



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 à **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 comportment. 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 sífilítica¹.

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 sobrevida 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.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação de alterações epigenéticas envolvendo histonas em lesões de LO e LVP.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Analisar os níveis de acetilação de histonas H3 em lesões de LO e LVP;
- b) Analisar indiretamente o acúmulo de danos no DNA por meio da marcação com γ H2ax em lesões de LO e LVP;
- c) Determinar se os níveis de acetilação de histona H3 em linhagens celulares displásicas e tumorais da cavidade oral sofrem alteração pelo contato direto com células polimorfonucleares (PBMCs) e se tal alteração pode impactar na aquisição de características mesenquimais pelas células epiteliais (TEM) ou alterar nos níveis de marcadores de proliferação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Desordens Potencialmente Malignas da Mucosa Oral 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 normal¹. 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 sifilítica^{1,22,23}. 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%^{3,23}. 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"¹. Portanto, leucoplasia é considerada 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 idade²⁴. 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 clínica¹. 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 lesões²⁵. 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 maligna⁸. 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^{7,26}. 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^{22,23}. 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 colaboradores²⁷ (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 prazo^{4-6,28}. 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 histológico⁷. 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^{7,29,30}. O estudo de Upadhyaya JD e colaboradores⁷ (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, baseando-se no grau de displasia¹. 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^{21,31}. 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 oral¹⁰. Essa neoplasia maligna está associada com morbidade significativa e mortalidade. Mesmo com tratamentos abrangentes que incluem cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a taxa de sobrevida de 5 anos ainda compõe apenas 50% dos casos^{9,31}. 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 pacientes³². 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^{33,31}.

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 tumor^{12,34,35}. 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 previsto^{11,36,37}. 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^{37,38}. 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 histonas^{16,18,37}. 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^{39,40}. 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 neoplásica⁴¹⁻⁴³. 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^{35,44}. Dessa forma, as DPMOs são consideradas condições que

apresentam mudanças histopatológicas e moleculares as quais podem evoluir para o CEC oral⁴⁵.

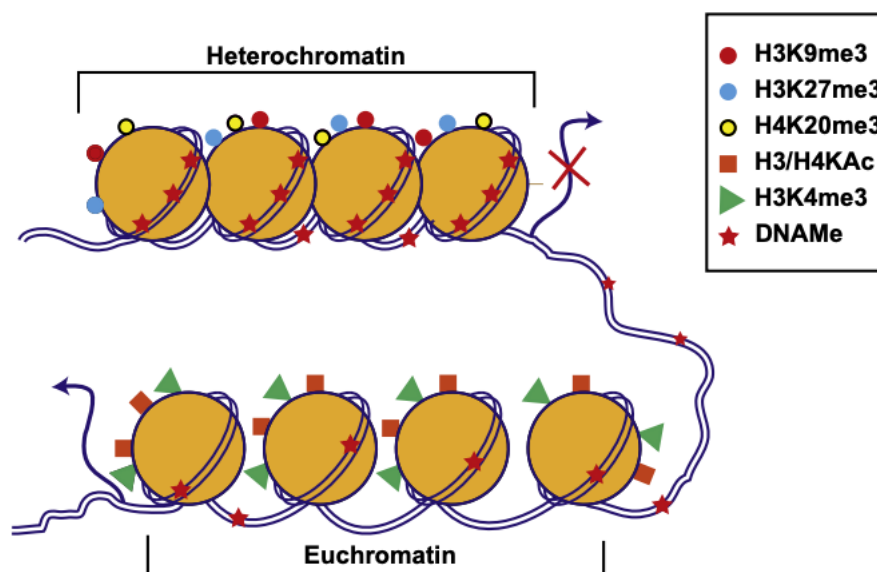
As evidências de que há um silenciamento anormal de genes nas células de câncer foi um dos motivos pelo qual os estudos foram se redirecionando para as alterações epigenéticas⁴⁴. Um dos motivos para essa mudança no silenciamento de genes envolve a metilação do DNA em regiões promotoras, a qual tem como importante mecanismo a inativação de genes supressores de tumor⁴⁶. 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 CpG⁴⁶. 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 neoplásicas⁴⁷. 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 genes⁴⁸.

As modificações envolvendo histona ocorrem pela acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação e sumoilação, influenciando diretamente o empacotamento do DNA e consequentemente aumentando ou reduzindo a transcrição³⁷. Tais modificações são detectadas durante a plasticidade celular normal nos neurônios e linfócitos e desempenham um papel importante no comportamento do tumor⁴⁹⁻⁵¹. 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^{12,34}. 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 alvos¹⁴. 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 (figura 1). Por exemplo, a Histona H3 e H4 estão diretamente relacionadas com a transcrição dos genes sendo altamente expressas^{52,53}. 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^{37,54,55}.

Figura 1 - Ilustração da estrutura da cromatina



Composta por unidades repetidas de nucleossomos, os quais nada mais são do que um carretel composto por DNA e proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4). Estas proteínas exibem caudas pós-traducionais que estão sujeitas a modificações. Os efeitos das modificações nas histonas, bem como da metilação do DNA (DNAme) regulam a estrutura da cromatina entre heterocromatina e eucromatina. Os padrões de Metilação de DNA e modificações em histonas em todo o genoma são referidos como “epigenoma”. A resposta a sinais externos e interno regula a expressão gênica em diversos processos biológicos e condições de doença.

Fonte: Redd et al⁵³.

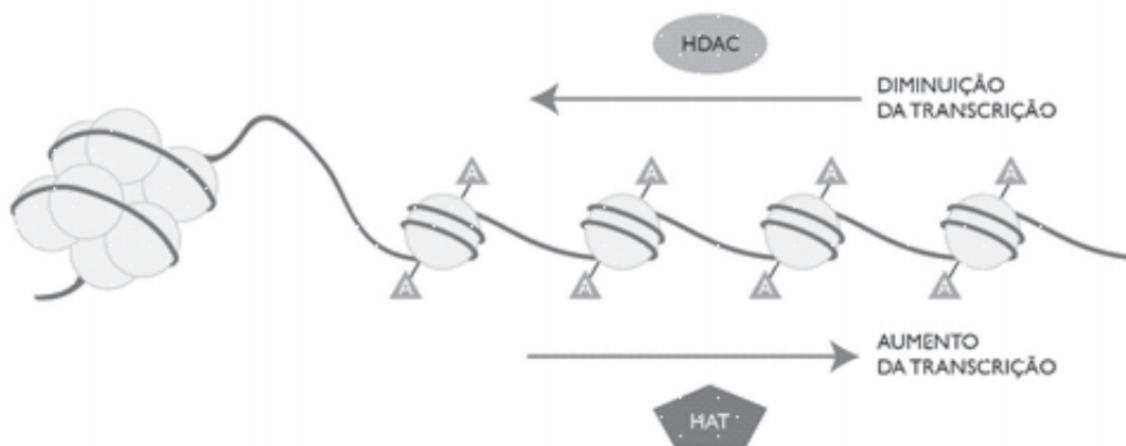
A histona H2AX é uma variante da H2A, que junto com as outras histonas citadas acima, compõe o octâmero⁵⁶. A H2A.X representa 2-25% do total de H2A e seus níveis são dependentes do tipo celular e do tecido⁵⁷. Através do mecanismo de regulação translacional, níveis suficientes de H2A.X em G0 e G1 garantem o ciclo celular⁵⁸. 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 fisiológicos⁵⁹⁻⁶¹. 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 genômica⁶². 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^{52,63}. 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 DNA⁶². Níveis elevados de γ H2A têm sido observados em células de câncer cervical, células de melanoma, carcinomas de cólon, fibrossarcoma, glioma e células de neuroblastoma⁶⁴⁻⁶⁸.

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 transcrição^{37,69}. 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 proliferação³⁵.

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 (figura 2). 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^{37,76-80}. 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.

Figura 2 - Modulação dos níveis de acetilação de histonas através do sistema HAT-HDAC



Arte: Ana Kelly Vogt Kommers.

Fonte: Siqueira, Elsner⁸².

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^{83,84}. 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 e também no evento contrário, na transição mesênquima-epitelial (TEM). 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 TEM⁸⁵. Alguns estudos têm utilizados inibidores das enzimas-chave do processo de acetilação regulando as modificações das histonas que poderiam prevenir o aparecimento de TEM e a progressão tumoral⁸⁵⁻⁸⁸. Por exemplo, no estudo de Yoshikawa e colaboradores⁸⁵ (2007), foi demonstrado que a inibição da HDAC, ou

seja, a inibição da desacetilação, inibe a TEM 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 perineural⁸⁹. 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^{90,91}. 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 colaboradores⁹² (2013) avaliaram a marcação imunoistoquímica 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 colaboradores⁹³ (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 esôfago⁹³.

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^{94,95}. 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 limitados¹⁶. Por outro lado, a associação entre iHDACs adjuvante a radioterapia mostrou melhores resultados⁹⁶. Kim e colaboradores⁹⁷ (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. Por outro lado, o estudo de Erlich e colaboradores⁹⁸ (2012) avaliou os efeitos antitumorais de novos inibidores PI3K e duplos PI3K-mTOR de nova geração, isoladamente ou em associação com iHDACs em um modelo de CEC de cabeça e pescoço. A fosfatidilinositol-3-fosfato cinase, AKT e inibidores duplos de PI3K-mTOR causaram aumento acentuado da citotoxicidade induzida por iHDACs em células cancerígenas de CEC de cabeça e pescoço in vitro. Os iHDACs e inibidores de fosfatidilinositol-3-fosfato-quinase (PI3KIs) inibiram o crescimento tumoral em modelos de xenoenxerto de CEC de cabeça e pescoço. No entanto, não houve evidências de eficácia aprimorada com uma combinação de iHDAC e PI3KI⁹⁸.

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 inflamados⁹⁹. Os eventos imunoregulatorios que levam a persistência ao CEC oral continuam sendo estudados. O estudo publicado por Gasparoto e colaboradores¹⁰⁰ (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 DPMO¹⁰¹. Em 2015, Kaur J e Jacobs R¹⁰² 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 entre 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 colaboradores⁹ (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 mutilação 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 DPMO⁹.

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 Barret^{103,104}. O estudo de Dillenburg e colaboradores¹⁰⁵ (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 crônica¹⁰⁶. Recentemente, Almeida LO e colaboradores¹⁰⁷ (2013) mostraram que as modificações em histonas desempenham papel central na agressividade e resistência a quimioterapia observadas 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 a asma severa¹⁰⁸. 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 reumatoide¹⁰⁹. 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 acessíveis¹¹⁰. 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 quimiocinas¹¹¹. Sabe-

se que a interleucina 6 (IL-6) é uma citocina importante na patogênese da artrite reumatóide, a qual é induzida por NF- κ B mas também inicia modificações epigenéticas. Verificou-se que no câncer a IL-6 melhorou e manteve a hipermetilação do gene supressor de tumor p53¹¹². Existem vários dados que reforçam que a expressão de IL-6 em tumores altera os níveis de expressão de alguns micro-RNAs e sua regulação é dependente da metilação^{113,114}. Esses achados sustentam a hipótese de que um controle epigenético complexo está relacionado a respostas imunes e inflamatórias¹⁰⁸.

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

4.1 Aprovação do Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado na sessão de 23 de novembro de 2018 e foi realizado de acordo com a Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do CNS e aprovado pelo CEP/FOAr - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (protocolo CAAE: 96976718.3.0000.5416; Anexo A).

4.2 Amostras para Análise de Imunofluorescência

O presente estudo avaliou 3 grupos distintos de amostras. O grupo 1 foi composto por 12 blocos de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) como controle; o grupo 2 foi composto por 7 blocos parafinados obtidos a partir de biópsia incisional/excisional de LO unifocal; e o grupo 3 foi composto por 12 blocos parafinados de biópsias obtidas em diferentes momentos durante o acompanhamento médio de 98 meses de pacientes com diagnóstico clínico de LVP com uma média de 2 biópsias por indivíduo. Os critérios utilizados para o diagnóstico diferencial entre as lesões de LO e LVP foram baseados na classificação de 2017 da OMS para tumores de cabeça e pescoço¹. As amostras do grupo 3 foram constituídas de alterações microscópicas que variaram de hiperqueratose e/ou acantose à hiperplasia verrucosa, com diferentes graus de displasia ou sem displasia. Foram excluídas deste grupo amostras que revelaram microscopicamente um CEC *in situ*, CEC ou carcinoma verrucoso.

4.3 Estágio Morfológico e Classificação das Amostras

Os blocos de parafina foram submetidos a dois novos cortes com 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e posteriormente, analisados para descrição morfológica e confirmação do diagnóstico. O grau de displasia epitelial na LO e nas lesões leucoplásicas de LVP foi estabelecido de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde¹. A análise do risco

de transformação maligna dos casos de LO e LVP foi realizada conforme os critérios propostos por Kujan e colaboradores em 2006⁸, os quais foram recomendados em uma última reunião patrocinada pela OMS, sugerindo classificar às DPMOs em dois tipos: (i) baixo risco (nenhuma alteração/questionável/displasia leve) e (ii) alto risco (displasia moderada e severa)¹¹⁵.

4.4 Reação de Imunofluorescência

O protocolo de imunofluorescência (IF) foi realizado como relatado anteriormente⁵¹, porém com algumas modificações. Inicialmente as lâminas passaram pelo 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 foram imersas 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 desta etapa foi realizada a recuperação antigênica em microondas 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 fosfato-salino (PBS) durante 45 minutos á 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 nesta etapa do estudo estão descritos em detalhes no quadro 1. 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 fosfo-histona H2AX (Ser139) utilizamos o anticorpo secundário anti-mouse (532nm) e para o anticorpo DNMT1(H-300) utilizamos o anticorpo secundário anti-rabbit (532nm). Todos os anticorpos secundários foram diluídos em PBS+BSA 1% na concentração de 1:200 e incubados á 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 então lavadas 3 vezes com PBS 1x por 5 minutos seguida da lavagem com água destilada por 2 vezes por 5 minutos, ambas no escuro. Realizamos então a montagem das lâminas com

fluorshield (Sigma-Aldrich #F6182) e imagens de 4 a 10 campos de cada caso foram capturadas a uma amplificação de 400x 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; Mellville; NY, EUA). Todas as células positivas e negativas foram contadas em cada campo e a porcentagem do número total de células foi calculada para cada amostra.

Quadro 1 - Anticorpos primários utilizados na análise de Imunofluorescência

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
Acetyl-histone H3(Lys9)	C5B11	Cell Signaling	1:400
γH2A.X(phospho S139)	JBW301	EMD	1:200
DNMT1	H300	Santa Cruz	1:100

Fonte: Elaboração própria.

4.5 Análise em Cultura Celular

Com o objetivo de avaliar se a presença de células inflamatórias é capaz de modular os níveis de acetilação de H3 em células displásicas e neoplásicas orais, além de analisar o impacto desta interação em eventos iniciais da carcinogênese; foi realizado neste estudo alguns ensaios *in vitro* utilizando um protocolo de co-cultura celular de células mononucleares do sangue periférico com diferentes linhas celulares de queratinócitos orais. Por meio desta estratégia, foram avaliadas as alterações em proliferação celular e transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *epithelial-mesenchymal transition*) por diferentes metodologias, como descrito a seguir.

4.5.1 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Para a obtenção dos PBMCs o sangue periférico de doadores saudáveis (sem diabetes, hepatite, HIV, sífilis) foi coletado utilizando-se o sistema a vácuo. Após a coleta, o sangue foi diluído em PBS pH 7,2 na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), também na proporção 2:1. Após

centrifugação, a 400 x g por 30 minutos a 20°C, a camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma foi removida, depositada em novos tubos cônicos e lavada com 20 ml de PBS. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento composto de PBMC foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen, EUA) suplementado com L-Glutamina, 10% de soro fetal bovino (FBS; Cultilab Ltda, Brasil), 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) e 200U/ml de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen, EUA). Uma alíquota da suspensão celular foi então removida, diluída 1:20 em azul de Trypan (Sigma) e quantificada em câmara de Neubauer.

4.5.2 Cultura celular de queratinócitos orais

Este estudo utilizou as linhagens celulares de queratinócitos NOK-SI, DOK, SCC25 e Detroit 562, todas obtidas comercialmente. Como grupo controle, foi utilizada da linhagem celular NOK-SI originada a partir de queratinócitos normais derivados de mucosa bucal humana e espontaneamente imortalizada, a qual foi obtida no Instituto Nacional de Pesquisa dental e craniofacial (#NIDCR # 06-D-0144) e encontrava-se armazenada no laboratório de cultura de células e de biologia molecular e celular, sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Rossa Junior. Estes queratinócitos foram cultivados em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (FBS; Cultilab Ltda, Brasil) e 200U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). A DOK (CVCL_1180) é uma linhagem celular de queratinócitos displásicos obtida comercialmente (#94122104, ECACC - European Collection of Authenticated Cell Cultures, London, UK), a qual foi originada de uma lesão branca em dorso de língua de um homem de 57 anos e o grau de displasia foi descrito como leve/moderado. Esta linhagem foi cultivada em meio de cultura DMEM (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 5ug/ml de hidrocortisona e 200U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). A SCC25 (CRL-1628) é uma linhagem de queratinócitos tumorais oriunda de um carcinoma espinocelular de língua em um homem de 70 anos de idade e foi adquirida da American Type Culture Collection (ATCC, EUA). Essas células foram cultivadas em meio de cultura composto por partes iguais de DMEM e meio Ham's F12 (DMEM/F-12; Invitrogen, EUA) contendo 1,2g/L de bicarbonato de sódio, 2,5mM de L-glutamina, 15mM de HEPES e 0,5mM de piruvato de sódio suplementado com 10% de FBS

(Cultilab Ltda, Brasil), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), EUA) e antibiótico (Invitrogen, EUA). A linhagem celular Detroit 562 (CCL-138) é uma linhagem originada a partir de queratinócitos tumorais metastática derivada do líquido pleural de uma mulher adulta com carcinoma primário de faringe. Essa linhagem foi cultivada em meio DMEM com 1% de aminoácidos não essenciais, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 1500mg/L de bicarbonato de sódio, 1.0g/L de glicose, suplementado com 10% de FBS (Cultilab Ltda, Brasil). Todas as linhagens foram mantidas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.5.3 Co-cultura de PBMCs e linhagens celulares de queratinócitos

Os experimentos de co-cultura com PBMCs e as linhagens celulares displásicas (DOK), tumorais (SCC-25 e Detroit 562) e controle (NOK-SI), foram realizados para acessar os efeitos do contato direto dos PBMCs sobre as diferentes linhagens de queratinócitos. Assim, foi possível avaliar se as diferentes linhagens celulares (normal, displásica e tumoral) em co-cultura com PBMCs adquirem vantagens em alguns dos principais fenótipos associados à tumorigenese, incluindo proliferação celular, transição epitélio mesenquimal (epithelial–mesenchymal transition - EMT), ciclo celular e acetilação. Para a realização desta etapa os PBMCs foram coletados por centrifugação e dissociação não-enzimática para posterior cultivo em co-cultura com as diferentes linhagens celulares na proporção de 1 (PBMCs): 1 (NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562) por diferentes períodos segundo o desfecho experimental de interesse. Cada linhagem celular foi dividida em dois grupos, com contato e sem contato com os PBMCs, e os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes de forma independente.

4.5.4 Avaliação dos níveis de acetilação de histona H3 por citometria de fluxo

Para avaliar os níveis de acetilação da histona H3 diante do contato direto e do não contato dos PBMCs com os diferentes queratinócitos orais, as linhagens NOK-SI, DOK, SCC25 e Detroit 562 foram cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ em co-cultura com os PBMCs, na proporção 1(PBMCs):1(queratinócitos), durante um período de 48 horas. Foram plaqueados $1,5 \times 10^5$ queratinócitos em co-cultura com

$1,5 \times 10^5$ PBMCs em placas de 6 poços contendo 1,5ml de meio de cultura específico de cada linhagem e 1,5ml de meio RPMI suplementado com 10% de FBS, sendo que os grupos sem contato continham apenas a linhagem de queratinócito com a mesma quantidade de meio específico e meio RPMI. Após as 48 horas de contato, os queratinócitos foram lavados com PBS, tripsinizados e centrifugados a $3.000 \times g$ por 3 minutos. Então, realizamos a fixação das células com 100uL de formaldeído a 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguida da lavagem por centrifugação com PBS. A permeabilização das células foi realizada com metanol gelado na concentração de 100%, o qual foi adicionado lentamente enquanto as células eram vortexadas suavemente, até a concentração de 90% de metanol. As células foram permeabilizadas no gelo durante 10 minutos e posteriormente lavadas por centrifugação com PBS para remoção do metanol. Em seguida as células foram incubadas em uma solução de 100ul com anticorpo primário acetil-histona H3(Lys9) (Cell Signalling #9683S) conjugado com Alexa 488, na proporção 1:200 durante 1 hora à temperatura ambiente e protegido da luz. Lavamos as células por centrifugação com PBS e ressuspendemos em 400ul de PBS para análise em citômetro de fluxo. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA) e um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra.

4.5.5 Avaliação da proliferação celular

Para os experimentos de proliferação celular, as diferentes linhagens celulares (NOK-SI, DOK, SCC25 e Detroit 562) foram plaqueadas na concentração $1,5 \times 10^5$ por poço em placas de 6 poços, na presença (proporção 1:1) ou não dos PBMCs e cultivadas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Após 24 horas, as células foram cultivadas por 48 horas na ausência de FBS para promoção do sincronismo celular. Transcorrido este tempo, as células foram cultivadas com FBS 1% durante 24 horas e então foram lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas a $350 \times g$ por 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em PBS, seguido de nova centrifugação. Após descarte do sobrenadante, as células foram fixadas e permeabilizadas com etanol 70% gelado, gota a gota, sob agitação durante 30 segundos, seguido da incubação por 1 hora no escuro a -20°C . Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com tampão de FBS 1% diluído em PBS. Ao final das lavagens, aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células foram marcadas com 5 μl do anticorpo primário PE-

CyTM7 Mouse anti-Ki-67 (Clone B56, BD Pharmingen) e incubado em câmara escura por 30 min à temperatura ambiente. Ao final da incubação o precipitado foi lavado 2 vezes e ressuspenso em com tampão de FBS 1% diluído em PBS. O total de 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo LSR Fortessa (BD biosciences) e os dados foram analisados no software FlowJo (versão 10.0.7, Tree Star), sendo os resultados expressos por meio da mediana de intensidade de fluorescência (median fluorescence intensity - MFI).

4.5.6 Análise do ciclo celular

A porcentagem de células de cada fase do ciclo celular foi determinada após marcação com PI. Para isso, as linhagens de queratinócitos orais normais, displásicos e tumorais foram plaqueadas na quantidade de 1×10^5 células por poço, em placas de 6 poços com meio de cultura suplementado com 10% de FBS e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio fresco não suplementado com FBS para promover a sincronização das células e estas foram mantidas em cultivo durante 48 horas. Transcorrido este período, adicionamos os PBMCs nos grupos em que queríamos avaliar a co-cultura dos mesmos com os queratinócitos e todos os grupos receberam neste momento meio de cultura fresco com 1% de FBS. Após o período de 24 horas, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e fixadas em etanol 70% gelado por 12h a -20°C. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram coradas com 50 µg/ml de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas no escuro a 4°C por pelo menos 1 h. As amostras devidamente marcadas foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, EUA). Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LTTM (BD Biosciences, EUA).

4.5.7 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR)

Para avaliar a expressão gênica de marcadores que indicam transição epitélio-mesenquimal, foram realizadas reações de qRT-PCR para os marcadores E-caderina, N-caderina e Vimentina. As etapas realizadas estão descritas abaixo.

4.5.7.1 Isolamento e análise da concentração de RNA total

Para os experimentos de avaliação da transição epitélio-mesenquimal, as diferentes linhagens celulares (NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562) foram cultivadas em frascos de 25 cm² na presença ou não de PBMCs (na proporção de 1:1) em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 24 horas, os queratinócitos foram lavados com PBS, tripsinizados e centrifugados a 400 g por 3 min. Posteriormente, os precipitados celulares foram incubados com 700 µl do reagente TRIzol (Invitrogen, EUA) e mantidos por 5 min em temperatura ambiente. Após adição de 140 µl de clorofórmio para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 segundos foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 9000 g em temperatura de 4°C. A fase aquosa da solução foi transferida para tubos novos e 350 µl de álcool isopropanol foi adicionado para precipitação do RNA. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 9000 g a 4°C por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 700 µl de 75% etanol gelado. Após nova centrifugação a 6000 g a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspenso em água livre de DNases e de RNases e estocado na temperatura de -80°C até o momento de sua utilização. A concentração de RNA total foi determinada pelas absorbâncias (Abs) com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo que Abs_{260nm} igual a 1 foi equivalente a 40 µg/ml de RNA total e a razão Abs_{260nm}/Abs_{280nm} foi aproximadamente igual a 1,9.

4.5.7.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, 1µg de RNA total foi reversamente transcrito com o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, EUA) em uma reação com volume final de 25µL, contendo 2,5µL de tampão 10x RT Buffer, 1µL de mistura de 25x de dNTP, 2,5µL de 10x Random Primers, 1,25µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 0,65µL de RNase Inhibitor e água deionizada tratada com DEPC 0,1% em quantidade suficiente para completar o volume final. As reações foram realizadas em termociclador a 25°C por 10 min, 37°C por 120min e 85°C por 5seg.

4.5.7.3 Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram processadas em duplicatas em placas de 96 poços usando o sistema de detecção SYBR® Green no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 20µL, composta de 8 µL do cDNA na diluição de 1:50, 10µL do reagente GoTaq® qPCR Master Mix com 0,2 µL de CXR Reference Dye (Promega, EUA) e 1,8 µL da mistura dos pares de *primers Forward* e *Reverse* de cada gene na concentração de 5 µM. Todos os *primers* foram sintetizados pela IDT (Coralville, IA, EUA) e as sequências dos genes de interesse e controle interno utilizados nas reações estão descritos na quadro 2. Todos os resultados foram normalizados pelos valores do gene de referência (controle interno) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As condições de amplificação foram 2 min a 50°C para a ativação da enzima AmpErase, 10 min a 95°C para a ativação da enzima AmpliTaq gold DNA polymerase, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 s e 1 min a 60°C para pareamento dos primers e extensão. Ao final da amplificação, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1°C a cada 15 s, iniciando-se em 95°C) para a geração de uma curva de dissociação (curva de melting) necessária para confirmação da especificidade da amplificação.

Para análise de expressão gênica foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta C_t$) (Livak & Schmittgen, 2001). Calculou-se inicialmente o ΔC_t de cada amostra, subtraindo-se os valores de C_T (Threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle dos valores de C_T do gene alvo. Para o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ utilizou-se a fórmula seguinte: $[\Delta C_t (\text{amostra}) - \Delta C_t (\text{amostra normalizadora})]$. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_t$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa. Para utilizar o método comparativo ou $2^{-\Delta\Delta C_t}$, foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto foram feitas curvas seriadas dos pools de cDNAs para cada um dos genes estudados, sendo que para comparar a eficiência de amplificação dos dois genes, subtraem-se os valores de C_T do gene controle dos valores de C_T do gene alvo. A diferença é plotada contra o logaritmo da diluição do cDNA. Quando a inclinação da reta (*slope*), for menor ou igual que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se assim utilizar este método.

Quadro 2 - Pares de primers utilizados nos ensaios de qRT-PCR.

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
E-caderina	ACAGCCCCGCCTTATGATT	TCGGAACCGCTTCCTTCA
N-caderina	GTGCATGAAGGACAGCCTCT	CCACCTTAAAATCTGCAGGC
Vimentina	GGCTCGTCACCTTCGTGAAT	TCAATGTCAAGGGCCATCTTAA

Fonte: Elaboração própria.

4.5.7.4 Análise proteica por Western Blot

Para realização da análise proteica, placas de 100 mm² contendo co-cultura de PBMCs e as diferentes linhagens de queratinócitos (NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562) em 70% a 80% de confluência foram lavadas 2 vezes com PBS gelado. Posteriormente, foram adicionados 5 ml de PBS gelado e as células foram destacadas das placas com o auxílio de um “cell scraper” (Costar, EUA) e transferidas para um tubo de 15 ml o qual foi centrifugado a 400 g por 5 min. Os precipitados celulares foram incubados com 100 µl de tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton X-100, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mM de NaCl, 10% de glicerol, 2 mM de EDTA e inibidores de proteases (Roche, Alemanha) no gelo por 40 min, sendo homogeneizados a cada 10 min. Após este período, o material foi centrifugado a 10.000 g por 15 min a 4°C e os sobrenadantes coletados. As concentrações de proteína total foram determinadas pelo método de Bradford (Bio-Rad, EUA), em que se utiliza 1,0 mg/ml de soro albumina bovina BSA (Sigma-Aldrich, EUA) como proteína de referência para a obtenção da curva padrão. A leitura da absorbância foi realizada com filtro de 595 nm de comprimento de onda em leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices). Posteriormente, quantidades padronizadas de proteína total para as reações de cada anticorpo foram separadas eletroforicamente em um gel de poli-acrilamida com dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-PAGE) com tampão redutor. Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e coradas com solução de vermelho de Ponceau para verificar a eficácia da

transferência. As membranas foram lavadas em solução contendo 20 mM de Tris-HCL (pH 7,6), 150 mM de NaCl e 1% de Tween 20 (TBST) durante 15 min e em seguida foram bloqueadas com solução contendo 10% de leite desnatado dissolvido em TBST a temperatura ambiente por 2 h. Os anticorpos primários (quadro 3), diluídos em TBST com 5% de leite desnatado foram incubados “overnight”, sob agitação constante a 4°C. Após 3 lavagens consecutivas com solução de TBST, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluídos em solução de 5% leite desnatado em TBST. Após uma nova série de lavagens, as membranas foram reveladas usando o ECL kit de quimioluminescência para Western blot (Bio-Rad Laboratories, EUA). As imagens visualizadas em um sistema de documentação digital (Chemi-Doc XR, Bio-Rad Laboratories).

Quadro 3 - Anticorpos primários utilizados nos experimentos de western blot.

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Peso Molecular (kDa)	Diluição
E-caderina	24E10	Cell Signaling	135	1:1000
N-caderina	D4R1H	Cell Signaling	140	1:500
Vimentina	D21H3	Cell Signaling	57	1:1000
p21 ^{WAF1/Cip1}	C-19	Santa Cruz	21	1:200
p27 ^{Kip 1}	57/Kip1/pp27	BD Pharmingen	27	1:200
p16 ^{Ink4}	G175-405	BD Pharmingen	16	1:100
Cdk2	55/CDK2	BD Pharmingen	33	1:1000
Cdk4	C-22	Santa Cruz	34	1:5000
Cdk6	C-21	Santa Cruz	36	1:1000
Ciclina E	E-4	Santa Cruz	53	1:1000
Ciclina D1	Policlonal	ABclonal	36	1:2000
Acetyl-Histone H3(Lys9)	C5B11	Cell Signaling	17	1:500
Fosfo-H2A.X(Ser139)	6L16	Sigma-Aldrich	15	1:1000
β-actina	ACTB	ABclonal	43	1:2000

Fonte: Elaboração própria.

4.5.7.5 Análise estatística

Todos os experimentos in vitro foram repetidos, pelo menos, 3 vezes e expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os dados foram então tabulados e a distribuição normal ou não-normal foi determinada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk para posterior aplicação de testes estatísticos adequados segundo a distribuição dos dados. A análise estatística para comparação entre os grupos foi realizada pelo teste T-student e teste de Wilcoxon-Mann-Whitney quando não houve distribuição normal dos dados. Quando apropriado, alguns resultados foram avaliados também de forma descritiva. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ($p=0.05$) e o software utilizado para as análises foi o Prism 4, GraphPad Software Inc.

5 RESULTADO

Os resultados obtidos neste trabalho encontram-se descritos nas sessões abaixo.

5.1 Características Clínico-Patológicas dos Pacientes com LO e LVP

O perfil epidemiológico dos pacientes envolvidos neste estudo revelou que a maioria dos que pertenciam ao grupo de LO era do sexo masculino (n=4; 57,14%) com uma média de idade de 57 anos (variando de 35 á 76 anos), os quais apresentaram história de consumo de tabaco (n=4; 57,14%) e apenas um dos 7 pacientes apresentou história de consumo de álcool. A maioria dos pacientes era de raça branca (n=6; 85,71%) e apenas 2 pacientes apresentaram lesão com tamanho maior que 3 centímetros, sendo que 71,42% apresentou displasia leve (5 pacientes) e 2 deles apresentou displasia moderada a severa (28,57%). Nenhum dos casos de LO apresentou recidiva das lesões após remoção cirúrgica com bisturi.

Em relação as características clínico-patológicas dos pacientes do grupo de LVP, a maioria era do sexo feminino (9 pacientes, 75%) e apenas 3 eram do sexo masculino. A média de idade observada foi de 63 anos, sendo que 66,6% dos pacientes tinham entre 60-62 anos de idade (8 dos 12 pacientes). Todos os pacientes do grupo LVP eram da raça branca, com 66,6% apresentando história de consumo de tabaco e nenhum deles apresentou história de consumo de álcool. Os pacientes diagnosticados com LVP apresentaram lesões com área total maior que 3 centímetros no momento do diagnóstico, havia espalhamento das lesões para outros sítios orais, sendo estas características utilizadas para o estabelecimento do diagnóstico clínico desta DPMO. Histologicamente, 58,33% dos casos apresentaram displasia moderada e 25% apresentaram displasia severa, sendo então 83,33% das lesões de alto risco e apenas 16,6% (2 pacientes) de baixo risco.

A distribuição das características clínicas dos grupos de LO e LVP selecionados para este estudo encontram-se descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Características epidemiológicas dos pacientes com LO convencional e LVP, considerando o número de blocos parafinados selecionados para a análise de imunofluorescência

Parâmetros		LO N=07 n (%) ⁺	LVP N=12 n (%) ⁺
Idade	Média de anos (DP)	57 (±12,23)	63 (±9,14)
Sexo	Masculino	4 (57,14)	3 (25)
	Feminino	3 (42,85)	9 (75)
Raça	Branços	6 (85,71)	12 (100)
	Não brancos	1 (14,28)	0 (0,0)
Tabagista	Não	4 (57,14)	4 (33,3)
	Sim	3 (42,85)	8 (66,6)
Alcoolista	Não	6 (85,71)	12 (100)
	Sim	1 (14,28)	0 (0,0)
Tamanho total da lesão	Menor que 3 cm	5 (71,42)	0 (0,0)
	Maior que 3 cm	2 (28,58)	12 (100)
Grau de displasia	Baixo grau	5 (71,42)	2 (16,6)
	Alto grau	2 (28,57)	10 (83,3)
Transformação maligna	Não	7 (100)	2 (16,6)
	Sim	0 (0,0)	10 (83,3)
Recidiva	Não	7 (100)	2 (16,6)
	Sim	0 (0,0)	10 (83,3)

⁺ exceto idade

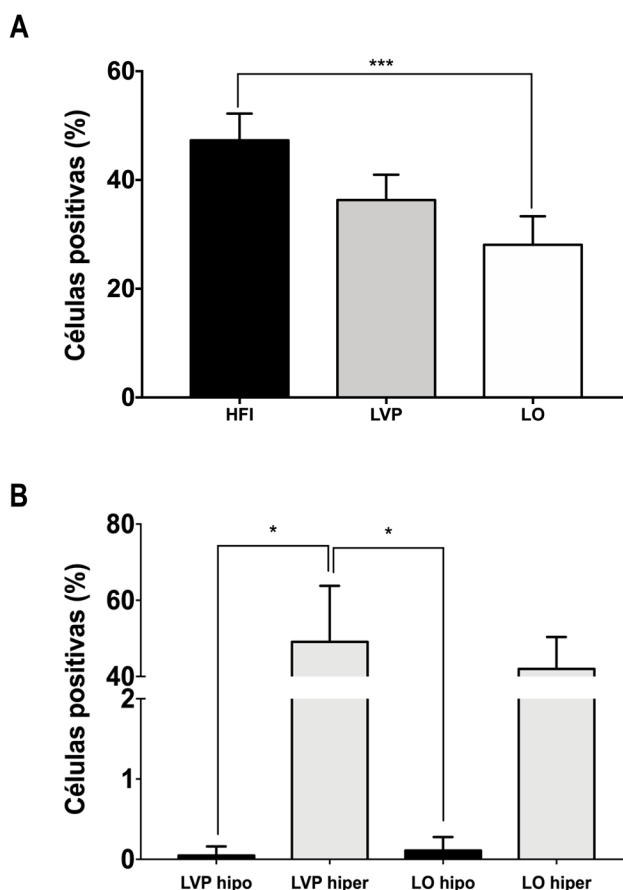
Fonte: Elaboração própria

5.2 Amostras de LO e LVP Apresentam Hipoacetilação de H3K9

Para acessar os níveis de acetilação de histona H3 entre as amostras de LO e LVP, foi realizada uma análise de IF por meio da imunomarcação com o anticorpo Acetyl-Histone H3(Lys9). Nossos resultados revelaram que ambas DPMOs apresentam uma hipoacetilação de H3K9 em relação ao grupo controle (HFI), sendo estatisticamente significante os níveis reduzidos ($p=0,001$) de H3K9ac no grupo LO em relação ao controle (Figura 3A). Adicionalmente as amostras dos grupos LO e LVP

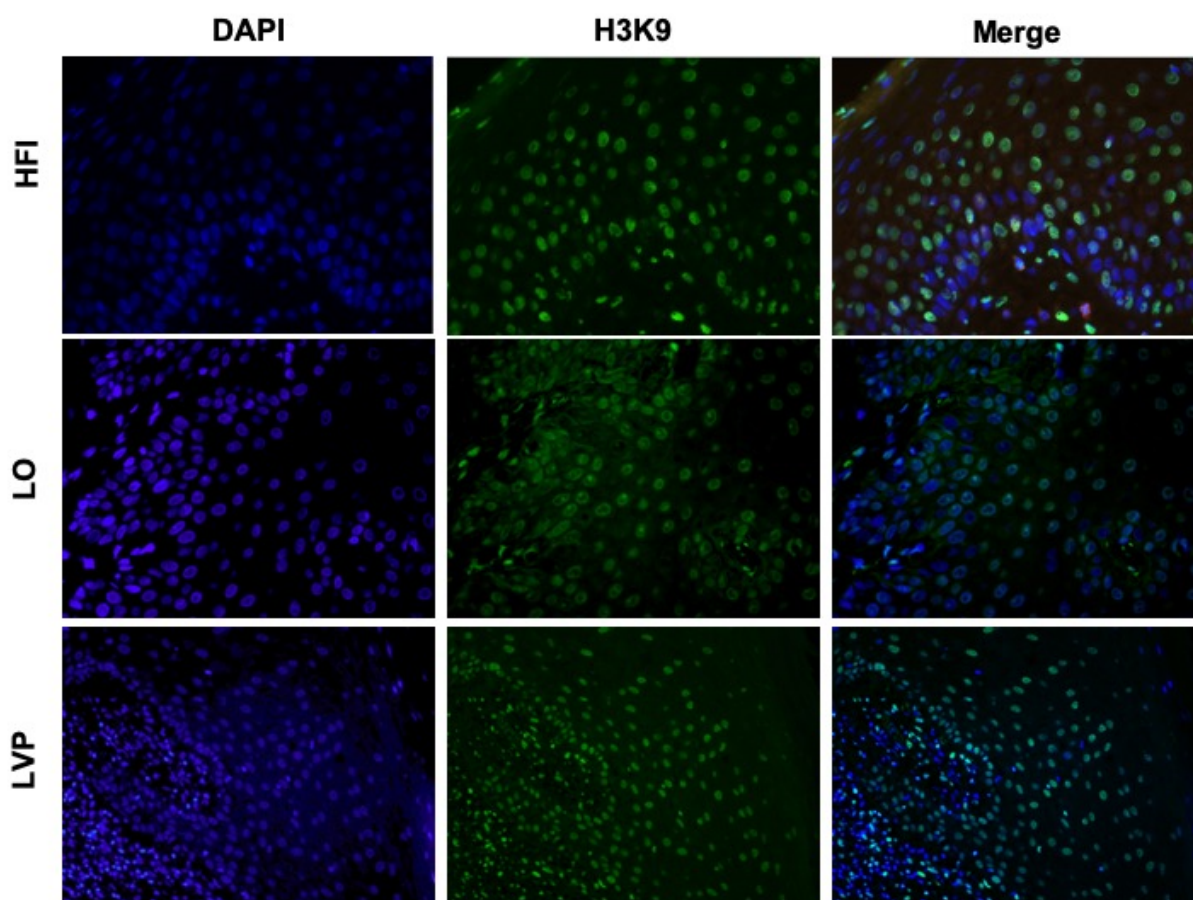
foram divididas em dois grupos, hipoacetilado e hiperacetilado, segundo a mediana da porcentagem de marcação para H3K9ac. A análise destes resultados revelou diferença estatística em relação aos níveis de H3K9ac no grupo LVP que se mostrou maior número de amostras no grupo hiperacetilado em comparação com o número de amostras hipoacetiladas dentro do mesmo grupo ($p>0,05$), bem como quando comparado com o grupo hipoacetilado da LO ($p>0,05$; Figura 3B). Então podemos concluir que a maioria das lesões displásicas encontradas nos pacientes com LVP, mesmo apresentando níveis reduzidos de H3K9 em relação ao controle (não estatisticamente significativa), não apresentam níveis de H3K9ac mais reduzidos do que aqueles observados no grupo das LO convencionais. Imagens representativas da IF para H3K9ac podem ser observadas na Figura 4.

Figura 3 - Determinação dos níveis de H3K9ac nos grupos controle, LVP e LO



A) Observa-se que ambas DPMOs uma hipoacetilação de H3K9 em relação ao controle (HFI); **B)** Após o agrupamento das amostras de LO e LVP, notou-se um maior número de amostras hiperacetiladas (hiper) no grupo LVP quando comparado com o número de amostras hipoacetiladas (hipo) tanto dentro do grupo LVP, quanto em relação ao grupo hipoacetilado da LO. * $p<0,05$ e *** $p=0,0001$. Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 - Imagens representativas da análise de imunofluorescência para H3K9ac nos grupos controle, LO unifocal e LVP (Alexa Fluor 488, 40x)



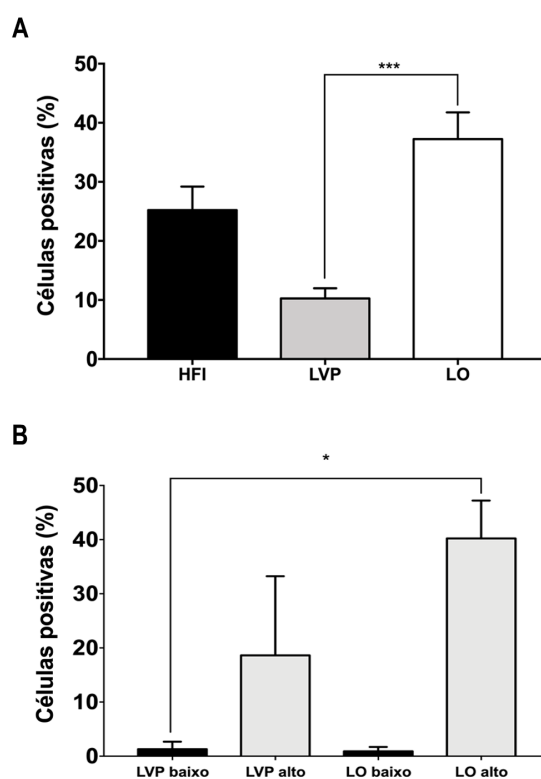
Fonte: Elaboração própria.

5.3 Os Níveis de γ H2A.X estão reduzidos nas Lesões Leucoplásicas de LVP

A fim de avaliar os níveis de dano no DNA, realizamos análise de imunofluorescência para anti-gama H2A.X (phospho S139), a qual evidencia a presença de quebras de dupla fita de DNA. Nossos resultados revelaram uma redução estatisticamente significativa ($p=0,0001$) dos níveis de γ H2A.X em lesões leucoplásicas de LVP em relação ao grupo LO convencional (Figura 5A). Adicionalmente as amostras dos grupos LO e LVP foram divididas em dois grupos, baixo e alto dano de DNA, segundo a mediana da porcentagem de marcação para γ H2A.X. Análise estatísticas dos dados revelou maior número de amostras com níveis reduzidos de γ H2A.X no grupo LVP quando comparado com o número de amostras de LO apresentando níveis aumentados de γ H2A.X ($p<0,05$, Figura 5B). Estes dados

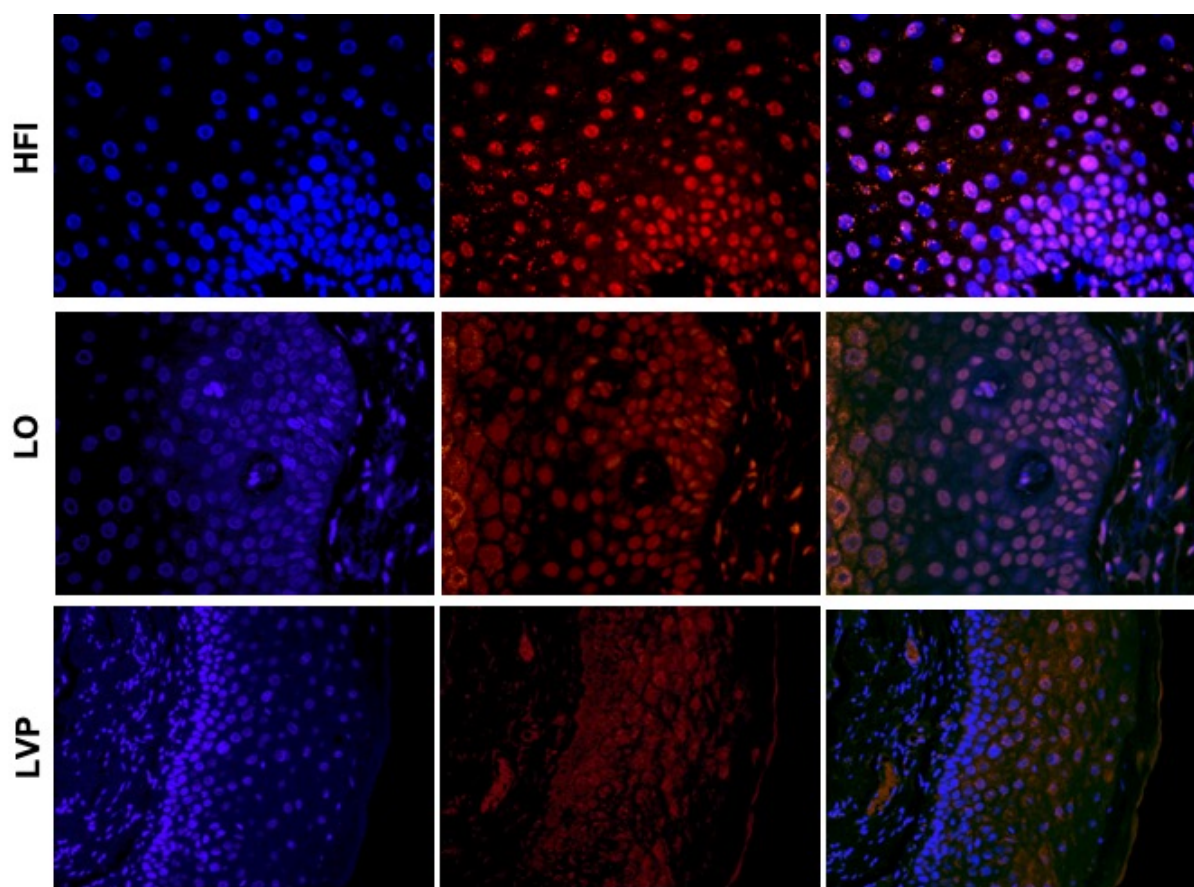
indicam que existe um maior dano de DNA nas amostras de LO em relação à LVP. Imagens representativas da IF para anti-gama H2A.X podem ser observadas na Figura 6.

Figura 5 - Determinação dos níveis de γ H2A.X nos grupos controle, LVP e LO



A) Observa-se uma redução nos níveis de γ H2A.X em amostra de LVP em relação à LO; **B)** Após o agrupamento das amostras de LO e LVP, foi confirmado que existe um maior número de amostras com níveis reduzidos de γ H2A.X no grupo LVP quando comparado com o número de amostras de LO apresentando níveis aumentados de γ H2A.X. * $p < 0,05$ e *** $p = 0,0001$.
Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 - Imagens representativas evidenciando quebra dupla fita de DNA entre os grupos controle, LO e LVP por meio da imunomarcção de γ H2A.X (Alexa Fluor 588, 40x)



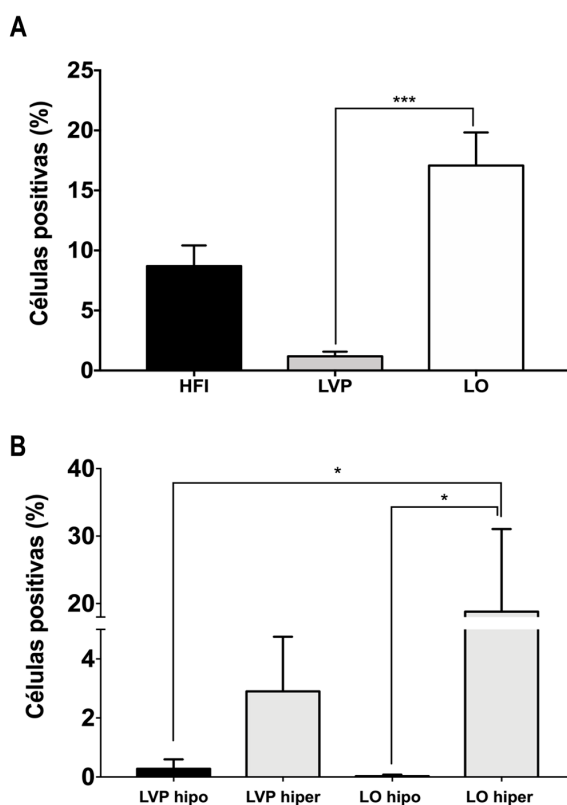
Fonte: Elaboração própria.

5.4 Os Níveis de Metilação Global do DNA estão Reduzidos em Lesões Leucoplásicas de LVP

Os níveis de metilação global do DNA associados as amostras de LO e LVP, foram determinados indiretamente pela análise de IF para a enzima DNA metiltransferases 1 (DNMT1), a qual representa a DNMT mais abundante em células somáticas em proliferação. Nossos resultados revelaram uma redução estatisticamente significativa ($p=0,0001$) dos níveis de DNMT1 em lesões leucoplásicas de LVP em relação ao grupo LO convencional (Figura 7A). Adicionalmente as amostras dos grupos LO e LVP foram divididas em dois grupos, hipometilado e hipermetilado, segundo a mediana da porcentagem de marcação para DNMT1. A análise destes resultados revelou diferença estatística em relação aos níveis de metilação global no grupo LO que mostrou-se hipermetilado em comparação com o número de amostras hipometiladas dentro do mesmo grupo ($p>0,05$), bem

como quando comparado com o grupo hipoacetilado da LVP ($p>0,05$; Figura 7B). Portanto, de modo geral amostras de LO mostram-se hipermetiladas em comparação com amostras de lesões leucoplásicas oriundas de LVP. Imagens representativas do padrão de marcação para DNMT1 nos diferentes grupos estudados podem ser observadas na Figura 8.

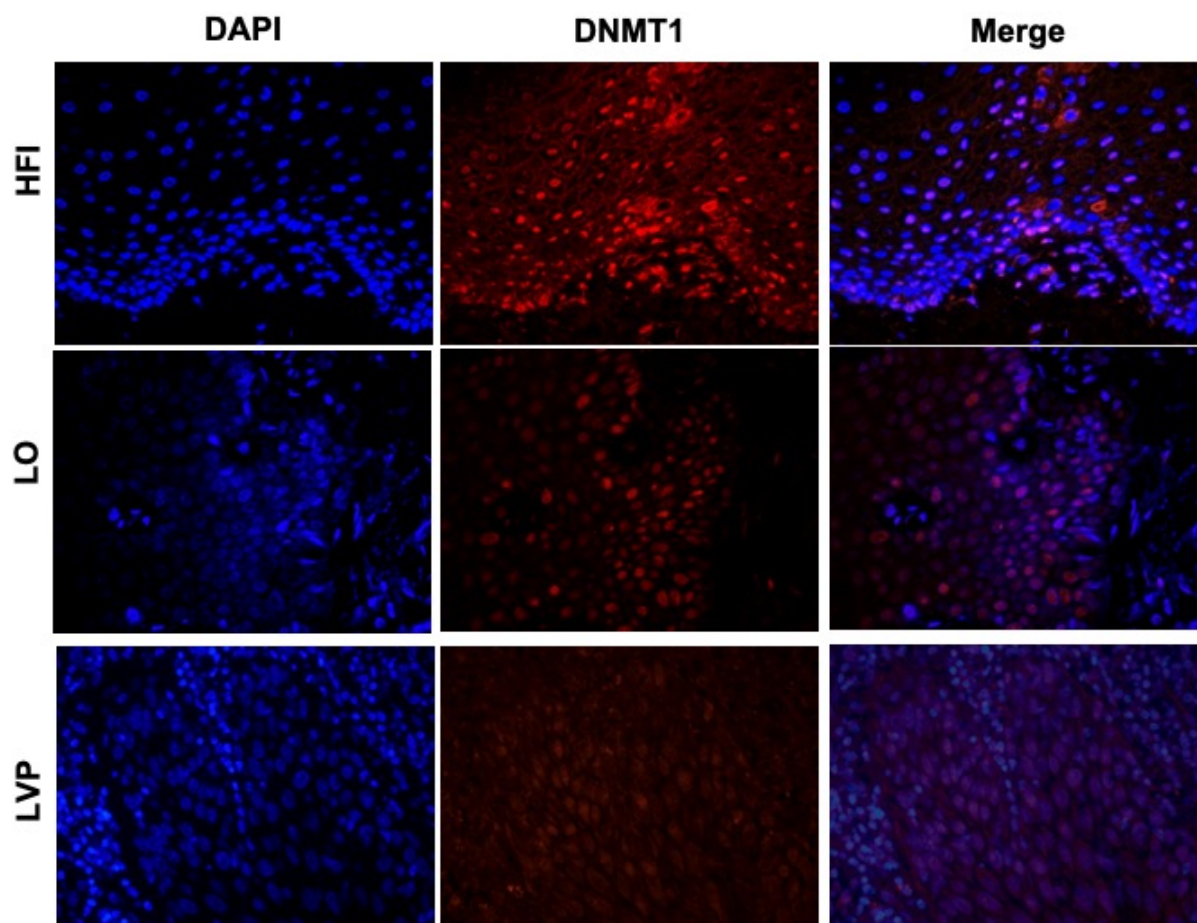
Figura 7 - Nível global de metilação do DNA nos grupos controle, LVP e LO avaliado por meio da imunomarcagem para DNMT1



A) Observa-se uma redução nos níveis de DNMT1 em amostra de LVP em relação à LO; **B)** Após o agrupamento das amostras de LO e LVP, foi confirmado que existe um maior número de amostras hipermetiladas (hiper) no grupo LO quando comparado com o número de amostras hipometiladas (hipo) tanto dentro do grupo LO, quanto em relação ao grupo hipoacetilado da LVP. * $p<0,05$ e *** $p=0,0001$.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 - Imagens representativas mostrando os níveis de metilação global entre os grupos controle, LO e LVP por meio da imunomarcção para DNMT1 (Alexa Fluor 588, 40x)



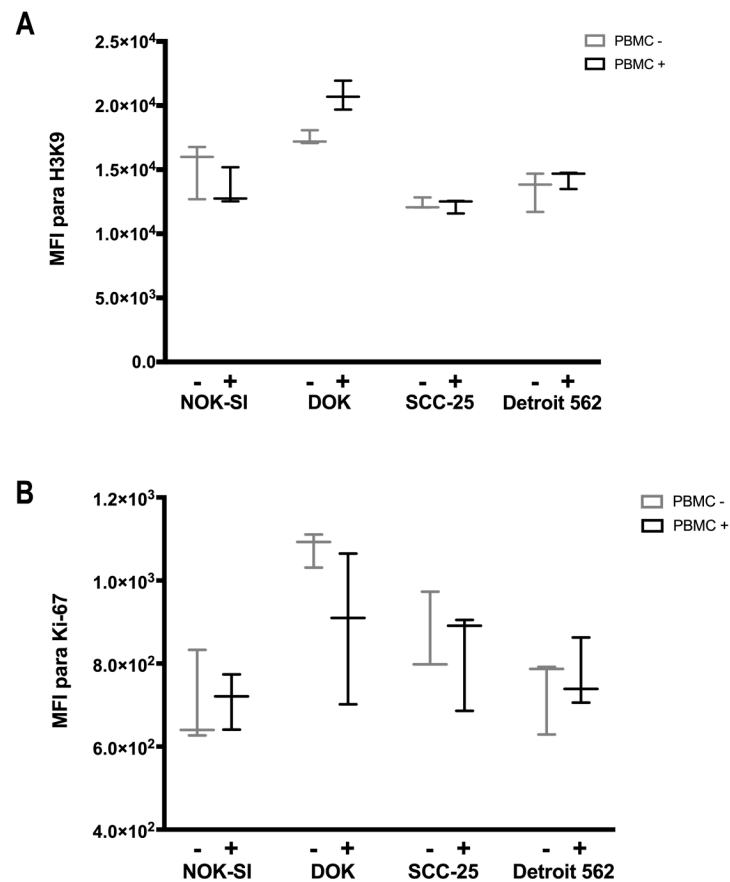
Fonte: Elaboração própria.

5.5 A influência dos PBMCs nos Níveis de Acetilação de Histona H3 e na Proliferação Celular de Queratinócitos Orais

Com a finalidade de compreender a participação do infiltrado inflamatório crônico, que usualmente está associado às lesões de LO e principalmente de LVP, no âmbito da transformação maligna destas DPMOs, foram realizados ensaios de co-cultura de PBMCs com linhagens de queratinócitos normal, displásico, neoplásico e metastático. A influência do PBMCs na capacidade proliferativa das diferentes linhagens de queratinócitos orais, foi determinada por meio da expressão de Ki-67 e a distribuição das células nas fases do ciclo celular pela marcação com PI, seguida da análise em citômetro de fluxo. Simultaneamente os níveis de acetilação de histona H3 também foram avaliados por meio da citometria de fluxo.

Os resultados deste estudo revelaram que a exposição das linhagens celulares de queratinócitos orais (NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562) aos PBMCs não foi capaz de influenciar significativamente a proliferação destas linhagens em um período de 48 horas. Contudo, análise dos níveis de acetilação de histona H3 revelou um aumento estatisticamente significativo da linhagem DOK quando co-cultivada com PBMC pelo mesmo período. Na figura 9 podemos observar uma representação gráfica dos valores expressos como MFI para as imunomarcações com H3K9 e Ki-67 nas diferentes condições e linhagens estudadas. Similarmente ao observado na análise de proliferação pela marcação com Ki-67, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na distribuição das fases do ciclo celular em relação ao contato ou não contato das diferentes linhagens de queratinócitos com os PBMCs (Figura 10).

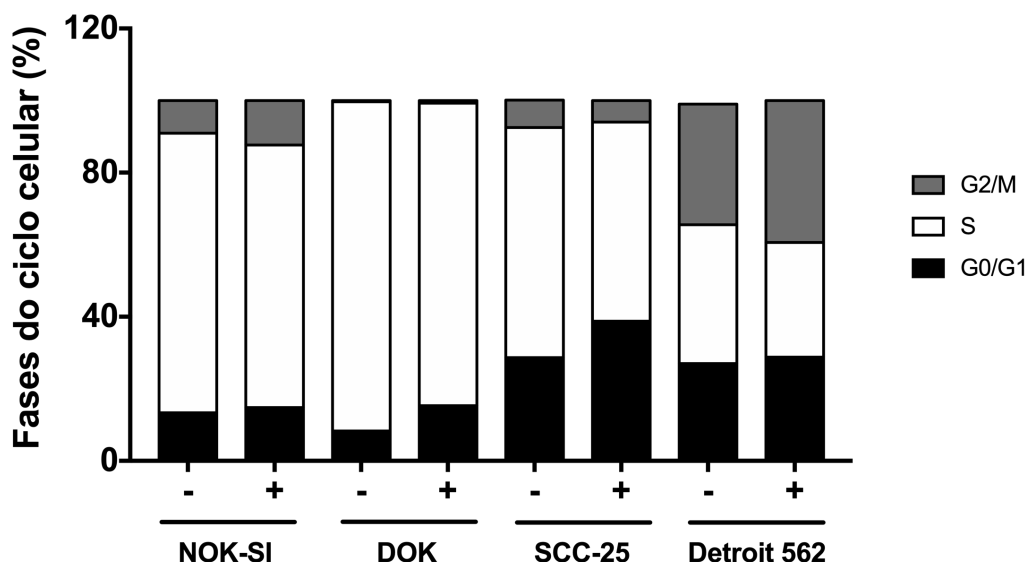
Figura 9 - Representação gráfica dos valores expressos como MFI para as imunomarcações com H3K9 e Ki-67



(A) Efeito dos PBMCs sobre os níveis de acetilação de histona H3 (H3K9) nas linhagens celulares NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562. O gráfico representa os valores expressos por meio da MFI obtidos de diferentes experimentos para cada linhagem celular na ausência (-) ou presença (+) de PBMCs. Foi possível observar diferença estatística no grupo DOK após o contato com os PBMCs ($p=0,0209$). **(B)** Efeito dos PBMCs sobre a proliferação das linhagens celulares NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562. O gráfico representa os valores expressos por meio da MFI obtidos de diferentes experimentos para cada linhagem celular na ausência (-) ou presença (+) de PBMCs. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10. Influência dos PBMCs na distribuição celular das linhagens NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562 sem (-) e com (+) PBMCs



Podemos observar que não houve influência significativa dos PBMCs sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular.

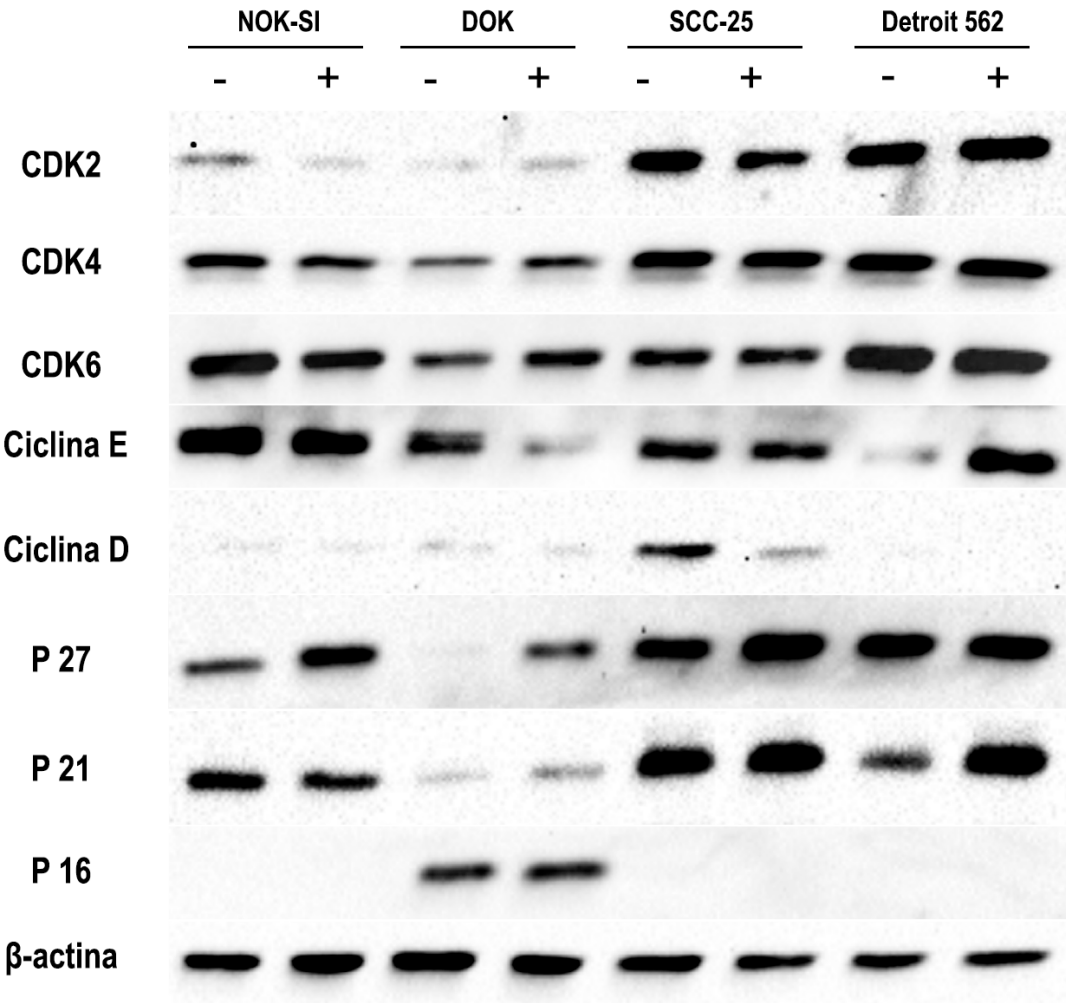
Fonte: Elaboração própria.

Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significantes na análise de ciclo celular, notou-se um discreto acúmulo de células na fase G0/G1 nos grupos DOK e SCC-25 em co-cultura com PBMCs. Assim, analisou-se a expressão de diversas proteínas envolvidas na fase G1 do ciclo celular, revelando uma diferença nos níveis proteicos de alguns marcadores estudados. O primeiro grupo de proteínas analisadas foram as proteínas inibidoras de cdk (cdk inhibitors – cki) p16^{Ink4a}, p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1}. A análise dos resultados revelou um aumento significativo nos níveis de p27^{Kip1} nas linhagens celulares NOK-SI, DOK e SCC-25 em co-cultura com PBMCs, sendo este aumento mais evidente no grupo NOK-SI e DOK. Já na linhagem celular Detroit 562, os níveis de p27^{Kip1} não se mostraram alterados em ambas as condições experimentais. Contudo, não houve alterações significativas na expressão de p16^{Ink4a} e p21^{WAF1/Cip1} nas linhagens NOK-SI, DOK e SCC-25, porém na Detroit 562, os níveis de p21^{WAF1/Cip1} aumentaram após a co-cultura com os PBMCs. As quinases dependentes de ciclinas (cyclin-dependent kinases – cdks) são enzimas que agem na promoção da progressão do ciclo celular. Dentre as diversas

cdks, avaliamos os efeitos da co-cultura de PBMCs com as diferentes linhagens celulares, normal, displásica e tumorais, sobre cdk2, cdk4 e cdk6. Interessantemente, observou-se apenas um discreto aumento nos níveis de cdk4 e cdk6 produzidos pela DOK em co-cultura com PBMCs quando comparados com a mesma linhagem cultivada isoladamente. As ciclinas constituem um grupo diverso de proteínas que se acumulam durante a interfase e são destruídas na mitose, sendo que a ciclina D e E são necessárias para a transição de G1 para S, por se ligarem as cdk4/cdk6 e cdk2, respectivamente. Analisando os resultados de diferentes experimentos, encontramos uma redução considerável do conteúdo proteico de ciclina E no grupo DOK em co-cultura PBMC, assim como, existiu uma redução nos níveis de ciclina D no grupo SCC-25 na presença de PBMCs. A linhagem Detroit 562 em co-cultura com os PBMCs evidenciou um aumento expressivo de ciclina E. A Figura 11 apresenta imagens representativas de um ensaio de western blot para checagem do conteúdo proteico das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, utilizando extrato proteico total das linhagens NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562 com e sem o contato com PBMCs.

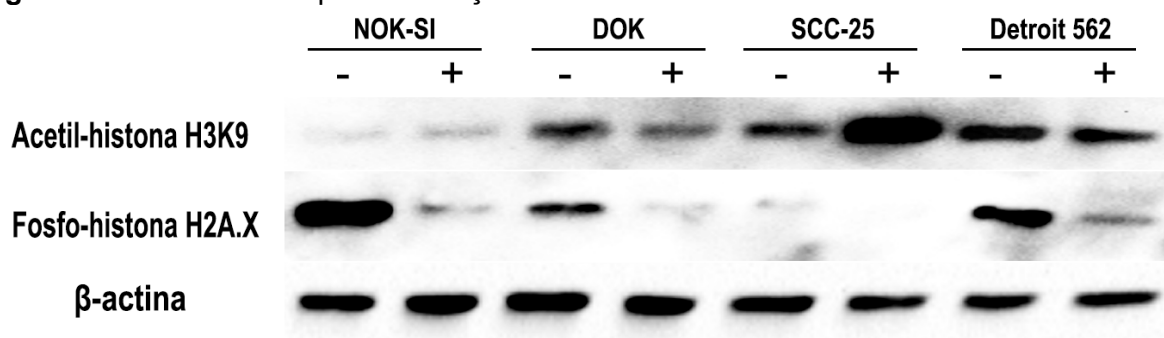
Simultaneamente à análise das proteínas envolvidas na fase G1 do ciclo celular, os níveis de acetilação de histona H3 e forforilação da histona H2AX também foram avaliados por meio de western blot. Interessantemente, os resultados evidenciaram um aumento dos níveis de H3K9ac na linhagem SCC-25 em co-cultura com os PBMCs e uma discreta redução no grupo DOK em co-cultura com os PBMCs. Além disto, notou-se uma redução nos níveis de forforilação da histona H2AX em todas as linhagens de queratinócitos cultivadas com PBMCs. Estes resultados indicam uma redução dos danos ao DNA para as 4 linhagens de queratinócitos diante da presença de PBMCs. A figura 12 mostra uma imagem representativa dos níveis de acetilação de histona H3 e forforilação da histona H2AX com e sem o contato com os PBMCs.

Figura 11 – Western Blot para proteínas do ciclo celular



Imagens representativas das reações de western blot com extrato protéico das linhagens celulares NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562 sem (-) e com (+) a presença de PBMCs, mostrando a modulação da expressão de algumas proteínas envolvidas na transição G1-S do ciclo celular.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 12 – Western Blot para acetilação de H3K9 fosfo-histona H2A.x

Imagens representativas das reações de western blot com extrato protéico das linhagens celulares NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562 sem (-) e com (+) a presença de PBMCs, mostrando discretas alterações nos níveis de acetilação de H3K9, exceto em SCC-25 e uma diminuição nos níveis de fosforilação de H2AX.

Fonte: Elaboração própria.

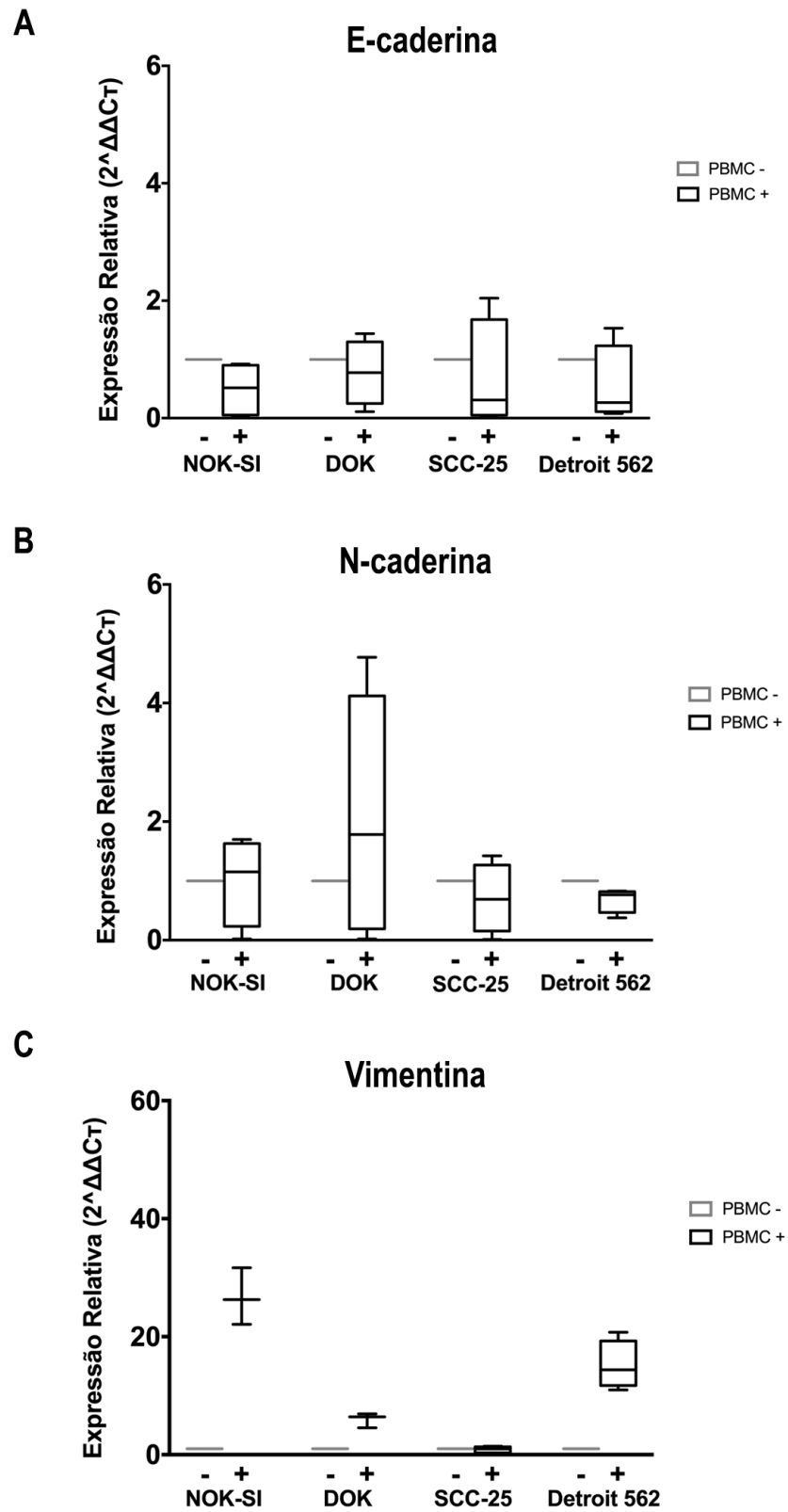
5.6 A influência dos PBMCs sobre marcadores de TEM em Diferentes Linhagens de Queratinócitos Oraais

Para investigarmos a relação da perda de identidade epitelial induzida pelos PBMCs por meio do contato direto com as linhagens celulares de queratinócitos (NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562), foi avaliada a expressão de marcadores de TEM. A transição de células epiteliais para células mesenquimais, uma chave do programa embrionário, é evocado durante a invasão e metástase tumoral e várias moléculas capazes de regular TEM em células tumorais têm sido identificadas¹¹⁶⁻¹¹⁸. Assim, reações de qRT-PCR e western blot para os principais marcadores epiteliais (E-caderina, N-caderina) e mesenquimais (Vimentina) foram realizadas.

Análise estatística dos dados de quantificação por qRT-PCR nas amostras NOK-SI, DOK, SCC-25 e Detroit 562 cultivadas na ausência e na presença de PBMCs, revelou algumas modulações pontuais na expressão de E-caderina, N-caderina e Vimentina (Figura 13). A linhagem NOK-SI na presença de PBMCs mostrou uma perda da identidade epitelial caracterizada pela redução significativa na expressão de E-caderina (redução de 2 vezes; $p=0,02$) e um aumento na expressão do marcador mesenquimal vimentina (aumento de ~26 vezes; $p=0,02$) em relação ao grupo NOK-SI não exposto as PBMCs. Além disso, foi possível observar um aumento de aproximadamente 6 vezes ($p=0,02$) na expressão de vimentina no grupo DOK em co-

cultura com PBMC. Na linhagem celular Detroit 562, os níveis de expressão de E-caderina não tiveram diferença estatística significativa nas duas condições experimentais. Por outro lado, a expressão de N-caderina teve diferença estatística ($p=0,02$) quando em co-cultura com os PBMCs, mostrando-se diminuída e os níveis de vimentina apresentaram-se aumentados quando em co-cultura com os PBMCs, evidenciando diferença estatística significativa.

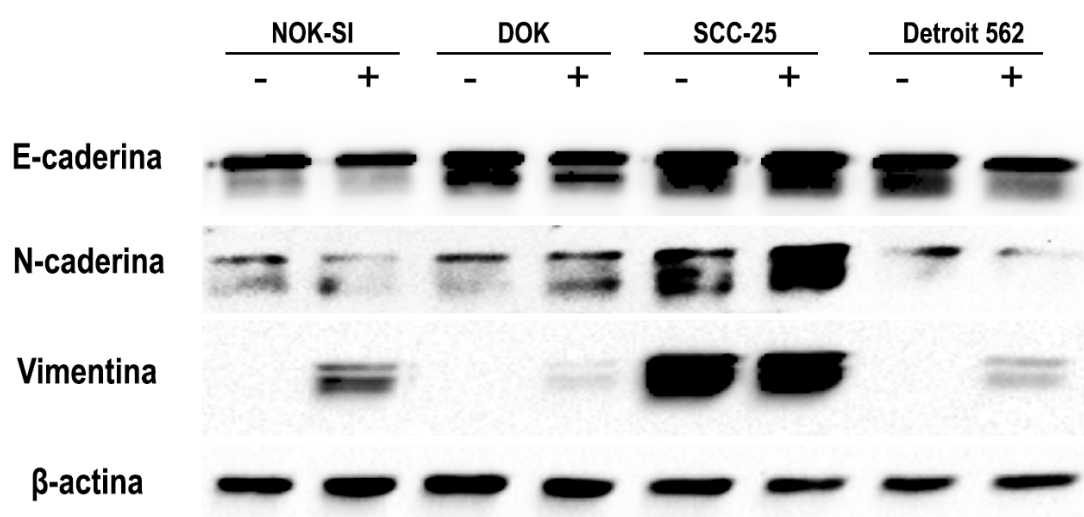
Figura 13- qRT-PCR para marcadores de TEM



Modulação da expressão de E-caderina (A), N-caderina (B) e Vimentina (C) evidenciada por qRT-PCR. * $p < 0,05$. Fonte: Elaboração própria.

A análise de western blot confirmou o *switch* das caderinas e aumento dos níveis proteicos de vimentina principalmente nas linhagens NOK-SI e DOK expostas aos PBMCs por um período de 48 horas (figura 14). Este mesmo comportamento foi observado para as linhagens celulares SCC-25 e Detroit 562 em co-cultura com PBMC, porém em menor intensidade, sendo que a SCC-25 expressou altos níveis dos 3 marcadores. A linhagem celular de Detroit 562 apresentou níveis de E-caderina discretamente diminuídos após co-cultura com os PBMCs, assim como ocorreu com os níveis de N-caderina. De maneira oposta, os níveis de expressão de vimentina mostraram-se discretamente aumentados após a co-cultura no grupo Detroit 562 após co-cultura.

Figura 14 – Western Blot para os marcadores de TEM



Imagens representativas do western blot para marcadores de EMT, mostrando modulação de E-caderina, N-caderina e vimentina nas diferentes linhagens celular sem (-) e com (+) a presença de PBMCs por um período de 48 horas.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide é uma lesão multifatorial associada ao consumo excessivo de tabaco e álcool, bem como a alterações genéticas e representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral¹⁰. Apesar dos recentes avanços no entendimento e nos protocolos de tratamento em diferentes tipos de tumores malignos, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com CEC oral permanece entre 50 e 60% e o prognóstico destes casos permanece sombrio^{10,119}. A LO é uma DPMO que mostra taxas de transformação maligna entre 0,6 a 61% dos casos². Com índices de até 100% de transformação maligna, as lesões de LVP, embora raras, representam um grande desafio no que diz respeito ao diagnóstico, tratamento e tentativas de como prever quais irão sofrer transformação maligna e em qual momento isso irá acontecer^{4,28}. Diante do exposto, ainda se faz necessário elucidar os eventos moleculares precoces que ocorrem no processo de transformação maligna de DPMOs, incluindo as alterações epigenéticas que eventualmente possam contribuir para este processo.

A desregulação da expressão gênica é frequente no CEC oral e está associada as alterações epigenéticas. Dentre estas, a literatura tem mostrado que as alterações envolvendo histonas que são mais frequentes no CEC oral e nas DPMOs são a hiperfosforilação da histona H2A.X, hipoacetilação e hiperacetilação da histona H3K9, redução/aumento da metilação de H3 e hipoacetilação de H4^{15,35,105}. O presente estudo avaliou os níveis de H3K9ac, o nível global de metilação de DNA e os níveis de fosforilação da histona H2A.X nas lesões de LO e LVP, partindo-se da hipótese alternativa de que estes níveis seriam diferentes entre os grupos. Nossos resultados revelaram diferenças nos níveis de H3K9ac nos grupos LO e LVP em relação ao controle, mostrando níveis reduzidos de H3K9ac em relação ao grupo controle. No estudo de Dillenburg e colaboradores¹⁰⁵ (2015), foi observado níveis elevados de H3K9ac em lesões de líquen plano oral que não responderam bem ao tratamento e recidivaram. Além disto, um estudo recente revelou alterações nos níveis de H3K9ac em lesões de queilite actínica quando comparadas com o epitélio oral normal; neste estudo foram revelado níveis diminuídos de H3K9ac e H4K12ac bem como redução nos níveis de metilação de H3K16 (H3K16me3) e H3S10ph, sugerindo relação com o início do dano actínico, mas não essencialmente à transformação maligna¹²⁰.

Interessantemente, estas quatro lesões estudadas fazem parte do grupo das DPMOs, sugerindo então que níveis reduzidos H3K9ac nestas lesões podem predizer lesões recidivantes e que não respondem aos tratamentos, bem como também podem estar associadas à progressão dessas lesões, exceto nas lesões de líquen plano onde foi encontrado níveis aumentados de H3K9ac. Webber e colaboradores¹⁵ em 2017 encontraram também níveis elevados de H3K9ac em lesões de LO, sem diferença estatística em comparação a mucosa normal. Já os níveis de H3K9ac nas lesões de CEC oral mostraram-se diminuídos e essa hipoacetilação foi correlacionada com pior prognóstico e isso pode sugerir que a perda da acetilação de histona H3K9 pode ocorrer como um evento tardio da carcinogênese. Além disso, os autores também avaliaram os níveis de proliferação celular por meio da marcação imuno-histoquímica de Ki-67 e mostraram aumento da proliferação no grupo de CEC oral, bem como o aumento da marcação para vimentina, porém não houve correlação entre H3K9ac, Ki-67 ou vimentina¹⁵. Giudice e colaboradores⁵¹ em 2013 também avaliaram a expressão de H3K9 e vimentina e observaram a expressão desses marcadores especificamente no fronte de invasão de amostras de CEC de cabeça e pescoço.

Os níveis de fosforilação de histonas também são alterações epigenéticas importantes, sendo a fosforilação da histona H2A.X uma resposta rápida e necessária para detectar a presença de dano no DNA e então, recrutar um complexo de reparo no local^{35,121}. Níveis elevados de fosforilação de H2A.X (γ H2A.X) foram encontrados em cânceres de pele, pulmão, pâncreas e bexiga e por isso foi então investigado estes níveis também em CEC oral¹²²⁻¹²⁴. Chou e Alawai¹²⁵ em 2011 avaliaram a expressão de γ H2A.X em tecidos de mucosa normal, o qual não revelou marcação significativa. Já os tecidos que apresentavam hiperplasia epitelial, 35% deles mostrou expressão de γ H2A.X e as amostras de tecidos displásicos mostram uma marcação positiva de γ H2A.X em 61% dos casos, sendo que os níveis de marcação para γ H2A.X foram maiores conforme o grau de displasia epitelial. Em comparação com estas, a marcação de γ H2A.X em lesões CEC oral foi significativamente menor do que observado nas lesões displásicas, sugerindo que as quebras de dupla fita de DNA podem participar de eventos iniciais e a ausência de fosforilação de H2A.X não promove o recrutamento de proteínas de reparo do DNA favorecendo a tumorigênese. Por outro lado, o acúmulo de quebra de dupla fita de DNA pode ocasionar uma pressão seletiva causando mutações que fazem com que o reparo do DNA não ocorra adequadamente¹²². Nossos resultados mostraram que existe maior expressão do

marcador γ H2A.X em lesões de LO em relação a LVP, sugerindo que a fosforilação constante em LO pode tanto recrutar os mecanismos de reparo para combater os danos, bem como ocasionar pressão seletiva, o que pode ser que ocorra nos casos de LO que prosseguem para transformação maligna. No entanto também podemos concluir que o baixo acúmulo de quebra de dupla fita de DNA nas lesões de LVP se assemelha aos níveis encontrados em CECs orais, onde o processo de reparo não é ativado adequadamente e por isso estas lesões têm altos índices de transformação maligna. Neste contexto, o acúmulo de quebras da dupla fita de DNA pode representar um mecanismo protetor, conhecido como senescência celular mediada por oncogenes, podendo levar a uma proteção contra o desenvolvimento de tumores^{122,126,127}, o que parece não ocorrer nas lesões de LVP, mas poderia justificar os níveis de γ H2ax no grupo LO. Entretanto há relatos de que existe risco elevado para o desenvolvimento de neoplasia maligna quando associado a níveis elevados de γ H2A.X, os quais foram observados em lesões de CEC oral quando comparados com epitélio oral normal e leucoplasia oral sem ou com displasia moderada¹²⁸. Em contrapartida, Dillenburg e colaboradores¹⁰⁵ em 2015 ao estudarem lesões de líquen plano oral (LPO) observaram um acúmulo de quebra de dupla fita de DNA pelo aumento da expressão de γ H2A.X e associou este resultado as lesões de LPO que tiveram resposta desfavorável ao tratamento ou a continuidade de sintomatologia nesses pacientes. Os resultados obtidos no presente estudo juntamente com os dados encontrados na literatura, mostram claramente que os mecanismos moleculares envolvidos no processo de transformação maligna da LVP são distintos daqueles que ocorrem na LO.

Dentre as alterações epigenéticas, a metilação do DNA é o evento epigenético mais comum de se ocorrer no genoma, sendo que DNA metiltransferase (DNMT) representa a família de enzimas mais importante e responsável pela manutenção da metilação do DNA^{129,130}. Este é um processo normal utilizado pelas células para manter a expressão fisiológica dos genes. Entretanto, alterações aberrantes de hipometilação ou hipermetilação desempenham um papel crítico no desenvolvimento do câncer¹¹. Tem sido reconhecido que as alterações epigenéticas afetando o DNA estão envolvidas em todos os estágios da evolução do câncer³¹. Kresty e colaboradores¹³¹ em 2002 avaliaram a hipermetilação do gene p16 e observaram que 40% dos casos de displasia oral apresentou hipermetilação. Além disso, um aumento da hipermetilação dos genes p16 e p15 também foi relatado em lesões que

progrediram de displasia leve á severa^{131,132}. Os genes supressores de tumor também podem se apresentar hipermetilados e dessa forma, silenciados. Por outro lado, a hipometilação nas sequências de DNA reguladoras ativam a transcrição de proto-oncogenes bem como de genes que codificam proteínas envolvidas na instabilidade genômica e metástase de células malignas¹³³. A revisão realizada por Shridhar e colaboradores¹³⁴ em 2016 revelou que a maioria dos estudos existentes na literatura sobre metilação de DNA avaliou tecidos/saliva com diversos grau de displasia epitelial, oriundas de lesões como LO e líquen plano oral, além de tecidos normais e encontrou hipermetilação de p16, p14 e marcadores relacionados ao ciclo celular e a apoptose, como MGMT e DAPK, respectivamente. Dessa forma, concluímos que existe uma hipermetilação de genes supressores de tumor e, portanto, silenciamento em regiões promotoras de vias do controle do ciclo celular, reparo de DNA, sinalização do ciclo celular e apoptose. Além disso observou-se um aumento da hipermetilação de p16 especificamente em lesões displásicas que sofreram transformação maligna. Em nosso estudo observamos diferença estatística no nível de metilação entre os grupos LO e LVP, evidenciadas pelos níveis elevados de DNMT1 nas amostras de LO, ou seja, a existência de hipermetilação nestas lesões. Constatação essa que corrobora com a literatura, onde existe relatos de hipermetilação de DNA em DPMOs e também em neoplasias malignas, o que pode estar contribuindo para a instabilidade genômica nestas lesões.

Sabe-se que para o crescimento *in vitro*, as diferentes linhagens celulares necessitam de fatores de crescimento presentes no FBS e de fatores circulantes presentes no soro são fundamentais para o crescimento de células *in vivo*. Além disso, o crescimento celular descontrolado como resultado de uma proliferação contínua e desregulada, tem sido reconhecido como características de neoplasias malignas e relacionadas com a progressão tumoral¹³⁵. Neste contexto, um dos objetivos deste estudo foi avaliar se o contato de diferente linhagens de queratinócitos orais (normal, displásico, neoplásico e metastático) com os PBMCs poderia ou não afetar os níveis de acetilação de histona H3 em linhagens celulares displásicas e tumorais da cavidade oral e se tal alteração poderia impactar na aquisição de características mesenquimais pelas células epiteliais (TEM) ou alterar os níveis de marcadores de proliferação. Foi observado que o contato com PBMCs associado a baixas concentrações de FBS não foi capaz de modular a proliferação dos diferentes queratinócitos orais. Os níveis de marcação do Ki-67 não mostraram diferença

estatística no potencial de proliferação das linhagens sozinhas em relação ao contato com os PBMCs. O Ki-67 é o marcador mais comum para avaliar a proliferação celular e sua expressão se dá na fase G2/M em células que estão se dividindo, portanto, proporciona uma informação significativa sobre o grau de agressividade e prognóstico de CEC oral¹³⁶. Outros marcadores também têm sido utilizados para acessar os níveis de proliferação em lesões displásicas orais, bem como o gene MCM2 que é expresso durante o ciclo celular nas células que saem da fase G0 para a fase G1. Tem sido observado um aumento de MCM2 em displasias orais que exibiram transformação maligna e esse aumento foi correlacionado com altas taxas de Ki-67¹³⁷. Outro estudo realizado por Maheschewaeiv¹³⁸ em 2013 constatou um aumento de Ki-67 conforme o aumento dos graus de displasias orais. Suwasini e colaboradores¹³⁹ em 2018 avaliaram os níveis de expressão de Ki-67 e de p53 por meio imuno-histoquímica em lesões de LO com diferentes graus de displasia, comparado com mucosa oral normal e constaram níveis aumentados de ambos os marcadores nas displasias severas. Este estudo concluiu que os marcadores Ki-67 e p53 podem ser marcadores moleculares biológicos importantes para o diagnóstico precoce e avaliação prognóstica de evolução das DPMOs¹³⁹. O p53 é um gene supressor de tumor que está envolvido no controle do ciclo celular, apoptose e preservação da estabilidade genômica. Ele é um alvo frequente de mutações e aparece em eventos precoces da carcinogênese¹⁴⁰. A expressão de p53 na camada basal foi comum na mucosa oral normal, diferente das lesões com evidência de displasia, onde sua expressão foi não só na camada basal, mas também acima desta, em células mais superficiais, indicando um estado proliferativo elevado e anormal¹³⁹.

Para análise do ciclo celular, avaliamos se as diferentes linhagens de queratinócitos orais na presença de PBMCs sofreria alguma alteração na progressão do ciclo celular. A progressão pelas fases do ciclo celular se dá por meio de uma sequência de ativações e inibições de cdks (cyclin-dependent kinas), as quais são controladas pelos níveis e disponibilidade de ciclinas e de proteínas inibidoras de cdks (cdk inhibitors – cki)¹⁴¹⁻¹⁴³. Caso haja alguma alteração nesses parâmetros, as células podem interromper a proliferação e/ou entrar em morte por apoptose. Dois complexos principais são formados com a finalidade de dar início ao processo de progressão da fase G1 do ciclo celular e são constituídos por ciclina D/cdk4/cdk6 e ciclina E/cdk2. P16^{Ink4a}, p21^{WAF1/Cip1} e p27^{Kip1} são fatores que inibem a progressão do ciclo celular, pois formam complexos com cdks¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. No presente estudo, a análise da expressão

de proteínas envolvidas na fase G1 do ciclo celular revelou um aumento significativo nos níveis de p27^{Kip1} (proteína inibidora de cdk) nas linhagens NOK-SI, DOK e SCC-25 após co-cultura com os PBMCs. Esse resultado mostra que o contato com os PBMCs, estimulou a expressão de um gene supressor de tumor porque provavelmente estavam ocorrendo alterações, as quais impediriam que as células continuassem seguindo para as próximas fases do ciclo, evitando assim a progressão de células anormais. Relatos da literatura demonstram que baixos níveis de p27 estão presentes em neoplasia intraepitelial de próstata, câncer de mama, lesões pré-malignas e malignas não invasivas como o carcinoma de mama *in situ*, bem como carcinoma de colo de útero e tumores metastáticos. Esses achados indicam que níveis diminuídos de p27 contribui para a progressão de câncer, bem como para transição de carcinoma *in situ* para invasivo¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. O estudo realizado por Guan G e colaboradores¹⁴⁹ (2018) avaliou os níveis de p27 por meio de análise imuno-histoquímica em displasias epiteliais orais (leve e moderada) e também em lesões de CEC oral. Eles observaram que houve uma diminuição nos níveis de p27 de acordo com a progressão da displasia, as lesões de CEC oral não apresentaram níveis de p27, e em contrapartida, o grupo controle apresentou altos níveis de p27, concluindo que os baixos níveis dessa proteína supressora de tumor contribuem para a carcinogênese e progressão tumoral. Outro estudo realizado em 2018 por Thambiah e colaboradores¹⁵⁰ mostrou por meio da marcação imuno-histoquímica que as lesões de CEC oral e DPMOs de alto risco apresentaram baixa expressão de p16 e p27, sugerindo que estes marcadores poderiam ser utilizados como ferramenta diagnóstica para prever a transformação maligna de DPMOs. Estes achados nos levam a considerar que a influência dos PBMCs sobre as linhagens de queratinócitos normais, displásicos e tumorais (NOK-SI; DOK e SCC-25) foi positiva ao estimular os níveis de p27 e dessa forma contribuir para o controle do ciclo celular e impedimento da progressão para transformação maligna, assim como melhorando a supressão tumoral na linhagem SCC-25, indicando uma influência anti-tumoral dos PBMCs sobre os diferentes queratinócitos. Apenas na linhagem Detroit 562 os PBMCs foram capazes de estimular o aumento nos níveis de p21^{WAF1/Cip1}, outro gene supressor de tumor que normalmente está diminuído em tumores malignos. Este resultado pode corroborar com o fato de que os carcinomas de faringe e orofaringe tem um melhor prognóstico, neste caso mostrando que o contato com os PBMCs foi eficaz no recrutamento de proteínas que atuam na parada do ciclo, combatendo uma

proliferação desordenada das células. O estudo de Guan G e colaboradores¹⁴⁹ (2018) avaliou também os níveis de ciclina D1 em lesões epiteliais displásicas e CEC oral em comparação com epitélio normal. Eles encontraram níveis aumentados de ciclina D1 nas displasias epiteliais, bem como no CEC oral, sendo que os níveis são maiores nas lesões de CEC oral em comparação com as displasias, e no caso de displasia leve, os níveis são menores do que na displasias moderadas. Assim, constatamos que o efeito dos PBMCs sobre a linhagem SCC-25, o qual levou a uma diminuição dos níveis de ciclina D, indica que os PBMCs ajudam a sinalizar e diminuir a proliferação celular anormal, evitando o papel oncogênico que a ciclina D tem quando superexpressa. Estes achados sugerem que o contato com os PBMCs estimula a ativação de mecanismos inibitórios sobre a proliferação celular e diferenciação, embora não tenha sido observadas diferenças no índice de marcação com Ki-67. Provavelmente, novos testes com tempos adicionais de exposição das diferentes linhagens celulares aos PBMCs se fazem necessário em estudos futuros.

A perda do contato célula-célula, reorganização do citoesqueleto de actina, expressão de várias proteases de degradação da membrana basal e tecido conjuntivo intersticial são eventos biológicos que ocorrem em queratinócitos durante a embriogênese e outros processos fisiológicos¹⁵¹. A transição de células epiteliais para células mesenquimais, embora seja uma chave do programa embrionário, é evocada durante a invasão e metástase tumoral e por isso várias moléculas capazes de regular TEM em células tumorais têm sido identificadas^{117,118,151}. Durante os eventos fisiológicos o processo de TEM é parcial e reversível, mostrando apenas uma perda parcial da identidade epitelial dos queratinócitos envolvidos¹⁵³. Por outro lado, as células tumorais que sofrem TEM adquirem morfologia fusiforme (fibroblastos-like), mostrando perda significativa do contato célula-célula e um aumento da expressão de marcadores mesenquimais, como a vimentina^{116,154}. Nosso estudo avaliou os principais marcadores de TEM nas diferentes linhagens celulares e foi possível observar que a linhagem NOK-SI na presença de PBMCs revelou perda da identidade epitelial caracterizada pela redução significativa na expressão de E-caderina e aumento na expressão de vimentina em relação ao grupo NOK-SI sem contato com PBMCs. Estes achados sugerem que os PBMCs podem participar dos eventos de TEM, induzindo alterações fenotípicas que podem favorecer a progressão para transformação maligna e potencial de invasão. De maneira semelhante, a linhagem DOK também expressou altos níveis de vimentina após o contato com os PBMCs e

diminuiu a expressão de E-caderina. O estudo de Dmello C e colaboradores¹⁵⁵ (2018) correlacionou a alta expressão de vimentina e a baixa expressão de E-caderina com o grau de displasia, bem como metástase linfonodal em tumores orais. Os autores utilizaram uma linhagem DOK estimulada para produzir vimentina, porém não houve diferença estatística entre o aumento da expressão de vimentina e transformação maligna, migração e invasão. A expressão exógena de vimentina isoladamente em células derivadas de lesões pré-malignas não foi suficiente para conferir alterações fenotípicas relacionadas a transformação maligna, no entanto foi capaz de levar a TEM, o que pode comprovar que a expressão de vimentina pode ser benéfica para que a célula progrida para as próximas etapas caso seja exposta a estímulos carcinogênicos¹⁵⁵. Evidências recentes sugerem que além de ser um marcador para TEM, a vimentina tem a função de conduzir o processo de TEM¹⁵⁶. O estudo de Dmello e colaboradores¹⁵⁵ (2018) avaliou lesões de LO por meio de imuno-histoquímica e verificou que o aumento da expressão de vimentina e diminuição de E-caderina se correlacionou com o grau histopatológico de displasia. Os achados da literatura junto com os achados do presente estudo sugerem que a expressão de vimentina nos estágios iniciais pode ser um fator estimulador para a ocorrência de transformação maligna e os PBMCs em contato com os queratinócitos podem favorecer as alterações fenotípicas e proporcionar a TEM.

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. Turinetti 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.

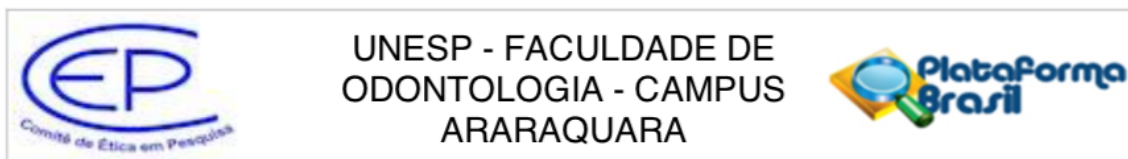
94. Thurn KT, Thomas S, Moore A, Munster PN. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol.* 2011; 7(2): 263-83.
95. Qiu T, Zhou L, Zhu W, Wang T, Wang J, Shu Y, et al. Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid 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. NFkB 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 Vecchi 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

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Andreia Bufalino

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 96976718.3.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.034.506

Apresentação do Projeto:

Este estudo pretende avaliar o estado de acetilação de histona H3 e sua contribuição para a instabilidade genômica. Desta forma, será realizada análise de imunofluorescência em 20 blocos parafinados de cada grupo (LO, LVP, CEC e HFI), obtidos de biópsia incisinal/excisional (totalizando N=80), sendo que os níveis de acetilação serão comparados entre os grupos e em relação aos aspectos clínico-patológicos. Adicionalmente, será avaliado a participação das células polimorfonucleares (PBMCs) na regulação desse processo epigenético por meio de estudo in vitro com linhagens celulares obtidas comercialmente. De acordo com os desfechos encontrados, será aplicado o teste estatístico apropriado, levando em consideração o nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente trabalho é avaliar a participação das alterações nos níveis de acetilação de histona H3 nas lesões de leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa, em comparação as lesões de carcinoma espinocelular e hiperplasia fibrosa inflamatória.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A pesquisa utilizará amostras já coletadas de pacientes atendidos em nossa clínica, apresentando risco mínimo, uma vez que a pesquisa manterá a privacidade dos indivíduos, bem como evitará exposição dos dados dos prontuários já que apenas os pesquisadores terão acesso as informações. Além disso, todos os procedimentos são sempre realizados de acordo com as

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

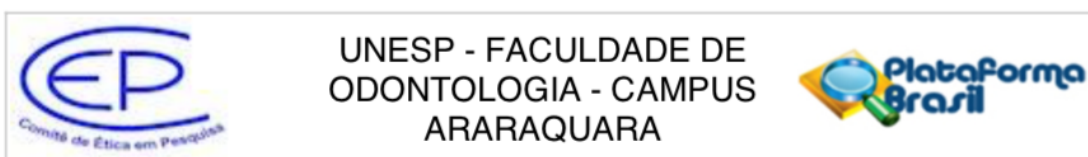
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.034.506

normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos pacientes neste estudo, uma vez que os pacientes já foram tratados e diagnosticados. O conhecimento obtido neste estudo sobre a avaliação da acetilação das histonas H3 e sua contribuição para instabilidade genômica será utilizado para aplicação no diagnóstico e/ou tratamento de pacientes com problemas relacionados às lesões de leucoplasia verrucosa proliferativa, beneficiando futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto trará contribuição para a área ao qual se aplica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados. A pesquisadora solicitou dispensa do TCLE e após questionamento, esclareceu que serão utilizados apenas blocos parafinados de biópsias de pacientes, os quais estão armazenados em arquivo. Além disso, existe a impossibilidade de contatar todos os pacientes por motivos de óbito ou alteração de endereço e impossibilidade de comunicação.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram devidamente atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atendidas pendências de reunião, considero APROVADO o protocolo.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1189702.pdf	13/11/2018 10:50:42		Aceito
Outros	CartaRespostaCamilanov.pdf	13/11/2018 10:47:33	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	09/10/2018 11:34:25	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	cronograma_atividades.jpeg	28/08/2018 14:57:07	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

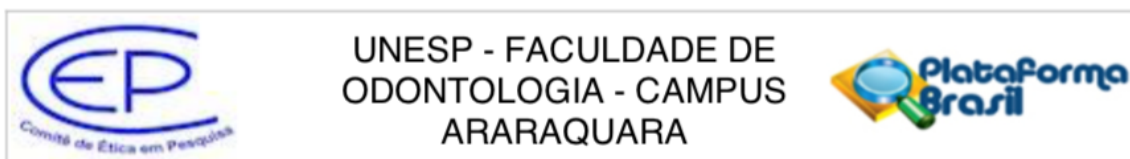
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.034.506

Orçamento	orcamento_detalhado.jpeg	28/08/2018 14:56:37	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	02/08/2018 09:20:35	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAOMIRIAN.pdf	02/08/2018 09:14:07	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAOCUMPRIMENTONORMA Spdf.pdf	02/08/2018 09:13:44	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSATCLEpdf.pdf	02/08/2018 09:13:22	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	01/08/2018 17:14:41	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_morg.pdf	01/08/2018 12:01:26	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 23 de Novembro de 2018

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br

**Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo 2 anos após a data da
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 19 de Fevereiro de 2020.

Camila de Oliveira Barbeiro