DNA, o qual é identificado por meio da fosforilação de H2A.X (γ H2A). Este, é um marcador importante para detecção de quebras de duplas fita de DNA, as quais ocorrem durante a formação e progressão do câncer como resultado de fatores endógenos e exógenos. A fosforilação de H2A.X na serina 139 resulta na variante gama-H2A.X que é formada como resultado da instabilidade genômica⁶⁶. Assim, a gamma-H2A.X é a forma fosforilada de H2A.X, a qual funciona como um marcador sensível para detectar as quebras de dupla fita de DNA⁶². Além do papel funcional, a gama-H2A.x ou γ H2A.X tem um papel estrutural que contribui para o recrutamento efetivo de fatores de remodelação no local de reparo^{58,67}. A instabilidade genômica e as quebras de dupla fita de DNA são pressupostos para a derivação de células do ciclo celular normal e também para o desenvolvimento de câncer. Por isso tem-se estudado marcadores envolvidos nas etapas iniciais da carcinogênese e o γ H2A tem sido estudado em vários cânceres, pois sua detecção fornece uma medida sensível da quantidade de dano de DNA⁶⁶. Níveis elevados de γ H2A têm sido observados em

células de câncer cervical, células de melanoma, carcinomas de cólon, fibrossarcoma, glioma e células de neuroblastoma^{68,69}.

As mudanças dinâmicas na organização da estrutura da cromatina são movidas principalmente pela sua acetilação e desacetilação que determinam o status da cromatina (eucromatina ou heterocromatina) que por sua vez, influencia a acessibilidade e o recrutamento de fatores nucleares para o DNA, afetando a transcrição⁴². O processo de acetilação representa a adição de grupos acetil pelas enzimas histonas acetiltransferases (HATs) a resíduos de lisina localizados nas caudas das histonas fazendo com que as cargas positivas desses resíduos de lisina sejam neutralizadas e assim ocorra o enfraquecimento (relaxamento) da interação da cauda da histona com o DNA local carregado negativamente, induzindo abertura local, descompactando as estruturas da cromatina⁷⁰. Desta forma, o DNA local é exposto, aumentando o acesso de fatores de transcrição e promovendo aumentos significativos na transcrição do DNA⁷¹. As HATs intermediam a remodelação crucial da cromatina para diferenciação celular e proliferação⁵².

De forma oposta, ocorre a desacetilação onde grupos acetil são retirados pelas enzimas histonas desacetilases (HDACs). As HDAC promovem uma repressão transcricional e silenciamento gênico por criar uma cromatina condensada dessa forma, não acessível⁷². O equilíbrio entre a ação das HATs e HDACs garantem os níveis basais da acetilação do núcleo das histonas e influenciam o grau de compactação da cromatina desempenhando um papel regulatório da expressão gênica⁷³. Contudo, pode haver a acetilação em regiões específicas promotoras da transcrição gênica. O resíduo de lisina 9 é o mais estudado atualmente⁷⁴. A acetilação das histonas afeta a função dos cromossomos através de dois mecanismos distintos, (1) alterando a carga eletrostática das histonas e mudando as suas propriedades estruturais e ligantes do DNA, ou (2) podem criar, estabilizar, romper ou ocluir domínios de interação na cromatina para proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo ao DNA. Desta forma, fica evidenciado que alterações nas histonas constituem a principal categoria de controle transcricional epigenético⁷⁵. Quando há o desequilíbrio na acetilação e desacetilação das histonas, por alterações nas HATs e HDACs, em regiões promotoras há uma contribuição para a desregulação da expressão gênica que pode estar relacionada à carcinogênese e a progressão do tumor^{42,76-80}. Assim como mutações e variações no número de cópias de modificadores epigenéticos,

incluindo as enzimas HAT, HDAC, metiltransferases, desmetilases, podem coletivamente conduzir a progressão para o CEC oral⁸¹.

O silenciamento de alguns genes, através da compactação da cromatina pelas HDACs, está relacionado com a iniciação tumoral por meio da diminuição da função de genes como os inibidores do ciclo celular e da diferenciação e aumentando fatores promotores da carcinogênese como os responsáveis pela angiogênese, invasão, adesão e progressão. Além disso, as células tumorais malignas utilizam mecanismos de regulação epigenética para aumento da sobrevivência e resistência à apoptose^{82,83}. Tem sido descrito que a condensação da cromatina, através das HATs e HDACs, juntamente com fatores de transcrição é um determinante importante no controle da transição epitélio-mesênquima, ou seja, na aquisição de características mesenquimais pelas células epiteliais (EMT) e também no evento contrário, na transição mesênquima-epitelial (MET). A acetilação e desacetilação das histonas, ao contrário dos fatores de transcrição, pode ser passível de uso de inibidores e, portanto, uma estratégia na prevenção da EMT⁸⁴. Alguns estudos têm utilizados inibidores das enzimas-chave do processo de acetilação regulando as modificações das histonas que poderiam prevenir o aparecimento de EMT e a progressão tumoral⁸⁵. Por exemplo, no estudo de Yoshikawa e colaboradores⁸⁴ (2007), foi demonstrado que a inibição da HDAC, ou seja, a inibição da desacetilação, inibe a EMT induzida pelo TGF- β 1 em células epiteliais renais humanas. Além disso, baixos níveis de acetilação de H3K4 foram correlacionados com estágios avançados de CEC, tumor primário, linfonodos metastáticos e invasão perineural⁸⁶. Alguns estudos envolvendo as HDAC1, 2, 6, 8 e 9 mostraram que estas enzimas estavam hiper-reguladas em tecidos de CEC oral e estavam associadas a níveis avançados de CEC^{87,88}. Especificamente o aumento da expressão de HDCA1 demonstrou correlação com pacientes jovens, gênero masculino, pobre diferenciação e metástases⁷². Existem poucos estudos envolvendo a análise de acetilação de histonas em CEC de cabeça e pescoço. Noguchi e colaboradores⁸⁹ (2013) avaliaram a marcação imunistoquímica da histona desacetilase classe III (SIRT1), histona H3 lisina 9 acetilada (H3K9Ac), histona H4 lisina 16 acetilada (H4K16Ac) e p53 em CEC de cabeça e pescoço correlacionando com o prognóstico. Estes autores observaram que o aumento de H3K9Ac está associado com ausência de metástases em linfonodos, fase clínica inicial e CEC bem diferenciado. O trabalho de Toh e colaboradores⁹⁰ (2004) avaliou a imunomarcação de MTA1 (do inglês metastasis-associated protein 1) associada a metástases e sua

relação com a histona H4 desacetilada. Esses autores concluíram que um alto nível de histona H4 acetilada tem associação com melhor sobrevida de pacientes com CEC de esôfago⁹⁰.

A compreensão da relação de como as modificações epigenéticas atuam nas DPMOs irá permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam melhorar a taxa de recorrência e transformação maligna, em especial para os casos de LVP. Os resultados mais promissores envolvendo os inibidores de HDACs (iHDAC) estão relacionados com sua ação sinérgica a outros regimes terapêuticos, incluindo radioterapia, quimioterapia, inibidores de proteossoma dentre outros^{91,92}. Apesar de promissor, o uso potencial de iHDACs como parte de um novo regime terapêutico para o tratamento de CEC de cabeça e pescoço permanece pouco explorado. Um estudo *in vitro* com administração de iHDACs mostrou boas propriedades antitumorais, porém, como um agente único no tratamento clínico esses inibidores apresentaram resultados limitados⁴³. Por outro lado, a associação entre iHDACs adjuvante a radioterapia mostrou melhores resultados. Kim e colaboradores⁹³ (2010) avaliaram a eficácia farmacológica da combinação do inibidor de proteossoma PS-341, também conhecida como bortezomib, com tricostatina A, um iHDAC. Os autores observaram que a combinação destas drogas foi capaz de induzir sinergicamente apoptose em células de CEC de cabeça e pescoço.

Sabe-se que a inflamação crônica é um fator crucial na interface entre a genética e o meio ambiente e pode contribuir para o desenvolvimento do câncer, assim como foi indicado que alterações epigenéticas que ocorrem no câncer como o aumento da metilação do DNA e silenciamento de genes são aumentados nos tecidos inflamados⁹⁴. Os eventos imunoregulatorios que levam a persistência ao CEC oral continuam sendo estudados. O estudo publicado por Gasparoto e colaboradores⁹⁵ (2010) revelou um perfil de supressão de células T no sangue e no microambiente tumoral de pacientes com CEC oral. O líquen plano oral (LPO) é um exemplo de lesão autoimune mucocutânea crônica de etiologia desconhecida e reconhecida como sendo precursora de CEC oral, embora ainda existam resultados controversos sobre o LPO ser uma DPMO⁹⁶. Em 2015 Kaur J e Jacobs R⁹⁷ avaliaram os níveis séricos salivares de interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa) em LPO, LO e fibrose submucosa em comparação com controle saudável. Eles observaram um aumento nos níveis sérios de IL-6, IL-8 e TNF- α nas DPMOs estudadas em contraste com o controle assim como houve correlação forte

estabelecer estes níveis nas DPMOs e concluíram que estas citocinas salivares poderiam atuar como marcadores de diagnóstico para detecção de DMPOs. O estudo de Németh CG e colaboradores³⁴ (2019) avaliaram lesões de LPO, CEC oral e mucosa oral normal. Os pacientes com LPO apresentavam idade avançada, podendo significar maior exposição a fatores ambientais, influenciando padrões de mutação e acelerando o risco de câncer. Entretanto, em comparação com CEC oral, não foi possível identificar alterações genéticas recorrentes nas lesões de LPO, demonstrando maior instabilidade genética nas neoplasias, sendo esta instabilidade não significativa no LPO. Por outro lado, foi possível observar alterações no padrão de metilação do DNA de LPO e de CEC oral, comparando com tecido controle de mucosa oral normal. Curiosamente, foi encontrado um grande número de CpG hipermetilados em LPO igualmente ao observado em CEC oral, apoiando a hipótese de que o LPO é uma DPMO³⁴.

Como citado anteriormente, a etiologia do LPO é desconhecida, embora exista um consenso de que este distúrbio envolve o sistema imunológico. A presença de um infiltrado inflamatório crônico substancial composto principalmente por linfócitos T justa-epiteliais justificou a comparação do LPO com outras doenças inflamatórias com maior potencial de transformação maligna, incluindo pólipos de cólon, gastrite estomacal, lesões pré-neoplásicas brônquica e esôfago de Barrett^{98,99}. O estudo de Dillenburger e colaboradores¹⁰⁰ (2015) avaliou alterações epigenéticas em lesões de LPO observou que as lesões de LPO que tiveram resolução parcial e as que não responderam ao tratamento e recidivaram, estavam associadas a um aumento na acetilação de H3K9, bem como ao aumento de fosforilação de histona H2AX, a qual diz respeito a resposta de dano ao DNA, concluindo que existe uma instabilidade genômica nas lesões de LPO que não respondem ao tratamento.

Interessantemente, eventos epigenéticos têm sido associados ao desenvolvimento de inflamação crônica. Recentemente, Almeida LO e colaboradores¹⁰¹ (2013) mostraram que as modificações em histonas desempenham papel central na agressividade e resistência a quimioterapia observada no CEC de cabeça e pescoço por meio da regulação positiva do fator nuclear kappa de cadeia leve, molécula esta que está envolvida no desenvolvimento de câncer, doenças autoimunes e inflamação. Além disso, evidências emergentes indicam o envolvimento de modificação de histonas em condições inflamatórias como artrite reumatoide, doença pulmonar crônica obstrutiva e asma severa¹⁰². O fator de

transcrição Nf-kB desempenha papel central na indução de genes envolvidos na imunidade e inflamação e por isso surgiu a ideia de que a inibição de NF-kB poderia anular a sinalização de citocinas pro-inflamatórias e se tornar um alvo na artrite reumatoide¹⁰³. Curiosamente existem evidências de que a ligação de NF-kB aos seus alvos nucleossômicos requer alterações conformacionais de histonas para tornar seus locais de ligação acessíveis¹⁰⁴. Foi demonstrado que a sinalização pró-inflamatória iniciou modificações de histonas como acetilação da histona H3, fosfoacetilação da histona H4 e metilação reduzida de H3K9 e como consequência, aumentou o recrutamento de NF-kB e com isso, aumento várias citocinas e quimiocinas¹⁰⁵. Sabe-se que a interleucina 6 (IL-6) é uma citocina importante na patogênese da artrite reumatóide, a qual é induzida por NF-kB mas também inicia modificações epigenéticas. Verificou-se que no câncer a IL-6 melhorou e manteve a hipermetilacao do gene supressore de tumor p53¹⁰⁶. Existem vários dados que reforçam que a expressão de IL-6 em tumores altera os níveis de expressão de alguns micr- RNAs e sua regulação é dependente da metilação^{107,108}. Esses achados sustentam a hipótese de que um controle epigenético complexo está relacionado a respostas imunes e inflamatórias¹⁰².

Considerando o comportamento altamente recorrente e de progressão para CEC observado em pacientes com LVP, a utilização de modalidades terapêuticas envolvendo iHDACs pode representar uma estratégia inovadora para este grupo de pacientes. Assim, uma avaliação inicial do estado de acetilação da histona H3 e γ H2ax é fundamental para averiguar a real participação destes processos epigenéticos em pacientes com LVP. Devemos destacar que este será o primeiro estudo a comparar o estado de acetilação de histonas entre amostras de LO e LVP, com relação aos parâmetros clinicopatológicos destas DPMOs. Além disso, sabendo que a inflamação também pode estar associada aos eventos epigenéticos que ocorrem em lesões inflamatórias, vamos também avaliar se a presença dos PBMCs pode afetar os níveis de acetilação de histona e de fosforilação de DNA, bem como se o contato dos mesmos com os queratinócitos normais, displásicos e tumorais afeta a proliferação celular, ciclo celular e transição epitélio-mesênquima.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para realizar o estudo foram feitas as seguintes etapas.

4.1 População de Estudo

Este estudo foi conduzido após receber aprovação do comitê de ética local (CAAE: 34361814.9.0000.5416) e todos os participantes que concordaram em participar do estudo forneceram consentimento informado por escrito. Para este estudo o tamanho da amostra foi calculado para todos os grupos utilizando os seguintes parâmetros: diferença mínima de médias desvio padrão do erro padrão $\alpha = 0,05$ poder de teste e número de tratamentos, o que resultou em um número mínimo de 4 amostras para cada grupo. Assim, foram incluídos neste estudo 24 blocos parafinados oriundo de pacientes que histologicamente revelaram algum grau de displasia. Adicionalmente, as lâminas coradas com hematoxilina e Eosina (H&E) foram reavaliadas e a presença e intensidade do infiltrado inflamatório foram determinados por dois patologistas de forma independente. Para esta análise, 5 campos representativos foram avaliados em alta resolução (400x), e foi determinado o valor médio de cada amostra. Posteriormente, as amostras foram classificadas de acordo com a potencial suscetibilidade para transformação maligna em “baixo risco” e “alto risco”, segundo o sistema binário proposto por Kujan e colaboradores, 2006 ²¹. Além disso, um total de 10 amostras de hiperplasia fibrosa (HFI) foram utilizados como grupo controle no ensaio de imunofluorescência (IF), pois essas lesões exibem muitas áreas de inflamação crônica na lâmina própria e não apresentam potencial de transformação maligna.

4.2 Ensaio de Imunofluorescência

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos com 5m de espessura para a realização da reação de IF. Os cortes obtidos foram submetidos à técnica de IF por um método já descrito¹¹ porém com algumas modificações. Inicialmente as lâminas foram submetidas ao processo de desparafinização com xilol na estufa à 60°C durante 1 hora. Nos primeiros 15 minutos as lâminas e o xilol foram colocados dentro da estufa por 45 minutos e posteriormente imersas em solução de

desparafinização. Em seguida foram realizadas as etapas de hidratação em etanol 100%, etanol 90% e etanol 70%, por 5 minutos e posteriormente em água destilada por 5-10 minutos. Depois, foi realizada a recuperação antigênica em micro-ondas com ácido cítrico anidro (Fisher Scientific #BP339-500). Em seguida, as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente durante 20 minutos e depois lavadas com água destilada, seguida da lavagem com PBS 1x durante 5 minutos. O bloqueio foi realizado com albumina de soro bovino 1% (BSA) e Triton 0,1% em solução tampão de fosfatosalino (PBS) durante 45 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário diluído em solução de PBS com BSA 1% overnight na geladeira. Os anticorpos primários utilizados foram acetil-histona H3(Lys9) (Cell Signalling #9683S) na diluição de 1:400, conjugado (Alexa 488) e γ H2A.X(phospho S139) (EMD #JBW301), na diluição de 1:200. Após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1x em ambiente protegido de luz, durante 5 minutos cada lavagem, seguida da incubação com o anticorpo secundário. Para o anticorpo fosfohistona H2AX (Ser139) utilizamos o anticorpo secundário anti-mouse (532nm). Todos os anticorpos secundários foram diluídos em PBS+BSA 1% na concentração de 1:200 e incubados à temperatura ambiente durante 60 minutos no escuro. Após um ciclo de 3 lavagens em PBS 1x durante 5 minutos, foi realizada a marcação do DNA com HOECHST 33342 (Thermo Fisher Scientific). As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x por 5 minutos seguida da lavagem com água destilada por 2 vezes por 5 minutos, ambas no escuro. As lâminas foram montadas com fluorshield (Sigma-Aldrich #F6182) e foram feitas imagens de 4 a 6 campos de cada caso e capturadas a uma amplificação de 20x utilizando uma câmera digital monocromática QImaging-ExiAqua acoplada a um microscópio Nikon Eclipse 80i (Nikon, Melville, NY) e analisadas utilizando o Nikon Imaging Software (NIS) – Elements (Nikon Instruments Inc; Melville, NY, EUA). A intensidade de marcação foi avaliada em cinco campos representativos das áreas fotografadas de cada caso utilizando o software Image J (versão 1.52, NIH, Bethesda, MD, EUA). As quantificações foram realizadas cegamente pelo bolsista nas 34 amostras e posteriormente os resultados obtidos foram correlacionados com os respectivos diagnósticos. Os dados foram tabulados e a distribuição normal ou não normal foi determinada por testes de normalidade e pela análise descritiva de Skewness and Kurtosis para posterior aplicação de testes estatísticos adequados. Quando apropriado, alguns resultados foram avaliados também de forma descritiva/qualitativa.

O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ($p=0.05$) utilizado o software estatístico SPSS versão 19.

5 RESULTADO

Neste estudo, mostramos que a frequência de células inflamatórias subepiteliais foi significativamente maior em amostras classificadas como “alto risco” em comparação com amostras de “baixo risco” (IC 95%: 0,000 até 93,20; $p = 0,006$), apresentando predominantemente infiltrado inflamatório linfoplasmocitário crônico (Figura 1). Além disso, foi demonstrado por meio de imunofluorescência que lesões orais displásicas apresentam hipoacetilação de H3K9 e baixa níveis de γ H2AX em comparação ao grupo controle (IFH). Considerando a intensidade do H3K9ac de marcação, houve uma redução estatisticamente significativa nos níveis de H3K9ac entre os grupos “baixo risco” (IC 95%: 2.854,89 até 6.274,81; $p < 0,001$) e “alto risco” (IC 95%: 467,65 até 3.993,28; $p = 0,01$) em comparação ao grupo controle, bem como uma redução significativa dos níveis de H3K9ac entre o grupo de baixo risco e o grupo de alto risco (IC 95%: -3.549,90 até -1.118,87; $p < 0,001$). Por outro lado, a porcentagem de células positivas para H3K9ac na região intraepitelial foi menor no grupo de “baixo risco” em comparação ao grupo controle (IC 95%: -30,61 até -4,45; $p = 0,006$). Além disso, os níveis de fosforilação do H2AX diminuíram em lesões do grupo de “alto risco” quando comparadas a lesões de “baixo risco” (IC 95%: -0,76 até -0,06; $p = 0,015$) e controle (IC 95%: -1,50 até -1,97; $p = 0,009$). A Figura 2 mostra as imagens representativas do H3K9ac e imunofluorescência γ H2AX e gráficos de análise quantitativa.

Figura 1 - Imagem histológica das lesões de alto e baixo risco

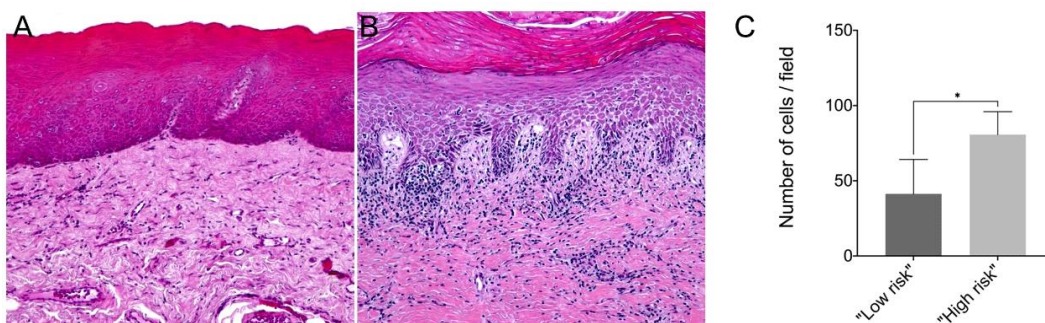
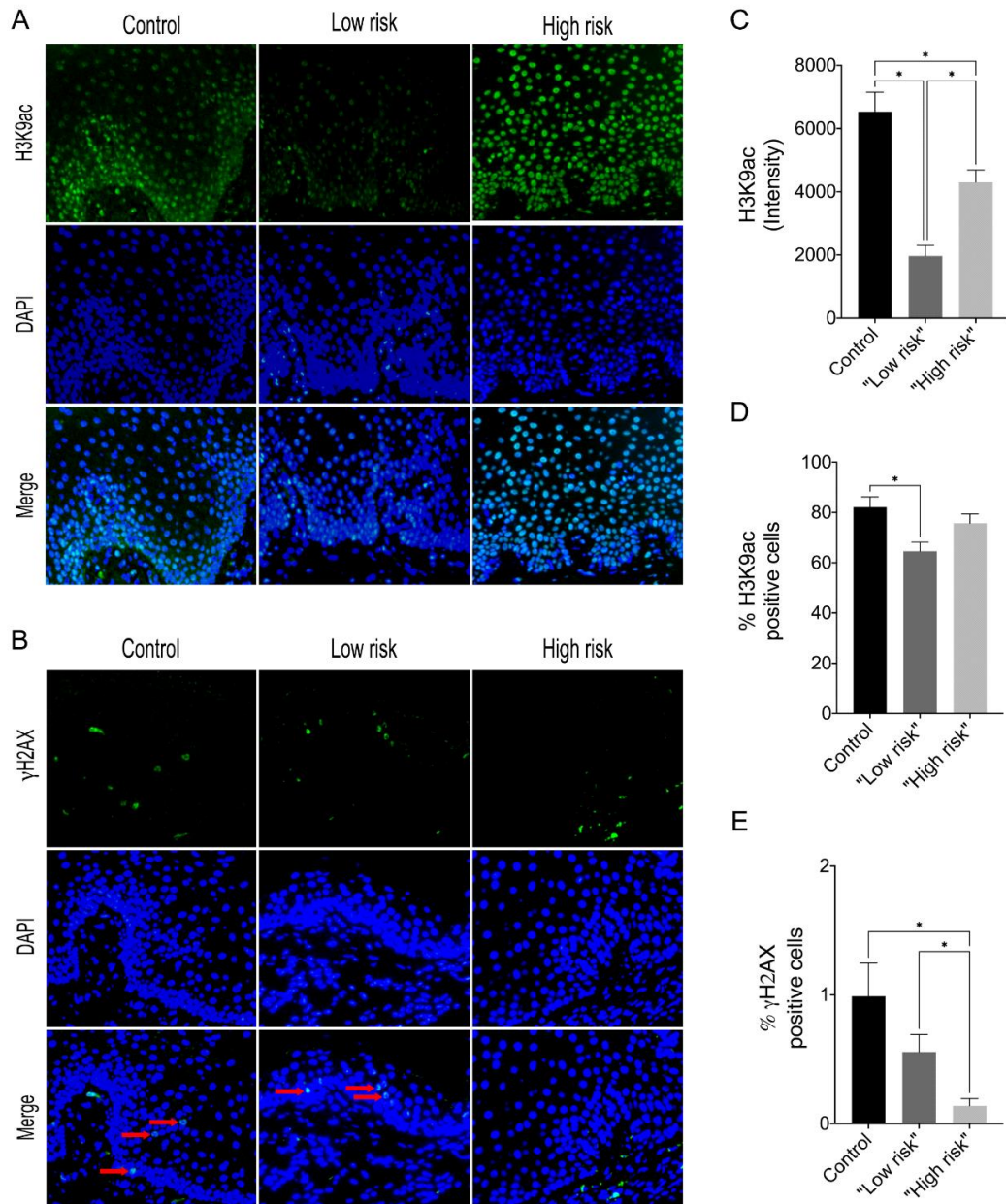


Imagem representativa da coloração hematoxilina-eosina (HE) de uma biópsia de lesão de "baixo risco" (A) e uma biópsia de lesão de "alto risco" (B); (C) Número de células inflamatórias por campo em amostras de lesões "baixo risco" e "alto risco". A média do número de células imunes contadas por campo em amostras de tecido incluído em parafina de lesões de "baixo risco" e "alto risco". * $p < 0,05$.

Fonte Arquivo pessoal do autor.

Figura 2 - Imagem de imunofluorescência do grupo controle, lesões de baixo e alto risco



Imagens representativas da análise de imunofluorescência para (A) H3K9ac e (B) γ H2AX nos grupos de controle, "baixo risco" e "alto risco" (Alexa Fluor 488, 40 \times). (C) Gráficos de análise quantitativa da intensidade de imunofluorescência de H3K9ac, (D) Porcentagem do número total de células positivas para H3K9ac (E) Porcentagem do número total de células positivas para γ H2AX. * $p < 0,05$.

Fonte Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram avaliadas alterações epigenéticas em lesões displásicas orais envolvendo histonas e, também, indiretamente o acúmulo de danos ao DNA por meio da análise de imunofluorescência para H3K9ac e γ H2AX. Nossos resultados mostraram uma possível associação entre o grau de displasia e modificação de histonas. Neste sentido, foi demonstrado que tanto as lesões displásicas de “alto risco” quanto as de “baixo risco” apresentaram hipoacetilação de H3K9 quando comparadas com o grupo controle.

Alterações epigenéticas como o desequilíbrio da acetilação de histonas em regiões promotoras contribuem para a desregulação da expressão gênica e têm sido associadas à carcinogênese e progressão do câncer. Previamente foi observado que a hiperfosforilação de H2AX e a hiperacetilação do H3K9 são mais frequentemente observadas em OSCC e DPMO¹⁰⁹. Níveis elevados de H3K9ac também foram observados em lesões de líquen plano oral que não responderam bem ao tratamento e apresentam recaída¹¹⁰. Além disso, os níveis reduzidos de H3K9ac e H4K12ac, bem como níveis reduzidos de metilação foram observados na queilite actínica, sugerindo uma associação com os danos iniciais da queilite actínica, mas não essencialmente à transformação maligna¹¹¹. Curiosamente, estas últimas lesões compõem o grupo DPMO, sugerindo então que níveis elevados de H3K9ac podem prever lesões recorrentes e sem resposta e, inversamente, níveis reduzidos de H3K9ac podem iniciar juntamente com o aparecimento de alterações na displasia epitelial. Também foi demonstrado que níveis elevados de H3K9ac em lesões de leucoplasia oral em comparação com mucosa normal, porém sem diferença estatisticamente significativa¹¹². Em contraste, outro estudo encontrou uma relação entre hipoacetilação de H3K9ac em lesões de CECO e um pior prognóstico¹¹⁰. Isto pode sugerir que a perda da acetilação da histona H3K9 pode ocorrer como um evento tardio na carcinogênese.

O γ H2AX é um participante chave na resposta a danos no DNA e no mecanismo de reparo. Quando ocorre uma quebra de fita dupla (DSB), a proteína histona 2A (H2A) é fosforilada, formando a forma modificada γ H2AX. Esta modificação serve como um marcador para DSBs, pois pode ser detectado como coloração pontilhada no núcleo. A presença de γ H2AX é um confiável indicador de DSBs, que pode ajudar a orientar o processo de reparo. Além disso, também está envolvido no recrutamento

de proteínas envolvidas no processo de reparo, como enzimas de reparo de DNA, proteínas de checkpoint de danos ao DNA e proteínas de remodelação da cromatina¹¹³. Um estudo anterior revelou que nas células epiteliais da mucosa oral não é possível detectar γ H2AX fosforilado¹¹³. Além disso, em comparação com CEC oral, os níveis de expressão de γ H2AX aumentam significativamente na hiperplasia e displasia epitelial oral, sendo significativamente elevado na displasia em relação aos outros grupos¹¹⁴. Em contrapartida, nossos resultados mostraram que os níveis de γ H2AX em lesões de “baixo risco” e “alto risco” diminuíram em comparação com o controle, com lesões de “alto risco” apresentando o nível mais baixo de γ H2AX. Contudo, diferente do nosso estudo, os autores não utilizaram o sistema de classificação binária (alto/baixo risco) de displasia, e o padrão de marcação γ H2AX nas amostras não foi avaliado de acordo ao grau de displasia. Adicionalmente, avaliamos a expressão de γ H2AX dentro de um contexto de inflamação, utilizando amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória como grupo controle, sendo que estas amostras apresentam intenso infiltrado inflamatório crônico, diferentemente da mucosa oral normal. Assim, podemos sugerir que nos grupos controle e lesões displásicas classificadas como de “baixo risco”, o controle de reparo está sendo ativado de forma mais eficaz, evitando que células anormais continuem a proliferar. No grupo de “alto risco”, porém, esse processo de reparação não está sendo bem recrutado, o que pode justificar as altas taxas de transformação maligna nesse grupo, conforme descrito na literatura.

7 CONCLUSÃO

Foi concluído que a perda de acetilação de H3K9 pode ser um evento tardio na progressão do câncer. Além disso, nossos resultados mostraram que os níveis de γ H2AX nas lesões classificadas como alto risco e baixo risco diminuíram em relação ao grupo de controle. As lesões classificadas como alto risco apresentaram os níveis mais baixos de γ H2AX e o processo de reparo do DNA pode estar comprometido no grupo de alto risco o que pode contribuir para as taxas mais elevadas de transformação maligna observadas nesse grupo, conforme relatado na literatura.

REFERÊNCIAS*

1. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR et al. Oral potentially malignant disorders. a consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021; 27(8): 1862–80.
2. Locca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: a systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck.* 2020; 42(3): 539–55.
3. Woo SB. Oral epithelial dysplasia and premalignancy. *Head Neck Pathol.* 2019; 13(3): 423–39.
4. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan, P. Oral epithelial dysplasia: recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis.* 2021; 27(8): 1947–76.
5. Tilakaratne WM, Jayasooriya PR, Jayasuriya NS, De Silva RK. Oral epithelial dysplasia. causes, quantification, prognosis, and management challenges. *Periodontology 2000.* 2019; 80(1): 126–47.
6. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet.* 2011; 81(4): 303–11.
7. Martins MD, Castilho RM. Histones. controlling tumor signaling circuitry. *J. carcinog. mutagen.* 2013; 1 (Suppl. S5): 1–12.
8. Gong F, Chiu LY, Miller KM. Acetylation reader proteins. linking acetylation signaling to genome maintenance and cancer. *PLOS Genet.* 2016(9); 12: e1006272.
9. Kawanishi S, Ohnishi S, Ma N, Hiraku Y, Murata M. Crosstalk between DNA damage and Inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(8): 1808.
10. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting. from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002; 3(11): 991–8.
11. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three es of cancer immunoeediting. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22: 329–60.
12. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoeediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006(6); 90: 1–50.
13. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 2011; 29: 235–71.
14. McCoach CE, Bivona TG. The evolving understanding of immunoeediting and the clinical impact of immune escape. *J. Thorac. Dis.* 2018; 10(3): 1248–52.

15. El Naggar AK, Chan JCK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017(2).
16. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):317-23.
17. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):423-5.
18. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8):770-80.
19. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent.* 2010;2010:186018.
20. 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 Jun;125(6):591-602.
21. 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.
22. Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Cohen DM, Bilodeau EA, Bhattacharyya I, Lewis Jr JS 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.* 2019 Apr 10 (1):156-165
23. 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 Sep;27(8):376-81.
24. 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.
25. Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis.* 2010; 16(4): 328-32.
26. 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 Aug;32(7):379-82.
27. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-A Diagnostic and Management Algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Apr;75(4):723-34.
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(6):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(3):e411–3.
31. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract*. 2002; 11(1): 32-5.
32. 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 Jun;125(6):650-69
33. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009 Sep;15(6):388-99.
34. 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 Apr 9;14(4):e0215055.
35. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, Heavilin N, Zumsteg ZS. 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 Dec;6(12):2918-31.
36. Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR, Carrassi A, MacDonald LC, Worthington HV. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Jul 29(7):CD001829.
37. Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, Partridge M, Peterson DE, Woo SB. Genetics/epigenetics of oral premalignancy:current status and future research. *Oral Dis*. 2011 Apr;17 Suppl 1:7-22.
38. D'Souza W, Saranath D. Clinical implications of epigenetic regulation in oral cancer. *Oral Oncol*. 2015 Dec;51(12):1061-8.
39. 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 (4):719-732.
40. Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future Oncol*. 2012 Nov;8(11):1407-25.

41. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic disregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(2):2331–53.
42. Martins MD, Castilho RM. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *J Carcinog Mutagen.* 2013 Jul 29;1(Suppl 5):1-12.
43. 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 Nov;6(11):2967-75.
44. Blancafort P, Jin J, Frye S. Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules. *Mol Pharmacol.* 2013. Mar;83(3):563-76.
45. Murtha M, Esteller M. Extraordinary Cancer Epigenomics: Thinking Outside the Classical Coding and Promoter Box. *Trends Cancer.* 2016 Oct;2(10):572-84.
46. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008 Mar 13;358(11):1148-59.
47. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell.* 2014 Jun 5;54(5):716-27.
48. Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006 Jan;7(1):21-33. Review.
49. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4):683-92. Review.
50. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Jun;125(6):612-27.
51. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042–54.
52. 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(7):687-92
53. Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 2000;24(1):88-91
54. 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.
55. 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.

56. Audia JE, Campbell RM. Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016 Apr 1;8(4):a019521.
57. Fink M, Imholz D, Thoma F. Contribution of the serine 129 of histone H2A to chromatin structure. *Mol Cell Biol* 2007; 27(10): 3589-600.
58. Reddy MA, Park JT, Natarajan R. Epigenetic modifications and diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin Pract.* 2012 Sep;31(3):139-50.
59. 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 Sep 16;146(6):1016-28.
60. Lawlor ER, Thiele CJ. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. *Clin Cancer Res.* 2012 May 15;18(10):2768-79.
61. Ausio J. Histone variants—the structure behind the function. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2006; 5(3): 228–43.
62. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner MW. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation (10):5858-68.
63. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(12): 957–67.
64. Jeggo PA and Lobrich M. DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? *Oncogene* 2007; 26(56): 7717–19. 7.
65. Ding D, Zhang Y, Wang J, 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.
66. Palla VV, Karaolani 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 Mar;39(3):1010428317695931.
67. Pinto DM, Flaus A. Structure and function of histone H2AX. *Subcell Biochem.* 2010; 50:55-78.
68. Yu T, MacPhail SH, Banáth JP, et al. 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.
69. 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 Nov;55(11):1833-42.
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 Nov;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 Jun;83(3):344-53.
72. Theocharis S, Klijanienko J, Giaginis C, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, Alexandrou P, Sastre-Garau X. Histone deacetylase-1 and -2 expression in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *J Oral Pathol Med.* 2011 Oct;40(9):706-14.
73. Wade PA, Kikyo N. Chromatin remodeling in nuclear cloning. *Eur J Biochem.* 2002 May;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 Mar; 983:84-100.
75. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;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 Nov 1;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 Jun 30;435(7046):1262-6
79. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol.* 2007 Jun;1(1):19-25.
80. Yuan Y, Wei Y, Yu J, Huang LQ. Relationship of epigenetic and Dao-di herbs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2015 Jul;40(13):2679-83.
81. Martin D, Abba MC, Molinolo AA, Vitale-Cross L, Wang Z, Zaida M, Delic NC, Samuels Y, Lyons JG, Gutkind JS. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget.* 2014 Oct 15;5(19):8906-23.
82. 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 Mar 11;32(5):1654-65.
83. 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 Sep;5(9):2203-10.
84. 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 Jan;18(1):58-65.

85. 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.
86. Chen YW, Kao SY, Wang HJ, Yang MH. Histone modification patterns correlate with patient outcome in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013 Dec 15;119(24):4259-67.
87. 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 Jul;45(7):610-4.
88. Sakuma T, Uzawa K, Onda T, Shiiba M, Yokoe H, Shibahara T, Tanzawa H. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2006 Jul;29(1):117-24.
89. 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 Mar;115(3):385-92.
90. 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 Jun 20;110(3):362-7.
91. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol*. 2011 Feb;7(2):263-83.
92. 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.
93. 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 Jul;9(7):1977-84.
94. Brower V. Epigenetics: Unravelling the cancer code. *Nature*. 2011 Mar 24;471(7339):S12-3.
95. 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 Jun;59(6):819-28.
96. 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.

97. Kaur J, Jacobs R. Proinflammatory cytokine levels in oral lichen planus, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2015 Aug;41(4):171-5.
98. Shanmugam MK, Sethi G. Role of epigenetics in inflammation-associated diseases. *Subcell Biochem.* 2013;61:627-57.
99. Niwa T, Ushijima T. Induction of epigenetic alterations by chronic inflammation and its significance on carcinogenesis. *Adv Genet.* 2010;71:41-56.
100. 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.
101. Almeida LO, Abrahao AC, Rosseli-Murai LK et al. NF κ B mediates cisplatin resistance through histone modifications in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *FEBS Open Biol.* 2013; 30; 96–104.
102. Strietholt S, Maurer B, Peters MA, Pap T, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):219.
103. Roman-Blas JA, Jimenez SA: NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006, 14(9):839-48.
104. 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(6):1114-31
105. Sacconi S, Natoli G: Dynamic changes in histone H3 Lys 9 methylation occurring at tightly regulated inducible inflammatory genes. *Genes Dev* 2002, 16:2219-24. 80.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Castilho RM, Squarize C, Leelahavanichkul K, Zheng Y, Bugge T, Gutkind JS. Rac1 is required for epithelial stem cell function during dermal and oral mucosal wound healing but not for tissue homeostasis in mice. *PLoS ONE* 2010; 5(5): e10503

110. 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.
111. de Freitas Filho SA, Servato JP, de Sá RT, Siqueira CS, de Faria PR, Loyola AM, et al. Evaluation of specific modified histones in lip carcinogenesis. *Pathol. Res. Pract.* 2018; 214(6): 876–80.
112. Webber LP, Wagner VP, Curra M, A Vargas P, 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.
113. 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.
114. Chou SJ, Alawi F. Expression of DNA damage response biomarkers during oral carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* 2011; 111(3): 346–53.