

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

**ANÁLISE DA ACETILAÇÃO DE HISTONA 3 E SUA RELAÇÃO COM
PROLIFERAÇÃO CELULAR E TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESÊNQUIMA
EM LEUCOPLASIAS E CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE
BOCA**

LIANA PRETO WEBBER

Porto Alegre

2015

LIANA PRETO WEBBER

**ANÁLISE DA ACETILAÇÃO DE HISTONA 3 E SUA RELAÇÃO COM
PROLIFERAÇÃO CELULAR E TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESÊNQUIMA
EM LEUCOPLASIAS E CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE
BOCA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Manoela Domingues Martins

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

WEBBER, LIANA PRETO
ANÁLISE DA ACETILAÇÃO DE HISTONA 3 E SUA RELAÇÃO
COM PROLIFERAÇÃO CELULAR E TRANSIÇÃO EPITÉLIO
MESÊNQUIMA EM LEUCOPLASIAS E CARCINOMAS
ESPINOCELULARES DE BOCA / LIANA PRETO WEBBER. --
2015.
76 f.

Orientadora: MANOELA DOMINGUES MARTINS .

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Epigenética. 2. Histona. 3. Prognóstico. 4.
Ki67. 5. Transição epitélio-mesênquima. I. MARTINS ,
MANOELA DOMINGUES, orient. II. Título.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas 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*)

"Complicações surgiram, persistiram e foram superadas."
(*Capitão Jack Sparrow em Piratas do Caribe*)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado não tudo que eu quis, mas tudo que eu precisei.

À minha família, por terem me possibilitado ter chegado até aqui. Agradecimento aos melhores pais do mundo, pela excelente educação que recebi. Aos meus irmãos, que com eles que aprendi, ou tento aprender a cada dia, a importância de ser paciente e solidário, e que o amor nunca se divide, apenas se soma. E também agradeço a Mariana, por ser meu exemplo de cirurgiã-dentista (de verdade), a quem eu sempre pude recorrer não apenas pessoalmente, mas também profissionalmente, e se hoje somos também "colegas" foi porque sempre me espelhei.

À minha orientadora Manoela Domingues Martins, não apenas pela dedicação extrema e pelo trabalho incansável e de excelência, mas por ser uma "mãe" e tudo que essa palavra significa. Por ser uma orientadora, não apenas de mestrado, mas da vida. Pelo apoio, conselhos, convívio. Por dividir a família e fazer com que me sinta um pouco "Domingues Martins". Ao Marco, Isabela e Gabriel, por terem-me permitido "roubar" a Manô por alguns momentos.

Ao professor Vinícius, meu eterno "mentor" (para sempre me sentirei uma "vinicat"). Se agora termino uma pós-graduação é porque no meu 4º semestre encontrou um potencial onde nem mesmo eu enxergava. Agradeço todo o ensinamento patológico, de pesquisa e principalmente de vida.

Às minhas irmãs patológicas: Isadora, Marina e Vivian. A vida fez questão de me juntar com a Isa, e mesmo com dúvidas sempre soube que a Isa estaria lá para me ajudar (agora vai ser bem mais difícil sem ela). Marina, minha companheira, minha dupla. É muito bom saber que sempre posso trocar confidências, dividir angústias, compartilhar alegrias e o almoço. Vivi, quem eu fui conhecendo e cada vez mais admirando, hoje me considero sua fã número um. Se um dia conseguir fazer metade das coisas que ela faz, serei muito realizada.

Aos meus amigos da pós-graduação em patologia. Só quem vive nesse mundo sabe o quão reconfortante é dividir o espaço com pessoas tão queridas que

tornam as coisas mais leves. Gostaria de fazer um agradecimento especial a Anaclaudia e a Kelly, meus exemplos de profissional/estudante (tudo ao mesmo tempo). Também agradeço, e muito, a Camila por toda a ajuda na realização desse trabalho e por ter me possibilitado ser um pouquinho "orientadora".

Aos professores da Patologia, por serem incansáveis em sua tarefa de ensinar. Por todo conhecimento, muito obrigada!

À UFRGS, e a Faculdade de Odontologia, por ser minha casa há 7 anos. Obrigada a todos os professores, funcionários que garantem o ensino gratuito e de qualidade. Agradecimentos especiais ao nosso "suporte técnico" Chris, Alessandra e Pedro, pelo apoio, conversas e até o cafezinho compartilhado.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo financiamento e por poder proporcionar a realização dessa pesquisa. Agradecimento especial a todo apoio técnico oferecido de forma muito eficiente pela querida Flávia Giusti.

À CAPES pelo financiamento e bolsa.

À todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

RESUMO

WEBBER, Liana Preto. **Análise da acetilação de histona 3 e sua relação com proliferação celular e transição epitélio mesênquima em leucoplasias e carcinomas espinocelulares de boca.** 2015. 76f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

O desenvolvimento e a progressão do câncer bucal envolvem processos complexos de múltiplas etapas levando a modificações fenotípicas nas células epiteliais, aumento da proliferação e invasão dos tecidos subjacentes. Diversos fatores vem sendo associados à carcinogênese, dentre eles os mecanismos epigenéticos como a acetilação de histonas, que promovem mudanças na expressão de genes independente de mutações. O objetivo do presente estudo observacional transversal foi analisar a relação entre acetilação da histona 3 (acetil Histona H3) com proliferação celular e transição epitélio-mesênquima na mucosa bucal normal (MBN), leucoplasias bucais (LB) e carcinomas espinocelulares (CEC) de boca, bem como correlacioná-los com dados clínico-demográficos, graduação histopatológica e o comportamento das lesões. Foram analisados 10 casos de mucosa bucal normal (MBN), 20 casos de LB e 75 casos de CEC de boca. Todos os casos foram submetidas a análise imunoistoquímica utilizando anticorpos anti-acetil Histona H3, Ki67, vimentina e TGF- β 1. A imunomarcacão da acetil histona H3 foi significativamente menor nos casos de CEC quando comparados a LB ($p=0.03$). Não foi encontrado diferença entre os casos de MBN e LB. Paralelamente, foi observado um aumento estatisticamente significativo na proliferação durante o processo de carcinogênese ($p<0.00$) e o mesmo foi observado quando avaliados os marcadores da transição epitélio-mesênquima, vimentina ($p=0.03$) e TGF- β 1 ($p<0.00$). A análise da associação dos marcadores com fatores clínicos-demográficos não mostrou diferença significativa. Entretanto, maior média de acetil histona H3 foi associada ao bom prognóstico ($p=0.01$) e também, foi observado uma tendência de uma melhor taxa de sobrevida ($p=0.06$). Conclui-se que os CEC de boca são hipoacetilados, exibem maior perfil proliferativo e de transição epitélio-mesênquima. Além disso, a acetil histona H3 pode ser considerada um marcador prognostico nestas lesões.

Palavras-chave: Epigenética. Histona. Prognóstico. Ki67. Transição epitélio-mesênquima

ABSTRACT

WEBBER, Liana Preto. **Acetylation of histone 3 and association with cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma.** 2015. 76 pages. Dissertation (Master's Degree) - Dental School, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

The development and progression of oral cancer involve multi-step processes leading phenotypic changes in epithelial cells, proliferation increase and invasion of adjacent tissue. Several factors have been associated with carcinogenesis, including epigenetic mechanisms such as histone acetylation, which promote changes in the expression independent of gene mutations. The aim of the present study was to analyze the association of acetylation of histone 3 (acetyl-histone H3) with cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral leukoplakia (OL) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) and correlate them with data clinic-demographic, histopathological grading and the behavior of these lesions. We analyzed 10 cases of normal oral mucosa (NOM), 20 cases of OL and 75 cases of OSCC. All samples were submitted to immunohistochemical analysis using anti-acetyl histone H3, Ki67, vimentin and TGF- β 1. Acetyl-histone H3 labeling was significantly lower in cases of OSCC compared to LB ($p=0.03$). It was not found difference between NOM and OL. In parallel, the proliferation analysis revealed a gradual increase on Ki67 labeling ($p<0.00$) during oral carcinogenesis with highest value detected in OSCC. Also, an increase on EMT markers, vimentin ($p=0.03$) and TGF- β 1 ($p<0.00$) were noted. A higher mean acetyl-histone H3 was associated with good prognosis ($p= 0.01$) and similarly a tendency to improved survival rate was observed ($p=0.06$). As conclusion, OSCC are hypoacetylated, exhibit higher proliferative profile and epithelial-mesenchymal transition characteristics. Furthermore, acetyl histone H3 can be considered a prognostic marker in OSCC.

Keywords: Epigenetic. Histone. Prognosis. Ki67. Epithelial-mesenchymal transition

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Carcinoma espinocelular.....	11
2.2 Leucoplasia.....	16
2.3 Epigenética e modificação nas histonas em neoplasias malignas.....	18
2.4 Ki-67.....	30
2.5 Transição epitélio-mesênquima.....	31
2.6. Vimentina.....	34
2.7 TGF- β1.....	36
3. OBJETIVOS.....	40
4.ARTIGO CIENTÍFICO.....	41
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) de boca está entre as seis neoplasias malignas mais frequentes no mundo com mais de meio milhão de casos por ano e tem sido associado a altas taxas de mortalidade (WARNAKULASURIYA, 2010). O processo de formação e crescimento do CEC, denominado de carcinogênese bucal, exhibe múltiplas etapas que envolvem o acúmulo de várias alterações gênicas. Esse processo ocorre associado ao aumento da ação de vários oncogenes e/ou desativação de genes supressores de tumor resultando na perda de controle do ciclo celular e da sobrevivência bem como, alterações na morfologia e comportamento celular (GASCHE e GOEL, 2012). Nas fases iniciais da carcinogênese podem ser identificadas clinicamente as desordens potencialmente malignas. Dentre essas alterações, a leucoplasia bucal (LB) é a mais prevalente (EPSTEIN, ZHANG e ROSIN, 2002; WARNAKULASURIYA et al., 2008). Em fases mais tardias da carcinogênese, podem ser observados o carcinoma *in situ* e o CEC invasivo.

Em adição às mutações genéticas, a carcinogênese pode ser influenciada por modificações nos mecanismos herdáveis e potencialmente reversíveis, denominados de mecanismos epigenéticos, que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA. Essas modificações epigenéticas podem provocar alterações globais na cromatina alterando a atividade transcricional (GILLENWATER, ZHONG e LOTAN, 2007) através de metilação do DNA, ação de RNAs não codificadores e modificação de histonas (BLANCAFORT, JIN e FRYE, 2013; MARTINS e CASTILHO, 2013; LEE et al., 2015).

Avanços na área da oncogenômica, especialmente pelo sequenciamento de última geração (NSG - do inglês *next-generation sequencing*), tem demonstrado um importante papel de modificações epigenéticas no desenvolvimento de vários tipos de câncer, dentre eles o CEC de boca (GASCHE e GOEL, 2012; MASCOLO et al., 2012; CHEN et al., 2013; MARTINS e CASTILHO, 2013). Dentre as várias mutações em CEC de cabeça e pescoço, tem sido identificadas mutações em histonas, modificadores de histonas, ativadores e co-ativadores de transcrição e reguladores de transcrição (STRANSKY et al., 2011; MARTINS e CASTILHO, 2013). Além disso, alguns estudos mostram que as alterações epigenéticas, dentre elas,

modificações em histonas, podem estar associadas com o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas em etapas precoces da carcinogênese, propiciando o surgimento de alterações genéticas subsequentes que possibilitam a proliferação e o crescimento tumoral (ESTELLER, 2006; PISCOPO et al., 2006; MANCUSO et al., 2009).

As histonas são proteínas que auxiliam no empacotamento do DNA e exibem caudas que se projetam para fora dos nucleossomos podendo sofrer modificações pós-transducionais, como a adição de um grupo acetil - acetilação- ou remoção desse grupo acetil - desacetilação. Dentre os diversos mecanismos epigenéticos que provocam modificações nas histonas, a acetilação é o melhor caracterizado e tem se mostrado componente essencial para a regulação da cromatina e da atividade transcricional. Os efeitos da desregulação nos mecanismos de acetilação de histonas podem gerar descontrole epigenético na atividade transcricional de vários genes desencadeando eventos que contribuem para a transformação maligna. Isto porque, com a histona acetilada há um relaxamento na estrutura da cromatina facilitando a acessibilidade e o recrutamento de fatores nucleares para o DNA afetando a transcrição, o que pode ser fundamental para determinar a formação, agressividade de um tumor, ou ainda, a sua resposta frente a quimioterápicos (SELIGSON et al., 2005; KURDISTANI, 2011; BURDELSKI et al., 2015).

Estudos vem sendo realizados para avaliar o efeito da acetilação das histonas em CEC de boca. Contudo ainda não há um consenso dos seu papel na carcinogênese bucal e no perfil tumoral. O entendimento de como a acetilação de histonas modula a proliferação celular, o microambiente tumoral e o comportamento desses tumores necessita ser melhor investigado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo serão abordados os assuntos estudados nessa dissertação. Para maior compreensão do leitor, dividimos a revisão de literatura nos seguintes tópicos: carcinoma espinocelular; leucoplasia; epigenética e modificação nas histonas em neoplasias malignas; Ki67; transição epitélio-mesênquima; vimentina e TGF- β 1.

2.1 Carcinoma espinocelular

O carcinoma espinocelular (CEC) é o tipo mais comum dentre as neoplasias malignas em cabeça e pescoço, e representa uma das seis neoplasias malignas mais frequentes no mundo (WARNAKULASURIYA, 2010). Estima-se que em 2012 ocorreram mais de meio milhão de casos de CEC de cabeça e pescoço e 325 mil mortes em decorrência desta neoplasia no mundo (WINN et al., 2015). No Brasil, estima-se que em 2014 o CEC de boca foi o quinto em incidência entre os homens com 11.280 novos casos. Entre as mulheres, as taxas reduziram um pouco, contudo continuam alarmantes, com 4.010 novos casos em 2014. Devido a alta incidência aliada a elevada taxa de mortalidade, o CEC tem sido considerado um importante capítulo de saúde pública em vários países (FERLAY, PARKIN e STELIAROVA-FOUCHER, 2010; LAMBERT et al., 2011).

A maior parte dos casos de CEC ocorre em indivíduos com mais de 40 anos de idade, com uma idade média de diagnóstico de 60 anos. Entretanto um aumento, especialmente no CEC de língua, em adultos com menos de 40 anos tem sido relatado (ANDISHEH-TADBIR, MEHRABANI e HEYDARI, 2010; WARNAKULASURIYA, 2010). Ainda existe uma marcada predominância pelo sexo masculino, com incidência duas vezes e meia maior do que nas mulheres (BATISTA et al., 2010). Contudo, tem sido observado um aumento nos casos em mulheres nos últimos 20 anos (GAITAN-CEPEDA, PENICHE-BECERRA e QUEZADA-RIVERA, 2011). Estudos recentes mostram um aumento no CEC em orofaringe e língua em pacientes jovens, mulheres e que não estão expostas aos tradicionais fatores de risco (ANDISHEH-TADBIR, MEHRABANI e HEYDARI, 2010; LING, MIJITI e MOMING, 2013).

O CEC apresenta causa multifatorial e nenhum agente etiológico isolado tem sido aceito como o agente causal e sim diversos fatores de risco têm sido descritos

agindo conjuntamente, aumentando a taxa de mutações das células. Fatores exógenos e endógenos podem estar relacionados. Tabaco, álcool e radiação solar (no casos localizados no lábio) são os fatores extrínsecos mais comuns (ANDISHEH-TADBIR, MEHRABANI e HEYDARI, 2010). A desnutrição, anemia, deficiência vitamínica, vírus oncogênicos, e em alguns casos, a própria hereditariedade, são considerados os fatores intrínsecos relacionados com o CEC (JOHNSON, JAYASEKARA e AMARASINGHE, 2011; GALBIATTI et al., 2013).

O processo que resulta na formação do tumor maligno é denominado carcinogênese. No caso do CEC de boca, este parece ser o resultado do acúmulo de mutações genéticas e epigenéticas que levam ao desenvolvimento de células com crescimento autossuficiente e autônomo, capazes de escapar da morte celular programada e que se replicam infinitamente através do processo de imortalização pelo alongamento de seus telômeros (COOPER e SPRINGETT, 1997; SIMPLE et al., 2015). A carcinogênese é um processo complexo que envolve várias etapas, dentre elas a iniciação, promoção, progressão e manifestação clínica do tumor. A iniciação representa a fase na qual ocorre lesão ao DNA por carcinógenos. Na promoção, as células iniciadas, após a ação de co-carcinógenos, são estimuladas a proliferar de forma descontrolada e a passar o dano genético às células filhas até que formem clones de células mutadas. Este processo é acompanhado de distúrbios de diferenciação e se consolida com a invasão dos tecidos adjacentes por parte das células neoplásicas (CALIFANO et al., 1996; SIMPLE et al., 2015).

O CEC parece ser composto por uma população heterogênea de células que apresentam diferentes papéis no ambiente tumoral. Dentre essas tem sido descrita uma pequena subpopulação denominadas de células tronco tumorais (do inglês *cancer stem cells*), que exibem características semelhantes às das células tronco incluindo grande potencial proliferativo, capacidade de recidiva e de ativação de quiescência celular entre outras características (ZHANG, FILHO e NOR, 2012). As demais células, que representam a maior parte do tumor, parecem ser mais diferenciadas e apresentam capacidade proliferativa limitada (HUANG et al., 2007). As células tronco tumorais mostram-se menos sensíveis às terapias convencionais e se mantêm viáveis após o tratamento, permitindo a recidiva do tumor e as metástases. Terapias alvo para esta população de células tronco tumorais têm sido pesquisadas com o intuito de controlar a doença e obter resultados mais satisfatórios quanto ao prognóstico (KUMAR et al., 2015; QIU et al., 2015; WEI e

LEWIS, 2015). Clinicamente, o CEC de boca se caracteriza principalmente por úlceras ou nódulos ulcerados de caráter infiltrativo. Podem exibir crescimento exofítico e/ou verruciforme. Em menor número de casos podem se manifestar como manchas ou placas de cor branca e/ou vermelha. Os sítios mais comuns para o CEC bucal são a língua e o assoalho de boca, seguido por palato mole, gengiva, mucosa jugal e palato duro (OLIVEIRA et al., 2015).

De acordo com a sexta classificação da União Internacional Contra o Câncer (UICC), o CEC pode ser classificado em 4 estádios (O'SULLIVAN e SHAH, 2003) (Tabela 1). Esta classificação se baseia no sistema TNM que se refere ao tamanho (T), metástases regionais em linfonodos (N) e metástase à distância (M). Este sistema é mundialmente reconhecido para descrever a real extensão do tumor (PATEL e LYDIATT, 2008).

Tabela 1: Classificação de tumores malignos segundo UICC.

Estadiamento clínico			
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estádio IVa	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	Qualquer T	N2	M0
Estádio IVb	Qualquer T	N3	M0
Estádio IVc	Qualquer T	Qualquer N	M1

Histologicamente, o CEC se caracteriza pela invasão de células epiteliais neoplásicas com diferentes padrões de ceratinização e pleomorfismo no tecido conjuntivo. Diversas classificações são utilizadas para definir o CEC, a mais utilizada é a classificação de Bryne (BRYNE et al., 1992) (Tabela 2). Essa classificação é realizada segundo critérios como grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão, infiltrado linfoplasmocitário e avaliam as células presentes apenas na zona de invasão tumoral.

Tabela 2: Graduação histológica de malignidade para carcinomas espinocelulares de boca segundo os critérios descrito por Bryne e colaboradores (BRYNE et al., 1992)

Característica morfológica	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Altamente ceratinizado (>50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20-50% das células)	Ceratinização mínima (5-20% das células)	Sem ceratinização (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco pleomorfismo (>75% das células maduras)	Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear (50-75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25-50% das células maduras)	Extremo pleomorfismo nuclear (0-25% das células maduras)
Numero de mitoses	0-1	2-3	4-5	>5
Padrão de invasão	Compressivo, bordas infiltrantes bem delineadas	Infiltrante, cordões sólidos, bandas ou fios	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes (n>15)	Marcante e disseminada dissociação em grupos pequenos e/ou células individuais
Infiltrado linfoplasmocitário	Marcante	Moderado	Leve	Ausente

Outra classificação histopatológica muito utilizada é a da Organização Mundial da Saúde (OMS) que separa os CEC de boca em carcinomas bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Os CECs bem diferenciados são descritos como muito semelhantes ao epitélio normal. Já os CECs moderadamente diferenciados apresentam pleomorfismo nuclear distinto, e atividade mitótica, incluindo mitoses anormais e uma menor ceratinização. Os CECs pouco diferenciados mostram predominância de células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima ceratinização. Contudo, segundo essa classificação a maioria dos CEC são classificados como moderadamente diferenciados tendo uma relevância para o prognóstico das lesões bem limitados (BARNES L, 2005).

O diagnóstico do câncer de boca é realizado com exame clínico minucioso, biopsia seguida de exame histopatológico e na maior parte dos casos, é tardio e cerca de 60% dos pacientes chegam aos consultórios odontológicos ou médicos apresentando lesões

avançadas (BRANDIZZI et al., 2008; SEOANE-ROMERO et al., 2012). Há dor mínima na fase inicial e isso pode explicar a demora na procura ao profissional (KOWALSKI et al., 1994).

As modalidades terapêuticas utilizadas para tratar CEC são a ressecção cirúrgica, radioterapia de forma isolada ou em associação desta com a quimioterapia. A definição de qual ou quais modalidades terapêuticas serão utilizadas para caso se baseia em uma avaliação do grau de disseminação de acordo com estadiamento clínico. Apesar dos avanços observados nas pesquisas básicas e clínicas envolvendo as modalidades terapêuticas do CEC de cabeça e pescoço (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) a taxa de sobrevida global após três anos tem se mantido baixa, com cerca de 30 a 50% dos pacientes permanecendo vivos (HADDAD e SHIN, 2008). Estes dados demonstram que os tratamentos atuais para o CEC são de eficácia limitada na prevenção da progressão do tumor e de sua recorrência local e regional (KAMINAGAKURA et al., 2010).

2.2 Leucoplasia

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as desordens potencialmente malignas são um grupo de lesões que apresentam algum risco de predispor a mucosa bucal ao câncer, ou seja, são lesões que possuem risco de se transformarem em CEC (VAN DER WAAL, 2009). Dentre as desordens potencialmente malignas, a leucoplasia é mais prevalente, estimada entre 0,42 e 5% (BANOCZY e RIGO, 1991; SCHEPMAN et al., 1996; SCHEIFELE, REICHART e DIETRICH, 2003; CARRARD et al., 2011). O termo leucoplasia foi definido pela OMS como mancha ou placa esbranquiçada que pode ou não ser diagnosticada clínica ou histologicamente como outra lesão (PINDBORG JJ, 1997). Atualmente, as leucoplasias são caracterizadas como placas brancas com risco de transformação maligna tendo excluído (outras) doenças ou distúrbios que carregam nenhum risco para o câncer (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007).

Os sítios anatômicos mais acometidos pelas leucoplasias são a mucosa jugal, o assoalho de boca, o palato e a língua (GUPTA e WARNAKULASURIYA, 2002). Embora seja definida como uma lesão branca homogênea, a leucoplasia bucal pode apresentar algumas variações em seu aspecto clínico. Essas lesões podem se apresentar como manchas ou placas de coloração branca e serem únicas ou múltiplas. Elas podem ser classificadas como homogêneas e não homogêneas. As lesões homogêneas se

caracterizam por apresentar a superfície lisa, fina e uniforme sem áreas avermelhadas. Já as lesões não homogêneas se caracterizam por apresentarem superfície irregular/rugosa ou áreas avermelhadas, sendo chamadas eritroleucoplasia, leucoplasia mosqueada, ou leucoplasia salpicada (HOLMSTRUP et al., 2006). Um subtipo bem particular é a leucoplasia verrucosa proliferativa. Apresenta-se clinicamente difusa, multifocal e com crescimento exofítico verrucoso tendo quase a totalidade dos casos transformados ou em carcinoma espinocelular ou em carcinoma verrucoso (BATSAKIS, SUAREZ e EL-NAGGAR, 1999; CARRARD, BROUNS e VAN DER WAAL, 2013).

O diagnóstico de leucoplasia bucal é feito excluindo outras lesões que clinicamente se apresentam de forma semelhante como candidíase pseudomembranosa, leucoedema, leucoceratose do palato, queimadura, ceratose friccional, morsicatio buccarum, líquen plano entre outras. Inicialmente, no processo diagnóstico deve-se remover a relação de possível fator causal traumático, bem como, história recente de queimadura. Caso a lesão permaneça, biópsia é indicada para descartar outras lesões como líquen plano, leucoplasia pilosa e nevo branco esponjoso (HO et al., 2009).

Leucoplasia bucal é um termo clínico e não pode ser considerado um diagnóstico histopatológico (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007). Microscopicamente, as leucoplasias apresentam uma variedade de diagnósticos histopatológicos de acordo com suas características morfológicas como hiperplasia epitelial, hiperkeratose, acantose, displasia epitelial, sendo que esses diagnósticos podem ser dados de forma isolada ou combinada (WARNAKULASURIYA et al., 2008). Essas alterações são resultantes de distúrbios do processo de renovação epitelial, no ritmo de proliferação e diferenciação epitelial (HILDEBRAND et al., 2010).

O diagnóstico histopatológico de hiperplasia epitelial caracteriza-se pelo aumento do número de células do tecido com manutenção do seu padrão morfofuncional. Já a hiperkeratose é caracterizada pelo espessamento da camada de ceratina do epitélio de superfície. A acantose significa que há um espessamento da camada espinhosa do epitélio tendendo a planificar a interface epitélio-conjuntivo (WARNAKULASURIYA et al., 2008). A displasia epitelial representa uma alteração mais grave do processo de maturação epitelial e se caracteriza pela presença de diversas alterações morfológicas que envolvem algumas camadas do tecido epitelial ou toda a sua extensão (LUMERMAN, FREEDMAN e KERPEL, 1995; BARNES L, 2005). A displasia epitelial pode ser classificada de acordo com a extensão das alterações, como leve, moderada e severa. Alguns autores classificam as lesões nas quais as alterações displásicas envolvem todas as camadas como carcinoma *in*

situ. Diversos estudos demonstraram que não há um consenso quanto ao critério de avaliação das leucoplasias, pois uma lesão avaliada por diferentes patologistas pode ter seu diagnóstico histopatológico variando de displasia leve a carcinoma *in situ*. Isto evidencia a subjetividade quanto aos critérios de avaliação (PINDBORG, REIBEL e HOLMSTRUP, 1985; VAN DER WAAL, SCHEPMAN e VAN DER MEIJ, 2000).

Em relação à transformação maligna, os estudos referem taxas que variam entre 0% e 9% (PANDEY et al., 2001; REIBEL, 2003; REDDI e SHAFER, 2006). As lesões localizadas em borda anterior e ventre de língua, bem como as de assoalho de boca são as que parecem apresentar maior risco de transformação maligna (HOLMSTRUP *et al.*, 2006; NAPIER e SPEIGHT, 2008; VAN DER WAAL, 2009). Alguns autores relataram que a taxa de transformação maligna em leucoplasias não homogêneas é mais elevada do que a das leucoplasias homogêneas (MEHTA et al., 1972; SCHEPMAN et al., 1998). A distribuição ou a extensão da leucoplasia também é um fator de risco para a transformação maligna tendo as multifocais maior risco para a transformação (REIBEL, 2003). Sabe-se que, à medida que ocorrem modificações gênicas, se observam alterações celulares e estruturais mais graves, as quais são acompanhadas por aumento progressivo na atividade proliferativa (TOMATIS, 1993).

O tratamento mais indicado para as leucoplasias bucais é a excisão cirúrgica, independente da característica clínica da lesão e do grau de severidade da displasia epitelial (KADEMANI e DIERKS, 2007; VAN DER WAAL, 2009).

2.3 Epigenética e modificação nas histonas em neoplasias malignas

Recentemente, com a adição dos avanços tecnológicos na área de sequenciamento gênico, fortes evidências têm sido fornecidas para o papel da epigenética na carcinogênese (HADDAD e SHIN, 2008; BLANCAFORT, JIN e FRYE, 2013). A epigenética é o termo usado para descrever mecanismos herdáveis e potencialmente reversíveis que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA. A regulação epigenética da expressão do gene é controlada principalmente por metilação do DNA, ação de RNAs não codificadores e modificação de histonas (BLANCAFORT, JIN e FRYE, 2013).

As histonas são proteínas que auxiliam o empacotamento do DNA, funcionando como uma matriz na qual o DNA se enrola e que estão associadas a funções importantes,

incluindo a regulação da expressão de genes em vários tipos de tecidos. Ao compactarem o DNA, permitem que os genomas eucarióticos de grandes dimensões caibam dentro do núcleo das células. O DNA, mais o conjunto de oito histonas, formam o nucleossoma (unidade fundamental da cromatina) (Figura 1). São conhecidas 5 famílias de histonas, a H1 que auxilia a ligação entre os nucleossomas e a fita de DNA, e as histonas H2A, H2B, H3 e H4 que formam um octâmero de histonas onde o DNA se enrola. Por exemplo, a Histona H3 e H4 estão diretamente relacionada com a transcrição dos genes sendo altamente expressas. 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-transdacionais (TAN et al., 2011; LAWLOR e THIELE, 2012; MARTINS e CASTILHO, 2013). 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) (LUND e VAN LOHUIZEN, 2004; MARTINS e CASTILHO, 2013) que por sua vez, influencia a acessibilidade e o recrutamento de fatores nucleares para o DNA afetando a transcrição.

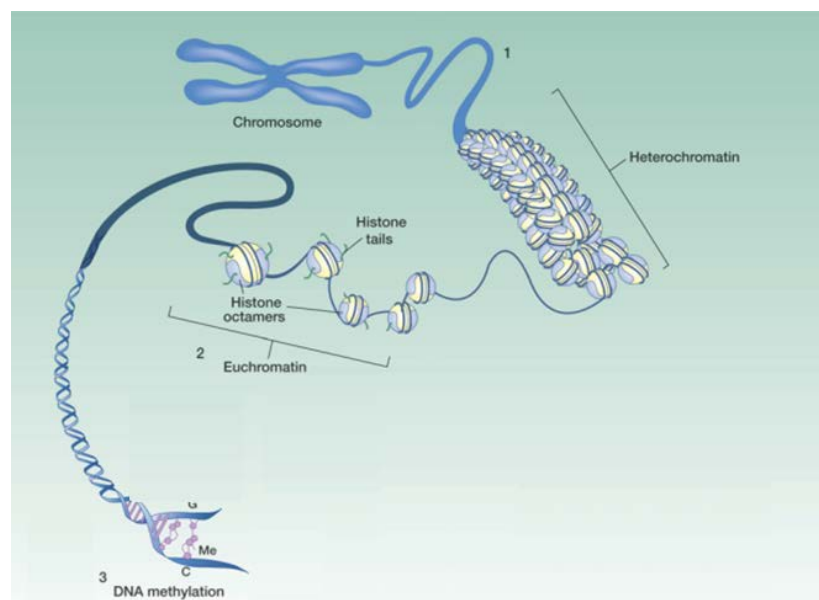


Figura 1: Formação do cromossomo
 Fonte: Adaptado de Lawlor, Thiele, 2012

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 cromatina (ZUPKOVITZ et al., 2006). Desta forma, o DNA local é exposto, aumentando o acesso de fatores de transcrição e promovendo aumentos significativos na transcrição do DNA (VERDONE, CASERTA e DI MAURO, 2005). De forma oposta, ocorre a desacetilação onde grupos acetil são retirados pelas enzimas histonas desacetilases (HDACs). O balanço da ação das HATs e HDACs garantem os níveis estacionários da acetilação do núcleo das histonas (WADE e KIKYO, 2002) e influenciam o grau de compactação da cromatina desempenhando um papel regulatório da expressão gênica (Figura 2 e 3). Contudo, pode haver a acetilação em regiões específicas promotoras da transcrição gênica. O resíduo de lisina 9 é o mais estudado atualmente (THIAGALIGAM et al. 2003).

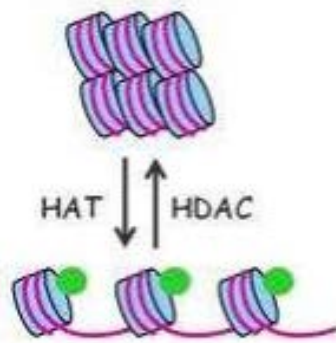


Figura 2: Ilustração da ação das enzimas HAT e HDAC no nucleossomos.
Fonte: virtual.epm.br

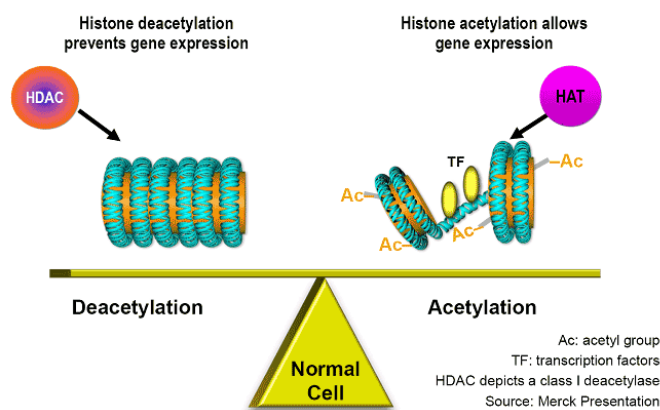


Figura 3: Ação das enzimas HDAC e HAT.

Fonte: Adaptado de <http://hq-images.com/histone-acetylation-and-deacetylation>

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 epigenético (FEINBERG e TYCKO, 2004). 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 (LEHRMANN, PRITCHARD e HAREL-BELLAN, 2002; VILLAR-GAREA e ESTELLER, 2004; SELIGSON et al., 2005; GALLINARI et al., 2007; ROPERO e ESTELLER, 2007; MARTINS e CASTILHO, 2013; YUAN et al., 2015)

O silenciamento de alguns genes, através da compactação da cromatina pelas HDACs, está relacionado com a iniciação tumoral diminuindo a 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 (HALKIDOU et al., 2004; HUANG et al., 2005; SONG et al., 2005; HRZENJAK et al., 2006; CHANG et al., 2009)

Tem sido descrito que a condensação da cromatina, através das HATs e HDACs, juntamente com fatores de transcrição é um determinante importante no controle da transição epitélio-mesênquima, ou seja, na aquisição de características mesenquimais pelas células epiteliais (EMT) e também no evento contrário, na transição mesênquima-epitelial (MET). A acetilação das histonas, ao contrário dos fatores de transcrição, podem ser passíveis de uso de inibidores, e portanto, uma estratégia na prevenção da EMT (YOSHIKAWA et al., 2007). Alguns estudos têm utilizados inibidores das enzimas-chave do processo de acetilação regulando as modificações das histonas que poderiam prevenir o aparecimento de EMT e a progressão tumoral (LOMBAERTS et al., 2006; PENA et al., 2006; YOSHIKAWA et al., 2007; BEDI et al., 2014). Por exemplo, no estudo de Yoshikawa et al (2007) (YOSHIKAWA et al., 2007) foi demonstrado que a inibição da HDAC inibe a EMT induzida pelo TGF- β 1 em células epiteliais renais humanas.

Existem poucos estudos envolvendo a análise de acetilação de histonas em CEC de cabeça e pescoço. Noguchi et al. (2013) (NOGUCHI et al., 2013) avaliaram a marcação imunohistoquímica da SIRT1 (histona desacetilase classe III) H3K9Ac (histona H3 lisina 9 acetilada), H4K16Ac (histona H4 lisina 16 acetilada) 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 et al. (2004) (TOH et al., 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 esôfago.

No CEC de cabeça e pescoço tem sido descritas modificações no padrão de histonas conforme ilustrado na Tabela 3. Giudice *et al.* (2013) realizaram estudo do papel da acetilação da cromatina no comportamento das células de CEC de cabeça e pescoço e verificaram que estas células são hipoacetiladas (baixos níveis de acetilação da H3) e que essa característica está relacionada com um perfil de células tronco tumorais, além de um linhagem de células de CEC de cabeça e pescoço expressarem vimentina. Também identificaram que as células tumorais respondem de forma diferente aos estímulos ambientais pela análise da acetilação da cromatina e de marcadores de invasão e concluíram que a utilização de inibidores de HDACs (iHDACs) pode constituir uma nova estratégia terapêutica para perturbar a população de células tronco tumorais em CEC de cabeça e pescoço.

Tabela 3: Resumo dos artigos sobre modificações no padrão de histona em CEC de cabeça e pescoço.

Estudo	Objetivo	Método utilizado	Principal resultado
TOH et al., 2004)	Avaliar a imunomarcção de MTA1 associada a metástases e sua relação com a histona H4 desacetilada	Imunohistoquímica	A expressão de MTA e H4Ac são inversamente correlacionados sendo a expressão de MTA correlacionada com prognóstico ruim e alto nível de histona H4Ac tem sido associada com melhor sobrevida de pacientes com CEC de esôfago.
SAKUMA et al., 2006	Investigados os níveis de expressão de mRNA,HDAC6 e a expressão de proteína em carcinoma espinocelular	Cultura de células (mRNA, western blot, imunoflorescência e imunohistoquímica)	A análise indicou uma diferença significativa no nível de expressão HDAC6 entre a fase inicial (fase I e II) e em estágio avançado (estágio III e IV) dos tumores (P = 0,014) . Estes resultados sugerem que a expressão HDAC6 podem ser correlacionado com a agressividade do tumor.
GILLENWATER, ZHONG e LOTAN, 2007	Avaliar a atividade de SAHA no crescimento celular e apoptose em CEC de cabeça e pescoço em comparação com leucoplasia e em células epiteliais de mucosa normal	Cultura de células (ensaio violeta cristal; western blot; elisa; PCR e ensaio clonogênico)	SAHA induz apoptose em cultura de células de CEC de cabeça e pescoço através da ativação da via Fas/FasL em adição a via intrínseca mitocondrial e teve pouca atividade em leucoplasias e células epiteliais normais com expressão intrínseca de Fas e FasL.

Tabela 3: Resumo dos artigos sobre modificações no padrão de histona em CEC de cabeça e pescoço.

ERLICH et al., 2009	Investigar se o ácido valpróico (iHDAC) pode aumentar a eficácia do uso de cisplatina, toxicol e radioterapia para o tratamento de CEC de cabeça e pescoço.	Cultura de células (ensaio de proliferação e citotoxicidade, western blot e imunoblot)	O uso de ácido valpróico aumenta o nível de acetilação das histonas em CEC de cabeça e pescoço. O uso de iHDAC leva ao aumento da acetilação das resultando na redução da expressão de oncogenes. Observaram também que a associação dos quimioterápicos foi mais eficiente resultando em uma inibição persistente.
CHANG et al., 2009	Examinar a expressão de HDAC2 em displasia epitelial e CEC de boca e correlacionar os parâmetros clínicos com o prognóstico	Imunohistoquímica	Marcação de HDAC2 foi de 86% em CEC e 55% em displasia. CEC em estado avançado, tumores maiores e metástase em linfonodos teve correlação com maior expressão de HDAC2 e com piores taxas de sobrevivência.
KIM et al., 2010	Avaliar a eficiência do uso combinado de inibidor PS-341 proteossômico (Bortezomib) com Tricostatina A (iHDAC)	Cultura de células (ensaio de citotoxicidade, western blot, northern blot, Modelo de crescimento tumoral em vivo)	As drogas induzem de forma sinérgica a apoptose em CEC de cabeça e pescoço.

Tabela 3: Resumo dos artigos sobre modificações no padrão de histona em CEC de cabeça e pescoço.

ERLICH et al., 2012	Analisar os efeitos de inibidores de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-mTOR e iHDACs nos CEC de cabeça e pescoço	Cultura de células (western blot, ensaio de proliferação celular, mensuração de espécies reativas de oxigênio, ensaio de citotoxicidade e variabilidade celular) e <i>in vivo</i> (camundongos)	Associação de quimioterápicos foi mais eficiente inibindo AKT e a geração de espécies reativas de oxigênio. Foi observado também que a administração combinada de inibidores da PI3K-AKT-mTOR aumentou a citotoxicidade do tumor induzido por um iHDAC (Panobinostat)
HAIGENTZ et al., 2012	Avaliar o efeito isolado de Romidepsin (iHDAC1 e 2) em pacientes com CEC de cabeça e pescoço.	Ensaio clínico	Dois dos 14 pacientes avaliados tiveram estabilização clínica da doença, contudo o uso de Romidepsin como agente único para o tratamento mostrou efeito limitado.
GIUDICE et al., 2013	Avaliar o papel da acetilação da cromatina no comportamento das células de CEC de cabeça e pescoço	Cultura de células (western blot, atividade da enzima ALDH, ensaio de invasão celular, imunofluorescência e ensaio de formação de esfera)	As células do CEC tem baixos níveis de Ac.H3 Também identificaram que as células tumorais respondem de forma diferente aos estímulos ambientais pela análise da acetilação da cromatina e de marcadores de invasão e concluíram que a utilização de inibidores de HDACs (iHDACs) pode constituir uma nova estratégia terapêutica

Tabela 3: Resumo dos artigos sobre modificações no padrão de histona em CEC de cabeça e pescoço.

CHIKAMATSU et al., 2013	Investigar os efeitos de dois iHDAC, SAHA e TSA combinados com radioterapia, em duas linhagem de células -tronco de CEC de cabeça e pescoço cultivadas em soro contendo fator de crescimento epidérmico e fibroblástico.	Cultura de células (citometria de fluxo, ensaio de crescimento celular, ensaio de apoptose, análise do ciclo celular, PCR, Immunoblotting, isoblograma)	iHDAC inibe o crescimento de linhagens celulares de CEC de cabeça e pescoço induzindo apoptose e parada do ciclo celular, mas também altera o fenótipo da célula-tronco tumoral, levantando a possibilidade de iHDAC ter potencial terapêutico nas células-tronco tumorais.
CHEN et al., 2013	Avaliar a relação de ARK2 (histona fosforilada), G9a, EZH2, SUV39H1, e SUV39H2 (histona metilada) com parâmetros clínicos de 215 carcinomas espinocelulares de boca em Taiwan	Imunohistoquímica	ARK2, G9a, EZH2, SUV39H1 e, especialmente, ARK, mas não SUV39H2 são altamente correlacionadas com TNM. Estas proteínas, especialmente ARK2, podem servir como fatores de prognóstico eficazes e também podem ser utilizados como biomarcadores.

Tabela 3: Resumo dos artigos sobre modificações no padrão de histona em CEC de cabeça e pescoço.

NOGUCHI et al., 2013	Investigar a expressão de SIRT1 (HDAC classe III) correlacionando com o comportamento tumoral e H3K9Ac, H4K16Ac, p53. Identificar se a SIRT1 é um biomarcador para CEC de cabeça e pescoço.	Imunohistoquímica	79,6% dos casos de CEC foram positivos para SIRT1 enquanto quase todos os casos de mucosa normal tiveram marcação positiva. Houve correlação estatisticamente significativa da expressão de histona H3K9 acetilada e H4K16, mas não com p53. A análise multivariada revelou que a expressão de SIRT1 foi um indicador independente de bom prognóstico.
LEE et al., 2015	Avaliar efeitos do ácido valpróico (VPA) em CEC de cabeça e pescoço e células tronco temporais	Cultura de células	O VPA inibe as capacidades de auto-renovação e diminuiu a expressão de marcadores de células tronco. Esse iHDAC também potencializou o efeito citotóxico de cisplatina. Além disso, a combinação de cisplatina e VPA atenuou o crescimento tumoral e induziu apoptose num modelo de xenoinxerto

Tabela 3: Resumo dos artigos sobre modificações no padrão de histona em CEC de cabeça e pescoço.

REN et al., 2015	Avaliar se a inibição da H3K9 Metiltransferase G9a poderia exercer um efeito antitumoral em CEC bucal	Cultura de células (ensaio de crescimento celular, coloração Brdu, imunoflorescência, ensaio de apoptose, ensaio túnel, Western blot, formação de colônias) Ensaio <i>in vivo</i> com modelo xenográfico.	A inibição da G9a reduziu o crescimento e proliferação celular de CECs bucais, induziu autofagia e apoptose em células de CECs bucais e também reprimiu o crescimento tumoral em modelos xenográficos.
KUMAR et al., 2015	Avaliar o uso de SAHA em linhagem de células cisplatina-resistentes	Cultura de células, western blot, PCR, ensaio de proliferação celular, ensaio de formação de colônias e imunoistoquímica.	HDACs estão supermarcados em CEC de cabeça e pescoço e a sua expressão foi maior em linhagens celulares resistentes a cisplatina. A inibição de HDAC1 e 2 em linhagens celulares de CEC reverteu resistência à cisplatina. SAHA inibiu a proliferação de células e em sinergia aumentou os efeitos anti-proliferativos de cisplatina. Além disso, o tratamento com SAHA e combinação de cisplatina diminuiu significativamente a metástase tumoral.
YUAN et al., 2015	Caracterizar os padrões de expressão e determinar os efeitos de HDACis na inibição do Bmi1 no câncer de língua.	PCR, Western blot, imunoistoquímica e cultura de células	Os dados revelaram que Bmi1 foi mais expresso numa porção significativa nos CEC. HDACi inibiu fortemente Bmi1 e provocou mudanças fenotípicas que sugerem o silenciamento de Bmi1.

O uso de iHDAC leva ao aumento da acetilação das histonas por alterações na estrutura da cromatina, resultando na redução da expressão de oncogenes (ERLICH et al., 2009). Baseado nos estudos promissores da utilização de iHDAC em linfomas (MIN et al., 2012; GRASSADONIA et al., 2013) ensaios clínicos tem sido realizados para avaliar o uso de iHDAC no tratamento de CEC de cabeça e pescoço. Dentre destes, dois já tiveram seus resultados publicados (BLUMENSCHNEIN et al., 2008; HAIGENTZ et al., 2012) e três estão em andamento (www.clinicaltrials.gov). No estudo de Haigentz et al. (2012) foi avaliado o efeito isolado de Romidepsin (iHDAC1 e 2) e concluiu-se que essa droga tem efeito limitado quando usada isoladamente. Diante disso, sugere-se que novos estudos devam ser conduzidos avaliando seu efeito combinado com outros agentes anti-tumorais. Já no ensaio clínico de Blumenschein Jr. et al. (2008) foi avaliado o uso de Vorinostat (SAHA) em paciente com metástase ou recorrência do CEC de cabeça e pescoço que teve baixa resposta a quimioterapia convencional prévia e observaram respostas variadas ao tratamento com SAHA. Esses autores ressaltam a necessidade de realização de novos estudos. Os três ensaios clínicos com iHDAC que estão sendo realizados em CEC de cabeça e pescoço utilizam (1) Vorinostat (SAHA) combinado com cisplatina e radiação, (2) Capecitabine (xeloda) e Vorinostat (SAHA) e (3) Ácido Valpróico combinado com cisplatina e radiação.

A compreensão da relação de como as modificações epigenéticas atuam no câncer irá permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que possam melhorar a taxa de sobrevivência global de CEC de cabeça e pescoço e outros tipos de câncer. Os resultados mais promissores envolvendo os iHDACs estão relacionados com sua ação sinérgica a outros regimes terapêuticos, incluindo radioterapia, quimioterapia, inibidores de proteossoma dentre outros (THURN et al., 2011; QIU et al., 2013). 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. Estudos *in vitro* com administração de iHDACs mostraram boas propriedades antitumorais, porém, como um agente único no tratamento clínico esses inibidores apresentaram resultados limitados (GILLENWATER, ZHONG e LOTAN, 2007; GAN et al., 2012). A associação entre iHDACs adjuvante a radioterapia mostrou bons resultados (KARAGIANNIS e EL-OSTA, 2006; ZHANG et al., 2009). Kim et al., (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 ambas as drogas foram capazes de induzir

sinergicamente apoptose em CEC de cabeça e pescoço. Por outro lado, Erlich et al. (2012) analisaram os efeitos antitumorais de inibidores de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-mTOR e iHDACs em imunoterapia ou em combinação e observaram que a associação dos quimioterápicos foi mais eficiente resultando em uma inibição persistente de AKT e geração de espécies reativas de oxigênio. Além disso, a administração combinada de inibidores da PI3K-AKT-mTOR aumentou a citotoxicidade do tumor induzido por um iHDAC não seletivo (Panobinostat). No entanto, usando um modelo de xenotransplante de CEC de cabeça e pescoço os autores puderam observar efeito inibitório de ambas a drogas no crescimento tumoral não havendo maior efetividade com o uso combinado das mesmas.

2.4 Ki67

As neoplasias exibem distúrbios no controle do ciclo celular, induzindo um aumento da proliferação celular e perda da diferenciação. A detecção e a quantificação das células em proliferação constituem parâmetros importantes na análise das neoplasias malignas (SAKAI et al., 2002).

Um dos marcadores mais importantes e utilizados na rotina patológica para avaliação da proliferação celular é o antígeno Ki67 (GONZALEZ-MOLES et al., 2010). Esse marcador é considerado uma proteína não histona, cujo gene se localiza no cromossomo 10 (10q25). O Ki67 não é expresso em células na fase G_0 , mas pode ser detectado nas fases ativas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose) sendo que, sua expressão aumenta na segunda metade da fase S, alcançando sua maior expressão em G_2 e na mitose (THOMASOVA e ANDERS, 2014). Na fase G_1 do ciclo celular o antígeno Ki-67 está predominantemente localizado na região perinuclear, já nas últimas fases do ciclo celular, o antígeno é também detectado em todo o interior do núcleo, sendo predominantemente localizado na matriz nuclear (VERHEIJEN et al., 1989).

A imunomarcagem pelo Ki67 diminui consideravelmente durante a anáfase e telófase. Diferente de outras proteínas associadas ao ciclo celular, o Ki67 é ausente em células quiescentes e não é detectável durante os processos de reparação do DNA. Portanto, a presença desse antígeno é estritamente relacionado ao ciclo celular e confinado ao núcleo, reforçando sua importância na regulação do ciclo de divisão celular (SCHLUTER et al., 1993; THOMASOVA e ANDERS, 2014).

Apesar do antígeno Ki67 ser amplamente usado para avaliar a capacidade proliferativa de neoplasias, sua exata função celular ainda não é totalmente conhecida. Três possíveis papéis durante a mitose têm sido sugeridos: (STARBORG et al., 1996)

- 1- condensação e descondensação de cromossomos;
- 2- proteção e a estabilização de cromossomos;
- 3- distribuição simétrica de proteínas nucleolares entre as células-filhas

A análise do Ki67 tem mostrado um valor preditivo do padrão de crescimento tecidual (SAITO et al., 1999), pois o ciclo celular acelerado é responsável pelo aumento da proliferação (SCHLIEPHAKE, 2003).

O anticorpo monoclonal desenvolvido para marcar esta proteína em tecidos fixados em formol mais utilizado é o MIB-1, que se encontra aumentado em tecido em proliferação (GONZALEZ-MOLES et al., 2010). A porcentagem de células imunorreativas para esse anticorpo usualmente se correlaciona bem com as características morfológicas de proliferação celular, particularmente índice mitótico e grau de diferenciação do tumor (GONZALEZ-MOLES et al., 2010; LUPORSI et al., 2012).

A proliferação de células tumorais está relacionada com o prognóstico em muitos tumores (DA SILVA et al., 2015; LIU et al., 2015). Sendo que, em neoplasias indiferenciadas, o Ki67 é um eficiente marcador de proliferação celular disponível, permitindo estabelecer uma relação com o prognóstico. Contudo, o papel desta proteína como marcador prognóstico em carcinoma de boca ainda não está completamente definido e variações metodológicas podem ser responsáveis pelos diferentes resultados observados pelos autores. Todavia tem sido relatado um aumento da marcação de Ki67 em lesões potencialmente malignas e no câncer de boca (SLOOTWEG, KOOLE e HORDIJK, 1994; KUROKAWA et al., 2003; TABOR et al., 2003).

2.5 Transição epitélio-mesênquima

A transição epitélio-mesênquimal, do inglês *epithelial mesenchymal transition* (EMT) é um processo caracterizado pela perda do fenótipo epitelial e a aquisição de características mesenquimais (XU, LAMOUILLE e DERYNCK, 2009).

As células epiteliais e as células mesenquimais são os principais tipos celulares que compõe os organismos multicelulares. As células epiteliais formam camadas de células justapostas, polarizadas e unidas entre si através de moléculas de adesão que interagem com a membrana basal dos tecidos através de sua aderência à superfície, formando camadas de revestimento em diversas estruturas do corpo(ZEISBERG e NEILSON, 2009). Já as células mesenquimais geralmente não apresentam estrutura organizada e também não possuem uma compacta adesão intercelular, o que facilita a sua migração. Contudo, as células epiteliais podem passar por diversas mudanças, como a perda da capacidade de adesão celular e de polaridade, rompimento da membrana basal que as tornam semelhantes às células mesenquimais, com capacidade de locomover-se e de invadir outros tecidos, tornando-se uma célula indiferenciada, com características mais primitivas (ACLOQUE et al., 2009; THIERY et al., 2009).

A EMT está presente em situações biológicas, sendo dividida em 3 subtipos conforme a situação em que estão envolvidas: (THIERY et al., 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009)

- 1- Implantação e formação do embrião
- 2- Cicatrização e reparação dos tecidos
- 3- Invasão e metástases de neoplasias

A EMT é peça fundamental para compreensão do comportamento das neoplasias, pois na carcinogênese esse processo está associado a alterações morfológicas celulares e mudanças de um estado estático para um estado migratório. Isso se dá pois são as células do fronte de invasão que se tornam capazes de se adaptarem fora do ambiente gerado pela membrana basal (Figura 3). Alguns elementos fundamentais são descritos no processo de EMT tais como a perda da aderência e da polaridade celular. Entretanto a EMT confere às células não só um fenótipo mesenquimal, mas também a aquisição de propriedades de células-tronco tumorais, facilitando a disseminação do tumor e crescimento à distância (JUNG, BRABLETZ e KIRCHNER, 2006; CHAFFER e WEINBERG, 2011).

A EMT também pode ser identificada por perda de marcadores de células epiteliais, como a E-caderina e aquisição de marcadores de células mesenquimais, incluindo N-caderina e a vimentina, permitindo o aumento no comportamento migratório. Esse processo pode ser explicado pela ativação de uma grande variedade de

mecanismos através do fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), da interleucina (IL) -6, do fator de crescimento epidérmico (EGF), e do fator de crescimento de fibroblastos (TGF) (SULLIVAN et al., 2009; THIERY et al., 2009).

Alguns estudos mostraram que a presença de processo de EMT é um preditor de progressão do CEC de boca e também pode ser considerado um fator de prognóstico (LIANG et al., 2011; SAKAMOTO et al., 2012). Estas características da EMT são encontradas não apenas na progressão do CEC, mas também em desordens potencialmente malignas. Isto sugere que mudanças na EMT podem ser encontradas no início do desenvolvimento de CEC, e a identificação de genes e proteínas envolvidos nesse processo de transição pode ser um potencial biomarcador de transformação maligna (CHAW et al., 2012).

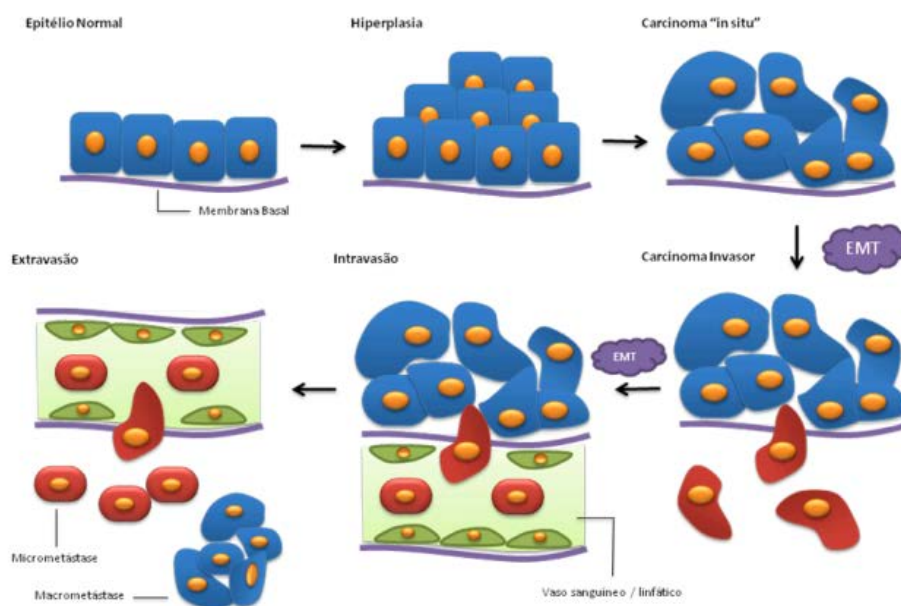


Figura 3: EMT na progressão do carcinoma. As células normais do epitélio podem sofrer um processo proliferativo clonal dando origem à hiperplasia. Alterações epigenéticas e mutações genéticas levam ao carcinoma “in situ” ainda contido pela membrana basal intacta. Novas mudanças podem induzir uma disseminação local das células neoplásicas iniciando o processo de EMT, com ruptura da membrana basal e extravasamento das células neoplásicas ao estroma, as células atingem a circulação linfática ou sanguínea e são levadas passivamente pela circulação à órgãos distantes. Neste novo local, as células neoplásicas migram para o novo órgão ou tecido onde podem ficar isoladas ou formar novo tumor.

Fonte: Valejo et al 2010

2.6 Vimentina

O citoesqueleto constitui-se de um conjunto de proteínas que, associadas a um grande número de proteínas colaboradoras, polimerizam estruturas fibrilares ou tubulares presentes no citoplasma e no interior do núcleo. Essa estrutura é formada por microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos ou pela associação entre eles. Suas principais funções são coordenar a distribuição de organelas na célula, sustentação, resistência, movimentação, alterações de forma e da distribuição de organelas desencadeadas por interações entre a célula-matriz extracelular e entre células diferentes (HERRMANN et al., 2003). O citoesqueleto possui capacidade de reorganização contínua, sendo ativado sempre que a célula altera sua forma, se divide ou responde ao seu ambiente (ALBERTS B., 1997).

Os filamentos intermediários do citoesqueleto se dividem em 6 subclasses. A classe I é representada pelo grupo de ceratinas ácidas e a classe II pelas ceratinas básicas, ambas encontradas em células epiteliais. Já a classe III é formada pelos filamentos de vimentina (células mesenquimais), desmina (células musculares) GFAP - proteína glial fibrilar ácida (glia e astrócitos) e periferina (neurônios do sistema nervoso periférico). A classe IV, é expressa em neurônios do sistema nervosa central e inclui os neurofilamentos e α -internexina. As classes V e VI são formadas pela laminina e nestina, respectivamente (HERRMANN et al., 2003).

Entre a grande família de proteínas dos filamentos intermediários, a vimentina é o principal membro. Ela está presente na maioria das células mesenquimais, sendo usada como marcador do desenvolvimento celular e tecidual. Essa proteína tem mostrado participação em um grande número de funções críticas, frequentemente relatada na organização de proteínas envolvidas na adesão celular, na migração, na sinalização celular e na ancoragem do núcleo das células e no posicionamento de suas organelas no citoplasma, sendo uma molécula integradora mecânica do citoplasma celular (IVASKA et al., 2007).

A vimentina está presente num amplo número de tipos celulares, incluindo fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (EVANS, 1998). Em adultos, a vimentina se expressa em todas as células mesenquimais do tecido conjuntivo, e é visto no sistema nervoso central e do tecido muscular (EVANS, 1998; IVASKA et al., 2007).

Em situações especiais, a vimentina passa a ser exibida por células não mesenquimais, por exemplo, no processo de carcinogênese. Ela é o marcador mais comum associado à EMT (Figura 4). Sua expressão elevada correlaciona-se ao aumento da migração, recorrência local e metástases (ACKLAND et al., 2003). Além disso, as células que expressam vimentina apresentam maior , sendo capazes de invasão e proliferação.

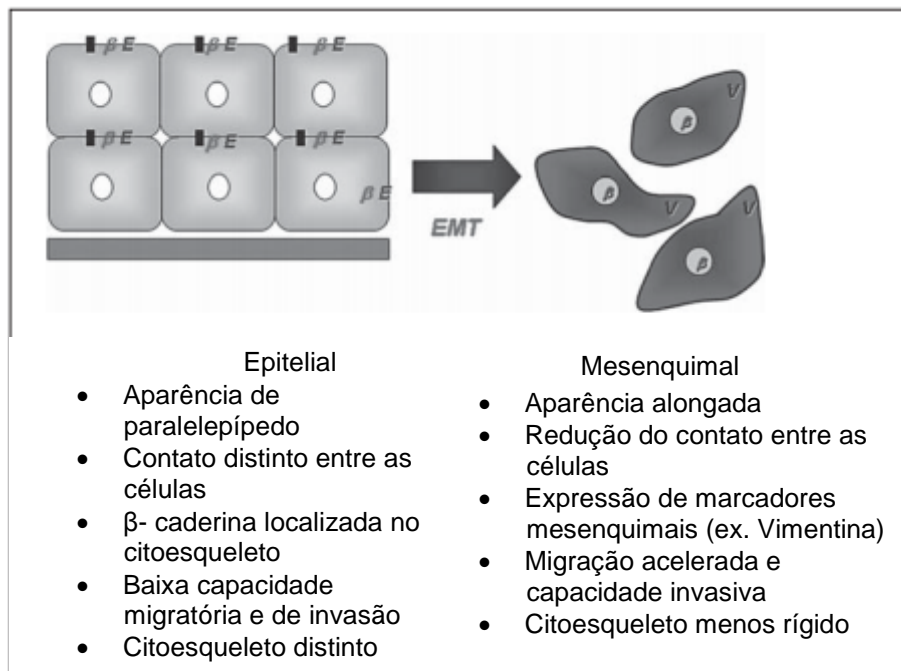


Figura 4: Células expressando um fenótipo epitelial (esquerda) e um fenótipo mesenquimal (direita) com a expressão de marcadores mesenquimais como a vimentina

Fonte: Kokkinos et al (2007).

O aumento da expressão de vimentina tem sido observado em carcinomas de mama, próstata e cólon sendo indicativo de comportamento tumoral agressivo e de prognóstico reservado (ANDREOLAS et al., 2008; ARMSTRONG et al., 2011; KATZ et al., 2011). Estudos anteriores, em pacientes ou em linhagens celulares mostraram que a expressão aumentada de vimentina em tumores tem sido associada com recorrência local, invasão tumoral e metástase (MANDAL et al., 2008; LIU et al., 2010; NIJKAMP et al., 2011). Alguns estudos sugerem que a expressão da vimentina pode ser detectada mesmo antes das células tumorais exibirem a morfologia mesenquimal (DE ARAUJO et al., 1993; PRAHLAD et al., 1998). No CEC de boca a expressão de vimentina é observada em células mais indiferenciadas nas áreas de invasão e esse processo ocorre

sempre acompanhado da perda de outros marcadores epiteliais como E-caderina e desmoplaquinas (CASTILHO, 2003). Chaw et al. (2012) (CHAW *et al.*, 2012) observaram um significativo aumento da expressão de vimentina entre o epitélio bucal normal, no epitélio displásico e no CEC. Assim sendo, a redução da expressão de E-caderina e um aumento na expressão de vimentina em epitélios displásicos e em CEC sugerem que a EMT está ocorrendo, e pode estar auxiliando no desenvolvimento do CEC. Assim como foi observado pelos mesmos autores, houve um aumento na expressão de vimentina no fronte de invasão, reforçando o papel dessa proteína na migração celular, correlacionando esse marcador com o comportamento tumoral invasivo.

2.7 TGF- β 1

O fator de crescimento e transformação beta (TGF- β) é uma superfamília que inclui mais de 100 diferentes proteínas. Um número superior a 40 tem sido descrito em mamíferos (DERYNCK, ZHANG, 2003; GIEHL, IMAMICHI, MENKE, 2007). Essa citocina tem um papel fundamental na regulação da síntese da matriz extracelular, aumentando a síntese de proteínas e inibindo sua degradação tanto pelo aumento da atividade de inibidores de proteases e diminuição das metaloproteinases, como pelo estímulo a receptores da matriz extracelular (Kaneto et al, 1993). Essa proteína também regula a transcrição do colágeno tipo I, II, e IV, fibronectina, laminina e integrinas.

Os membros dessa superfamília (TGF- β 1, β 2 e β 3) foram descritos como fatores que induzem homeostase, proliferação celular, cicatrização de feridas, imunossupressão e angiogênese. Essas ações se devem ao papel destas proteínas em processos como proliferação, migração, diferenciação celular e apoptose (BIERIE e MOSES, 2006). Apesar do TGF- β 1 agir inibindo a proliferação de células epiteliais normais, paradoxalmente é encontrado em altas concentrações em células tumorais (AKHURST e DERYNCK, 2001; WAKEFIELD e ROBERTS, 2002; DUMONT e ARTEAGA, 2003; GIEHL, IMAMICHI e MENKE, 2007).

Isso acontece porque, em estágios iniciais da carcinogênese, quando ainda há uma resposta normal das células epiteliais ao TGF- β 1, ele parece atuar como supressor da progressão tumoral (CHEN et al., 2011; SALVADORI et al., 2014). Entretanto, nos estágios tardios, parece promover invasão celular e metástases, angiogênese e síntese de proteínas da matriz extracelular ou ainda participar da regulação da resposta imune por meio de sinalização autócrina (CAMPISI, 2000). Vários estudos indicam que as

células tumorais apresentam uma síntese de TGF- β 1 aumentada quando comparada com os seus homólogos normais (WALKER e DEARING, 1992). Em função disso, os níveis elevados de TGF- β 1 favoreceriam o crescimento do tumor e sua progressão (ROBSON et al., 1996). Além disso, os níveis aumentados de TGF- β 1 tem sido relacionados a redução da resposta imunológica (BECK, SCHREIBER e ROWLEY, 2001), estimulação da angiogênese (CHOI, CHOI e PARK, 1997; DERYNCK, AKHURST e BALMAIN, 2001; BERTOLINO et al., 2005), aumento da síntese de enzimas proteolíticas (SEOMUN et al., 2001; KIM et al., 2004) e estimulação da deposição de matriz extracelular (CHENG, LOVETT, 2003) no microambiente tumoral.

Resumidamente o TGF- β exerce o seu efeito através de uma cascata de reações de fosforilação. Primeiramente, a ativação da transdução do sinal do TGF- β em células epiteliais tem seu início após a ligação do peptídeo TGF- β ao seu receptor do tipo II (T β RII) e sua ligação com o receptor tipo I (T β RI). A partir desse receptor a reação pode ser realizada de forma SMADS-dependente ou SMADS- não dependentes (Figura 5). Na vias SMAD-dependente, a ligação ao T β RI leva a fosforilação de proteínas citoplasmáticas denominadas R-SMADS (SMADS reguladas por receptor). Dois tipos dessas proteínas participam da transdução do sinal de TGF- β , SMAD2 e SMAD3, e sua fosforilação promove a formação de homodímeros ou heterodímeros. A transdução do sinal é então mediada por uma proteína SMAD co-estimulatória (C-SMAD), comum à transdução de outros membros da super-família do TGF- β , SMAD4. O dímero pSMAD liga-se à SMAD4 translocando-se para o núcleo e controlando a transcrição de diversos genes alvo. Nas vias Smads-não dependentes, o receptor tipo I ativado transmite sinais via outros fatores, tais como TRAF6, TAK1, p38 MAPK, PI3K, AKT, e JNK. Além disso, a via de sinalização do TGF- β pode também ser influenciada por outras vias de sinalização tais como Wnt, Hedgehog, Notch, IFN, TNF, e vias Ras. O crosstalk entre TGF- β e outras vias de sinalização reflete sua capacidade de propagar diferentes sinais com especificidade temporal e espacial (GIEHL, IMAMICHI e MENKE, 2007; CHEN *et al.*, 2011; SEDDA et al., 2015).

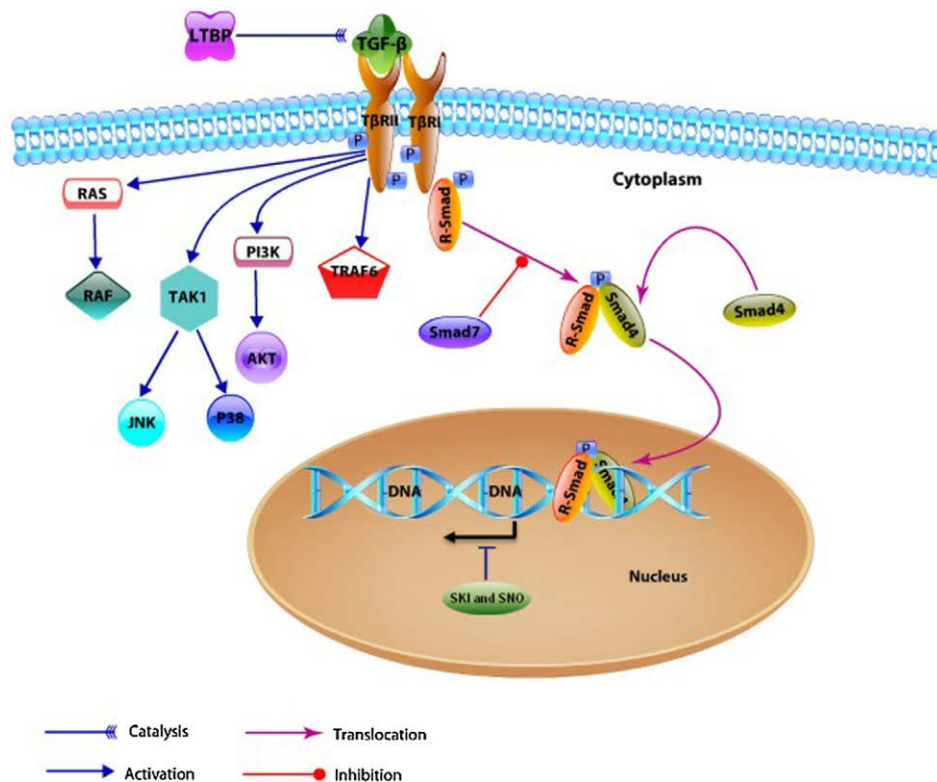


Figura 5: Representação esquemática da via de sinalização do TGF- β . Ativação da via do TGF- β Smads- dependente ou Smads-não dependentes

FONTE: Adaptado de Lopes et al 2014.

Novos estudos indicam que o polimorfismo do TGF- β 1 está envolvido com aumento da susceptibilidade ao CEC de boca, demonstrando que indivíduos portadores desse alelo tem risco relativo de 2,73 vezes de desenvolver esse câncer (CARNEIRO et al., 2013). Evidências apontam para o conceito de que a transformação neoplásica de câncer bucal pode resultar na perda de uma resposta inibidora do crescimento de TGF- β , pela regulação de seus receptores ou alterações em genes SMAD. Os genes da via de TGF- β mutados são mais comumente TGFBR2, TGFBR1, SMAD4 e SMAD2 (CHEN et al., 2011). Além disso, na maioria dos carcinomas, em culturas celulares, a expressão de T β RI e T β RII está alterada nos níveis de proteína e / ou de RNAm (ATTISANO e WRANA, 2002; MINCIONE et al., 2008)

Outro importante papel exercido pelo TGF- β 1 está relacionado ao processo de EMT. O aumento da expressão de TGF- β 1 em células neoplásicas tem sido relacionado a

diminuição de E-caderina e o aumento da expressão de vimentina, característicos da EMT, sendo um evento chave durante a invasão (CHEN et al., 2011)

Estudos clínicos têm demonstrado haver associação entre a expressão de TGF- β 1 *in vivo* e o aumento da capacidade de invasão de tumores de mama (ITO et al., 1990; GORSCH et al., 1992) e próstata (THOMPSON et al., 1992) e com redução da sobrevida em carcinomas pancreáticos (FRIESS et al., 1993) relacionados a regulação desse fator de transcrição na EMT. Foram evidenciadas altas concentrações deste fator de crescimento em câncer colorretal (HAWINKELS et al., 2009), carcinomas gástricos (MUTOH et al., 2010), carcinomas renais (KOMINSKY et al., 2007) e CEC de cabeça e pescoço (LOGULLO et al., 2003). Também, o TGF- β tem sido relacionado com fenótipo mais agressivo e resistência ao tratamento. Estudos prévios com linhagem de células de CEC de cabeça e pescoço têm demonstrado que o TGF- β 1 promove o crescimento tumoral e a transcrição epitélio-mesênquima (CHEN et al., 2011; HWANG, PARK e CHUNG, 2014)

O TGF- β 1 também tem sido relacionado com fenótipo mais agressivo e resistência ao tratamento. Estudos prévios com linhagem de células de CEC de cabeça e pescoço têm demonstrado que o TGF- β 1 promove o crescimento tumoral e EMT (CHEN *et al.*, 2011; HWANG, PARK e CHUNG, 2014). Blick et al (2010) encontraram que as linhagens de carcinoma de mama expressam fortemente a via do TGF- β 1 e se tornam mais semelhantes as células epiteliais após a inibição da via desse fator de transcrição.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi comparar o perfil de acetilação de histona 3 com proliferação celular e transição epitélio mesênquima em leucoplasias e CEC de boca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar a imunomarcação de histona H3 acetilada, Ki67, TGF- β 1 e vimentina com dados clínico-demográficos de leucoplasias e CEC de boca.

Correlacionar a imunomarcação de histona H3 acetilada, Ki67, TGF- β 1 e vimentina com a graduação histopatológica de leucoplasias e CEC de boca.

Correlacionar a imunomarcação de histona H3 acetilada, Ki67, TGF- β 1 e vimentina com o comportamento de leucoplasias e CEC de boca

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico apresentado de acordo com as normas do periódico Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology.

HISTONE MODIFICATIONS IMPACT PROLIFERATION, EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION MARKERS AND PROGNOSIS IN ORAL CANCER.

Liana Preto Webber¹, Vivian Petersen Wagner¹, Camila Weissheimer¹, Luise Meurer², Vinícius Coelho Carrard¹, Cristiane Squarize³, Rogério Castilho³, Manoela Domingues Martins¹

¹ Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Department of Pathology, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³Laboratory of Epithelial Biology, Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, United States of America

Corresponding Author:

Manoela Domingues Martins
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503
CEP: 90035-003
Santana, Porto Alegre RS, Brazil
Phone: 55-51-33085011
manomartins@gmail.com

Abstract

Objective: Analyze the association of acetylation of histone 3 (acetyl-histone H3) with cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral leukoplakia (OL) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) and correlate them with clinic-demographic data, histopathological grading and the behavior of these lesions.

Study Design: We analyzed 10 cases of normal oral mucosa (NOM), 20 cases of OL and 75 cases of OSCC. All samples were submitted to immunohistochemical analysis using anti-acetyl histone H3, Ki67, vimentin and TGF- β 1.

Results: Acetyl-histone H3 labeling was significantly lower in cases of OSCC compared to OL ($p=0.03$). It was not found difference between NOM and OL. In parallel, the proliferation analysis revealed a gradual increase on Ki67 labeling ($p<0.00$) during oral carcinogenesis with highest value detected in OSCC. Also, an increase on EMT markers, vimentin ($p=0.03$) and TGF- β 1 ($p<0.00$) were noted. A higher mean of acetyl-histone H3 was associated with good prognosis ($p= 0.01$) and similarly a tendency to improved survival rate was observed ($p=0.06$).

Conclusion: OSCC are hypoacetylated, exhibit higher proliferative profile and epithelial-mesenchymal transition characteristics. Furthermore, acetyl histone H3 can be considered a prognostic marker in OSCC.

Keywords: Epigenetic. Histone. Prognosis. KI67. Epithelial-mesenchymal transition

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is among the six most common cancer in the world with more than half a million cases a year and it has been associated with high mortality rates¹. The process of cellular transformation and tumor progression of OSCC called oral carcinogenesis displays multiple steps involving the accumulation of multiple genetic alterations. This process is associated with increased activity of many oncogenes and/or deactivation of tumor suppressor genes resulting in loss of control of the cell cycle and survival as well changes in morphology and cell behavior². In the early stages of carcinogenesis may be clinically identified potentially malignant disorders. Among these changes, oral leukoplakia (OL) is the most prevalent^{3, 4}. In later stages of carcinogenesis can be observed in situ carcinoma and invasive OSCC.

In addition genetic mutations, carcinogenesis can be influenced by changes in the inheritable mechanisms and potentially reversible, called epigenetic mechanisms, which cause changes in gene expression occurring without changes in the DNA sequence. These epigenetic changes can cause changes in chromatin by altering the transcriptional activity⁵ through DNA methylation, noncoding RNAs of action and modification of histones⁶⁻⁸.

Advances in oncogenomic, especially with the advent of next-generation sequencing (NSG) has demonstrated an important role of epigenetic modifications in the development of various cancers, including the OSCC^{2, 7, 9, 10}. Among the many changes in head and neck SCC, mutations in histones, histone modifiers, activators and co-activators of transcription, transcription regulators have been identified^{7, 11}. Moreover, some studies show that epigenetic changes like modifications to histones can be associated with the development of potentially malignant disorders in early stages of carcinogenesis providing the appearance of subsequent genetic changes that allow proliferation and tumor growth¹²⁻¹⁴.

Histones are proteins that assist in the packaging of DNA and exhibit tails that protrude out of nucleosomes may subject post-translational modifications such

as the addition of an acetyl group - or removal of this acetylation- acetyl group - deacetylation. Among the various epigenetic mechanisms that cause modifications on histone, acetylation is the best characterized and has been shown to be essential component in the regulation of chromatin and its transcriptional activity. The effects of deregulation in histone acetylation mechanisms can generate epigenetic uncontrolled in the transcriptional activity of various genes triggering events that contribute to malignant transformation. It is because with the acetylated histone there is a relaxation in the structure of chromatin accessibility and facilitates the recruitment of nuclear factors for transcription affecting DNA which can be critical in determining the formation, aggressiveness of a tumor, or even its response to chemotherapy¹⁵⁻¹⁷.

The epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a process where there is loss of epithelial phenotype and acquisition of mesenchymal characteristics.^{18, 19} This process is critical for behavior of cancer because it is associated with cellular morphological changes and switch from a static state to migratory status. This happens because the cells of the invasive front become able to adapt out of the basal membrane generated environment.²⁰ However, these characteristics are found not only in the progression of the OSCC, but also in potentially malignant disorders. This suggests that changes in EMT can be found early in the development of OSCC²¹.

Studies have been conducted to evaluate the effect of histone acetylation in OSCC. However there is not still consensus of its role in oral carcinogenesis and tumor profile. The understanding of how the histone acetylation modulates cell proliferation, tumor microenvironment and the behavior of these tumors deserves further investigations.

Therefore, the aim for this study was to compare the acetylation of histone 3 profile with cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in OL and OSCC.

Material and methods

Study population

The sample comprised 20 cases of OL and 75 cases of OSCC diagnosed between 2001 and 2009. These cases were selected from the archives of the Pathology Laboratory of Clinic Hospital from Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Human Research Ethics Committee approval nº 527.125). Patient's clinical data concerning demographic characteristics, risk factors, clinical aspects, lesions localization, TNM system and follow-up information (clinical outcome and survival time) were retrieved from medical records. The follow-up period was defined as the date of diagnosis until the last visit to the hospital or date of death. Good prognosis was defined as no recurrence or death in a period of 5-years follow up, poor prognosis was defined as presence of recurrence or death at follow-up. Ten normal oral mucosa (NOM) tissues obtained from the adjacent mucosa of mucocele biopsies were included for immunohistochemical analysis.

Histopathological analysis

Slides of the surgical specimen stained with hematoxylin-eosin (H&E) were obtained for histological grading. Graduation was performed by a consensus of two expert pathologists blinded regarding case's clinicopathological features and outcome. In leukoplakia, the presence and degree of epithelial dysplasia was analyzed using the criteria proposed by the World Health Organization (2005)²² Cases of OSCC were graduated according to the criteria described by Bryne et al. (1992)²³ as Grade I (score 4-8), Grade II (score 9-12) and Grade III (score 13-16).

Immunohistochemistry

For immunohistochemical staining, the samples were sectioned into 3- μ m sections and placed on silanized slides. The slides were deparaffinized in xylene and hydrated in descending grades of ethanol. Antigen retrieval was performed prior to incubation of primary antibody. The primary antibodies, sources, antigen retrieval, dilutions and incubation times were as follows: Acetyl-histone H3Lys9 (C5B11 9649, Cell Signaling, citrate buffer in a water bath at 90 °C for 18 h, 1:50, 1 h) , Ki67 (MIB-1, DAKO, citrate buffer in a water bath at 90 °C for 18 h, 1:50, 1 h), Vimentin (V-9, DAKO, citrate buffer in a water bath at 90° C for 18h, 1:50, overnight) and TGF- β 1 (sc-146, SantaCruz Biotechnology, citrate buffer in a water bath at 90 °C for 18 h, 1:100, overnight). The sections were then incubated with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Novocastra, Newcastle, UK) and counterstained with Mayer's hematoxylin. Negative controls were obtained by replacing the primary antibodies with non-immune serum. The positive controls were sections of breast cancer for acetyl-histone H3, human appendix for Ki67, internal control for vimentin and rat uterus for TGF- β 1. Pathologists who were unaware of the demographic, clinical or behavioural data performed slides analysis.

Images of the selected fields were captured at a magnification of 400x using a conventional light microscope (CX41RF model, Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) coupled to a camera (QColor 5, RTV, Olympus Inc., BX51, Canada) and connected to a computer (Dimension 5150, Dell, Porto Alegre, RS, Brazil) using the QCapture software program, version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc., Surrey, DC, Canada). The images were analyzed using Image J software program (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA). The number and percentage of positive cells were assessed in each case.

In each case 1,000 cells were counted and expressed as the percentage of positive cells (mean and standard deviation). Nuclear labeling was considered positive for acetyl-histone H3 and Ki67 (proliferative labeling

index-PLI) and cytoplasmic labeling for vimentin. In NOM and OL 500 basal layer cells, 500 parabasal layer cells, and 500 suprabasal layer cells were counted. For OSCC cases, 1000 cells of invasive front without distinction of layers were assessed. The results were analyzed as percentage of positive cells in all layer or separated in basal, parabasal and suprabasal layers (mean and standard deviation). Slides stained with TGF β 1 were analyzed semi-quantitatively by two observers using scores based on the percentage of positive cells. Only cytoplasmic expression was considered positive. Each case was assigned a score as follows: 0 (0 to 10 % positive cells), 1 (10 to 50%), or 2 (over 50 %).

Statistical analysis

All clinical and immunohistochemical data were analyzed with SPSS for Windows, version 19. Fisher's exact test, Student's t-test, one-way ANOVA and Kruskal-Wallis. Spearman's correlation coefficients were calculated to determine the correlation between immunochemical expression in OL and OSCC. For survival analysis were made Kaplan-Meier cumulative survival curves. For all tests, a p value <0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Demographic, clinical and histopathological characteristics

Table 1 displays the demographic and clinical characteristics of the sample. A statistically significant association was observed for tobacco (p=0.00) and alcohol (p=0.01) comparing OSCC and OL. Higher number of OSCC patients consumes these risk factors. Clinically, the OSCC patients presented more ulcerative lesions (p=0.00) accompanied with pain (p=0.00) when compared with OL patients.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the leukoplakia and OSCC patients in this cohort.

Demographic/ clinical characteristics	Leukoplakia (n=20)	OSCC (n=75)	<i>p Value</i>
Age			
Mean	56.65	56.20	0.83
SD	15.19	8.69	
Gender			
Male	14 (70%)	64 (85.3%)	0.11
Female	6 (30%)	11 (14.7%)	
Ethnicity			
White	19 (95%)	71 (94.6%)	>0.99
Non-white	1 (5%)	4 (5.4%)	
Tobacco habits			
User/former user	11 (55.0%)	63 (84.0 %)	0.00
Non-user	8 (40.0%)	1 (1.3 %)	
Unknown	1(5.0%)	11 (14.7%)	
Alcohol consumption			
User/former user	8 (40.0%)	50 (66.7%)	0.01
Non-user	11 (55.0%)	9 (12.0%)	
Unknown	1 (5%)	16 (21.3%)	
Site			
Tongue/ Floor of mouth	8 (40.0%)	35 (46.7%)	0.01
Palate	-	27 (36.0%)	
Other locations	9 (45.0%%)	11 (14.7%)	
Unknown	3 (15.0%)	2 (2.6%)	
Clinical aspects			
Ulcer	-	60 (80.0%)	0.00
Spot/Plaque/Nodule	18 (80%)	9 (12.0%)	
Unknown	2 (20%)	6 (8.0%)	
Pain			
Yes	5 (25.0%)	52 (69.3%)	0.00
No	13 (65.0%)	9 (12.0%)	
Unknown	2 (10%)	14 (18.7%)	
TNM			
I/II		13 (17.3%)	
III/IV		59 (78.7%)	
		3 (4.0%)	
Size			
<2 cm	4 (20%)		
≥2cm	16 (80%)		

Histopathological evaluation of the epithelial lining and degree of epithelial dysplasia in the 20 cases of OL revealed that 8 patients (40.0%) had no dysplasia and 12 (60.0%) presented dysplasia. During the evaluation period, 3 cases of leukoplakia (15.0%) suffered malignant transformation, leading to an annual malignant transformation rate of 1.9%. These lesions were situated in the floor of mouth (n=2) and tongue (n=1). The initial biopsy showed no

dysplasia in one case and dysplasia in the other two cases. All cases presented multiple lesions with measuring ≥ 2 cm. In association of the OSCC samples examined, 21 (28.0%) were classified as grade I, 47 (62.7%) as grade II and 7 (9.3%) as grade III.

Kaplan-Meier cumulative survival curves followed by Log-rank test were performed and treatment impacted the patient's survival time (in months). Surgery alone showed improve the survival rates compared to radiation alone or the other treatments (Figure 1).

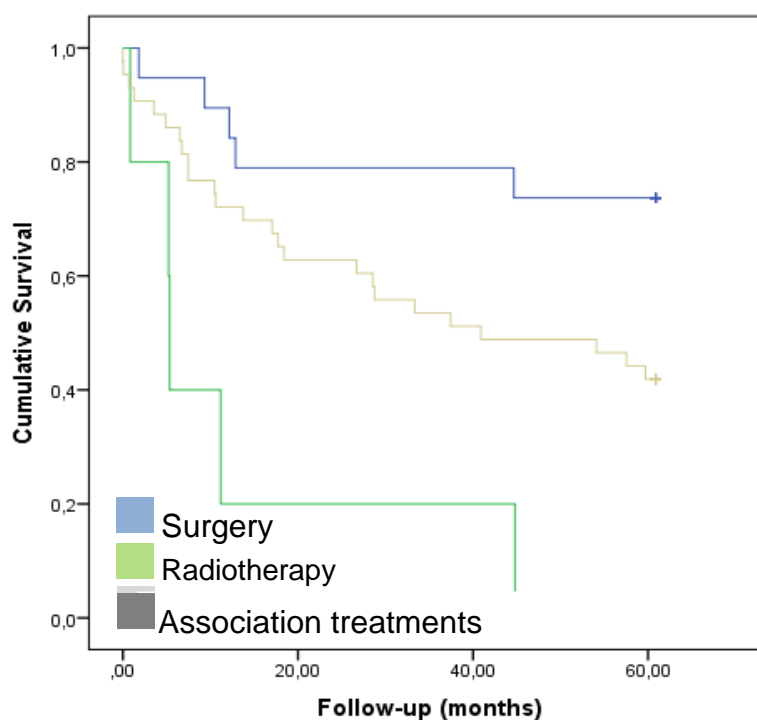


Figure 1. Kaplan-Meier analysis according to OSCC treatment. Statistical significance using a log-rank test ($p=0.00$).

The analysis of association of clinico-demographic characteristics and acetyl-histone H3, vimentin and TGF- β 1 in OL and OSCC revealed no statistical difference with all parameters analyzed. Higher percentage of Ki67 ($p=0.03$, student t test) was observed in smokers OL patient's (44.96 ± 18.82) compared to non-smokers (26.46 ± 13.63).

Modification of acetyl-histone H3 in epithelial cells is related with increase in proliferation and epithelial mesenchymal transition during oral carcinogenesis

Epigenetic events like histone modifications dynamically regulate gene expression and silencing during the multi-step carcinogenesis process. Here, we investigate the acetyl-histone H3 modification in NOM, OL and OSCC and compared with proliferation (Ki67) and epithelial mesenchymal transition (TGF- β 1 and vimentin) markers. The results of each marker analysis are described in Table 2.

All cases were positive for acetyl-histone H3. Analyzing cells of all layers together, the mean of acetyl-histone H3 labeling was 82.13% in NOM, 94.38 in OL and 76.96 in OSCC (Table 2 and Figure 2 A and B). OSCC were hypoacetylated compared to OL (ANOVA followed post hoc Bonferroni test, $p=0.03$). No difference was observed between NOM and OL ($p=1.00$). In parallel, the proliferation analysis revealed a gradual increase on Ki67 labeling (ANOVA followed post hoc Bonferroni test, $p<0.00$) during oral carcinogenesis with highest value detected in OSCC (Table 2 and Figure 2 C and D). In the same way, an increase on EMT markers (vimentin and TGF- β 1) was noted (Table 2 and Figure 3 A and B). Vimentin was positive in 3 cases of OL (15%) and 25 (33.34%) cases of OSCC. OSCC showed higher number of vimentin positive cells compared to NOM ($p=0.02$) and OL ($p=0.05$). Also, OSCC showed more TGF- β 1 positive cells than NOM ($p<0.00$) and OL ($p<0.00$). Difference was observed between OL and NOM (Fisher's exact test, $p=0.04$) (Figure 3 C and D). Figure 4 demonstrate as a schematic illustration the acetyl-histone 3, Ki67, vimentin and TGF- β 1 expression in oral carcinogenesis.

Table 2. Acetyl-histone H3, Ki67, vimentin and TGF- β 1 in NOM,OL and OSCC.

	NOM	OL	OSCC	p-value
Ac-histone H3	82.1% (\pm 8.7) ^a	94.4% (\pm 5.1) ^b	77.0% (\pm 20.9) ^a	0.03 *
Ki67	8.5% (\pm 3.10) ^a	35.4% (\pm 19.2) ^b	50.9 (\pm 18.2) ^c	<0.00 *
Vimentin	0% ^a	4.8% (\pm 13.8) ^b	51.8 (\pm 23.1) ^c	0.03 **
TGF-β1				
0-10%	90.0% (n=9)	30.0% (n=6)	16.4% (n=12)	
11 a 50%	10.0% (n=1)	70.0% (n=14%)	42.5% (n=31)	<0.00 #
>50%	-	-	41.10% (n=30)	

* ANOVA followed post hoc Bonferroni test

** Kruskal-Wallis followed post hoc Dunn test

Fisher's exact test

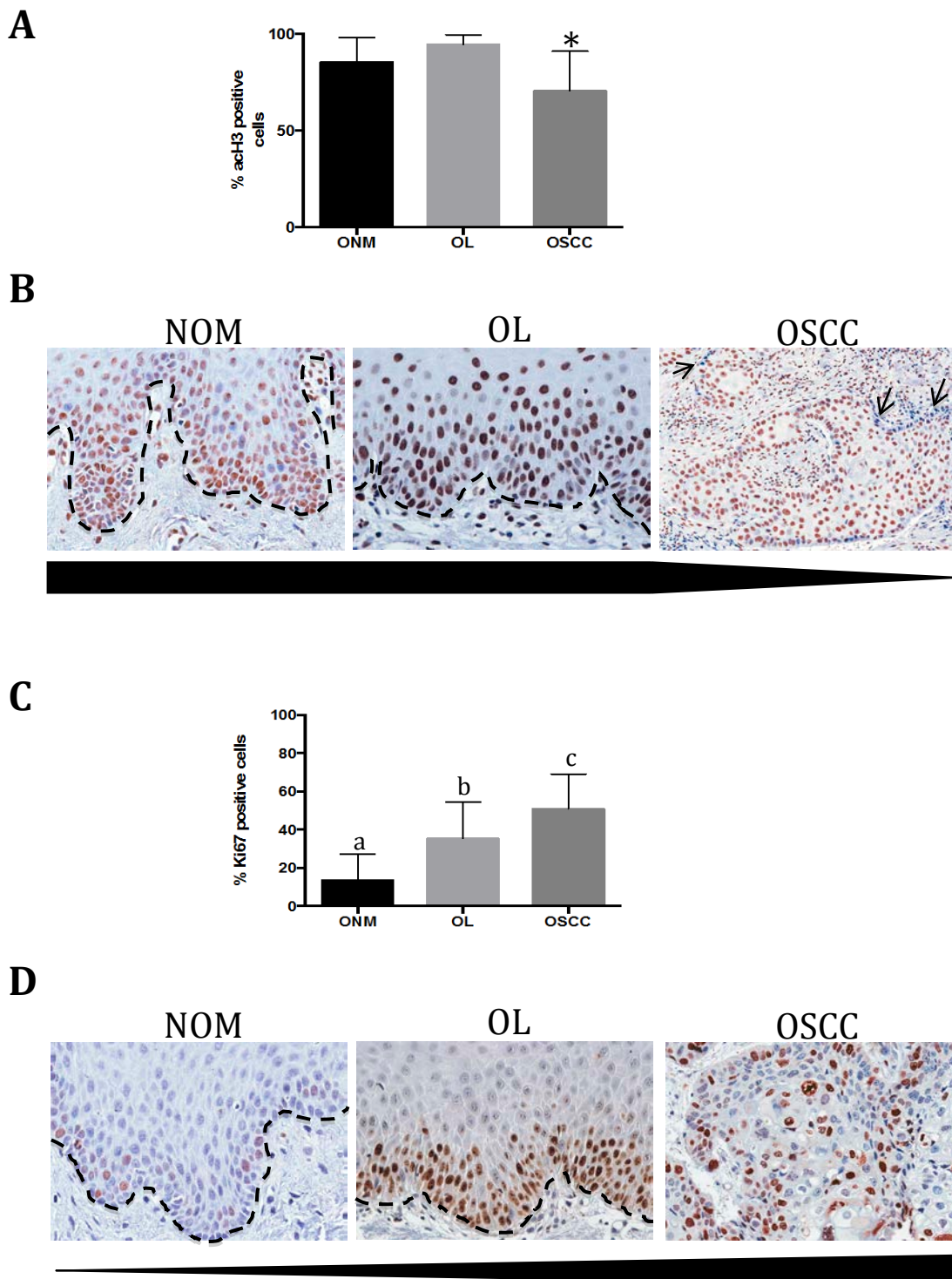


Figure 2. Decrease of acetyl-histone H3 and increase of Ki67 labeling is noted during oral carcinogenesis. (A) Graph of acetyl-histone H3 mean expression according to each diagnostic. Asterisk denotes significant differences ($p= 0.03$, one-way ANOVA post hoc Bonferroni test). (B) Representative examples of acetyl-histone H3 expression in NOM, OL and OSCC. This protein is hypoacetylated in OSCC. The arrows displays acetyl-histone H3 negative cells in periphery. Of invasive front tumor islands. (C) Mean of Ki-67 expression according to each diagnostic. Different lowercase letters denote significant differences ($p<0.00$, ANOVA followed by post hoc Bonferroni test). (D) Representative examples of KI67 expression in NOM, OL and OSCC. Higher KI67 labeling was detected in OSCC.

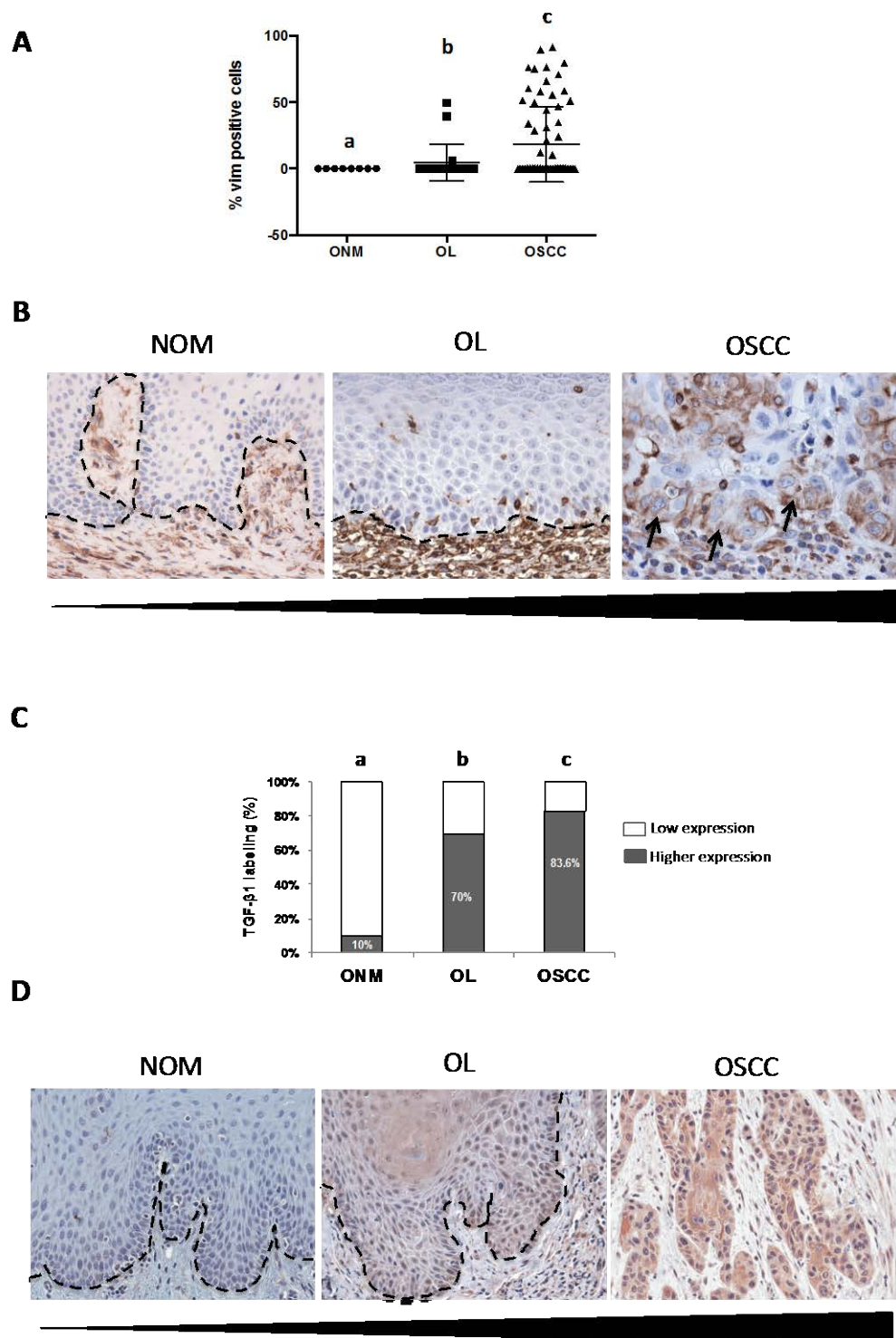


Figure 3. EMT markers in oral carcinogenesis. (A) Graph displays vimentin expression in all samples. OSCC showed higher number of positive cells. ($p=0.03$, Kruskal-Wallis post hoc Dunn test). (B) Representative examples of vimentin in NOM, OL and OSCC. The arrows show cells with cytoplasmic vimentin labeling in OSCC. (C) Analysis of TGF- β 1 in oral carcinogenesis. OSCC showed higher expression of this protein compared to the other conditions. Different lowercase letters denote significant differences ($p<0.00$, Fisher's exact test). (D) TGF- β 1 labeling in NOM, OL and OSCC. An increase statistically significant in TGF- β 1 was observed in OSCC.

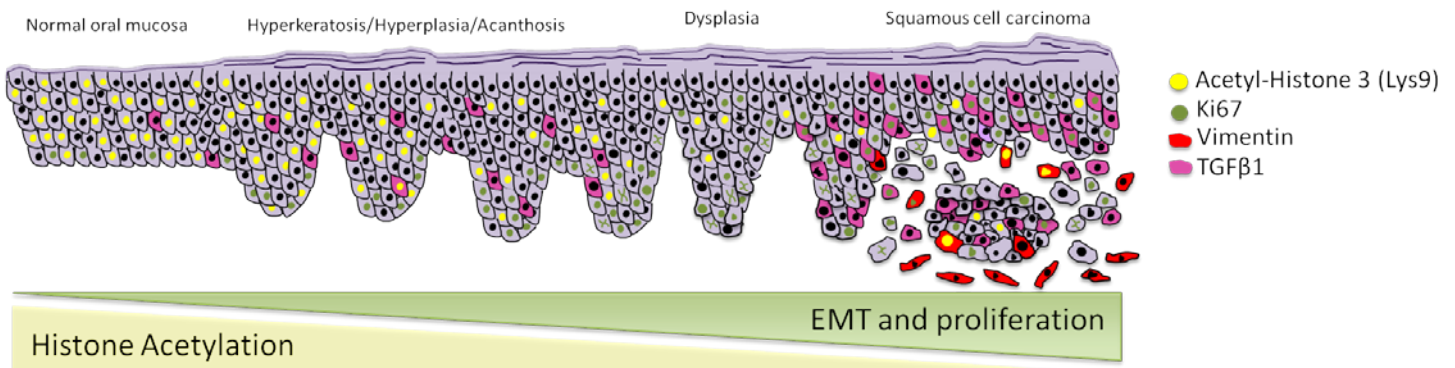


Figure 4. Schematic illustration demonstrating the acetyl-histone 3, Ki67, Vimentin and TGF-β1 expression in oral carcinogenesis. Note a decrease in acetyl-histone H3 expression in OSCC, mainly in periphery cells of tumor island in invasive front. Concomitantly, an increase on Ki67, vimentin and TGF-β1 expression is observed.

Since different events of tissue renewal occur in each epithelial compartment, a complementary analysis assessed each layer separately in NOM and OL (Table 3) and compared to percentage of positive cells of OSCC invasive front. The basal cell layer is the most important layer to be analyzed in epithelial tissue in the context of cancer formation because represents the proliferative and more undifferentiated layer. In this context, no difference was observed in this layer between NOM and OL. However, OSCC revealed a hypoacetylated profile compared to NOM and OL.

No association of histopathological aspects of OL and OSCC and acetyl-histone H3 was observed. No correlation of acetyl-histone H3 was observed with Ki-67 ($p=0.37$), vimentin ($p=0.62$) and TGF-β1 (Spearman's correlation coefficients test, $p=0.54$).

Table 3. Percentage of immunopositive cells for acetyl-histone H3 in epithelial layers of normal oral mucosa (NOM) and oral leukoplakia (OL).

	NOM	OL	p Value
	Mean (SD)	Mean (SD)	
Basal layer	81.43 (\pm 10.84)	88.87 (\pm 7.31)	0.41
Parabasal layer	83.39 (\pm 9.63)	95.09 (\pm 3.85)	0.01
Suprabasal layer	81.70 (\pm 8.79)	95.70 (\pm 5.74)	0.02

Student's t test; Mean (standard deviation)

Hypoacetylation of histone 3 is a predictive factor of poor prognosis in OSCC

The mean of acetyl-histone H3 of OSCC was compared in OSCC with good (83.14 \pm 13.76) and poor prognosis (71.98 \pm 24.23). An association between hypoacetylation of histone H3 with poor prognosis was observed (p=0.01, Student t test) (Figure 5A). Kaplan-Meier cumulative survival curves showed a tendency toward lower survival rates was for OSCCs patients with lower percentage of acetyl-histone H3 (Figure 5B).

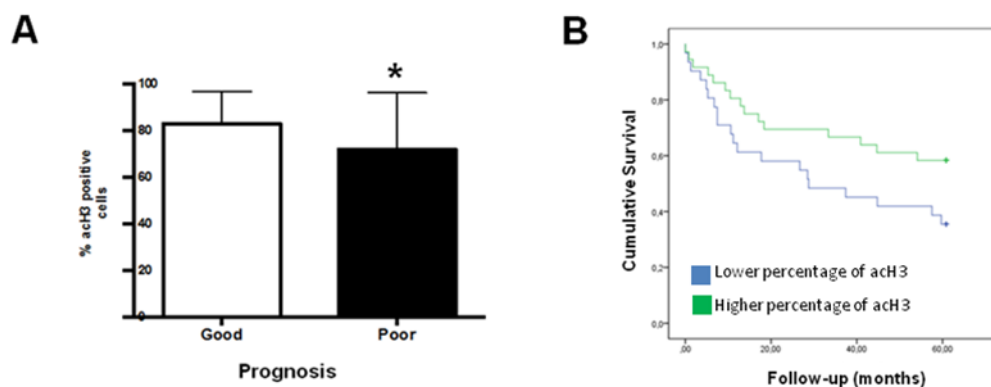


Figure 5. Analysis of acetyl-histone 3 and prognosis. (A) Graph displays mean percentage of acetyl-histone 3 positive cells according to prognosis. Higher labeling of this protein was associated with good prognosis (p=0.01, Student's t test). (B) Kaplan-Meier analysis of survival according to lower percentage of acetyl-histone H3 (\leq 70% cells positive) or higher acetyl-histone H3 (>70% cells positive) (p=0.06, log-rank test).

Discussion

Carcinogenesis is a multi-stage process that requires the accumulation of wide range of both genetic and epigenetic alteration resulting in tumor formation and progression^{24, 25}. Among the epigenetics mechanisms, histones modifications have a central role in chromatin remodeling regulating dynamically the gene expression and silencing⁷. Post-translational modifications in histones include acetylation, methylation, phosphorylation, ubiquitylation, which occur predominantly on the N-terminal histone tails²⁶. Histone acetylation has been implicated in process such as gene expression, cell cycle, DNA replication and DNA²⁷. The status of histone acetylation is dependent on the balance of the activities of histone acetyltransferase (HAT) and histone deacetylase (HDAC). HATs add acetyl groups to lysine residues, while HDACs remove the acetyl groups. In general, acetylation of histones opens chromatin, making DNA accessible for activation of gene expression or DNA replication, while deacetylation of those same histones renders DNA more compact, facilitating gene silencing^{2, 7, 28}

New evidences suggest that epigenetic alterations including histone modifications are associated with the initial steps of carcinogenesis^{2, 28}. Also, global histone modifications have been described in cancer biology, predicting cancer progression, patient survival and resistance to chemotherapy^{5, 8, 29, 30}. Therefore, identification of early epigenetic modifications in several steps of oral carcinogenesis will help us to understand epigenetic events that participate of tumor formation and progression. In the present study, we analyzed the modification of acetyl-histone H3 expression in NOM, OL and OSCC. Acetylation of specific histone lysine residues may have unique functions so; we decide to study acetylation of histone 3 at lysine 9 (H3K9ac) that is the most often modification associated with active transcription^{31, 32}. We observed that OSCC are hypoacetylated in comparison to NOM and OL when analyzed all the epithelium layers together or only the basal layer. Interestingly, we observed that NOM and OL are hyperacetylated compared to OSCC when analyzed all the epithelium layers together or only the basal layer. These results were expected since chromatin acetylation has been associated with cellular

differentiation and restrict cellular transformation of normal cells³³. OSCC presented reduction of acetyl-histone H3 (hypoacetylated). Similarly, abnormal changes in specific histone, such as reduced levels of acetyl-histone H3 have been described in others tumors like esophagus, lung and liver³⁴⁻³⁷. Giudice et al found that HNSCC cell lines are hypoacetylated compared to normal mucosa cell line. These results could be explained by the fact that histone modifications dynamically promote transcription of pro-survival genes and silence tumor suppressor genes to support the deregulated cancer physiology. Moreover, hypoacetylation of the histones H3 and H4 have been associated with cell proliferation, motility, invasion, accumulation and maintenance of cancer stem cells^{38, 39} that are characteristics of malignant phenotype.

We next examine the association of chromatin acetylation with OSCC prognosis. Increased chromatin condensation (hypoacetylation) in OSCC was associated with poor prognosis. Other studies have demonstrated that reduced levels of H3K9ac, H3K9me3 and H4K16ac are correlated with recurrence of non-small cell lung cancer^{34, 40, 41} and of acute myeloid leukaemia⁴¹. Similarly, other types of histones modifications like H3K4me2 and H3K18ac exhibited association of low level of expression and poor prognosis¹⁵. In parallel, overexpression of HDAC 2 and 6, that promote chromatin condensation were significantly associated with OSCC aggressiveness and progression^{30, 42}. Hypoacetylation induced by elevated HDAC2 expression occurs early during the colorectal and cervical carcinogenesis⁴³ as in oral carcinogenesis³⁰. Usually, chromatin condensation is a characteristic of tumor resistance to chemotherapies⁴⁴⁻⁴⁷ impaired apoptosis and DNA repair processes⁴⁸ that could explain the recurrence and non favorable behavior.

There are few studies involving analysis of histone acetylation in head and neck SCC^{10, 30, 47}. Chen et al 2013 demonstrated that global histone 3 modifications, including H3K4ac, H3K18ac and H3K27me3, play a major role in OSCC progression and patient prognosis. Noguchi et al. (2013) observed that increasing in H3K9ac (hyperacetylation) was associated with the absence of metastases in lymph nodes, initial tumors and well-differentiated carcinomas.

The acetylation of histone H3 is associated with gene activity and

regulation of several cellular functions^{31, 32}. However, the role of histone acetylation in important processes involved in oral carcinogenesis such as proliferation and epithelial mesenchymal transition is unknown. Then we decided to investigate the Ki67 labeling in parallel to acetylation of histone H3. We observed a gradual increase on Ki67 labeling during oral carcinogenesis with highest value detected in OSCC in accordance with previous studies⁴⁸⁻⁵² suggesting that malignant progression involves an increased number of cells licensed to proliferate. It is well known that Ki67 is an essential proliferative marker since it is expressed in the G1, S, G2, and M phases of the cell cycle and is absent from quiescent cells (G0) reflecting the total fraction of proliferation in tissues⁴⁸

Other aspect that we focused in the present study was the EMT process by vimentin and TGF- β 1 labeling. We observed an increase in EMT markers during carcinogenesis. OSCC presented higher percentage of cases and number of cells positive vimentin and TGF- β 1 positive. These indicate that during the tumor formation, the epithelial cells acquire mesenchymal cell morphology through up-regulation of mesenchymal markers. Although epithelial markers were not studied here, down-regulation of epithelial markers is described during the EMT process. These modifications are involved in cancer progression because promote an increase in migratory capacity, invasiveness and also are associated to chemotherapy resistance^{40, 55}. The increase in vimentin and TGF- β 1 expression has been observed in many cancers such as breast, prostate, and colon, and is usually indicative of aggressive tumor behavior and poor prognosis⁵⁴⁻⁵⁷. It has been reported that the condensation of chromatin, like hypoacetylation of histone H3, is an important determinant in controlling the EMT and progression of cancer⁵⁸. Giudice et al., 2013 observed that human HNSCC samples presented coexpression of acetylated histone 3 and vimentin in the tumor invasion front. Some studies have used inhibitors of key enzymes that regulate the process of histone modifications that could prevent the appearance of EMT and tumor progression⁵⁹⁻⁶²

Collectively, our results demonstrated a reduction in acetylation of histone H3 concomitant with increase in proliferation and EMT in the

progression of oral carcinogenesis as illustrated on Figure 4. OSCC are hypoacetylated and exhibited higher proliferative profile and EMT properties. Also, chromatin condensation (hypoacetylation of histone 3) can be considered a marker of poor prognosis.

References

- [1] Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral oncology* 2010 Jun;46(6):407-10.
- [2] Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. *Future oncology* 2012 Nov;8(11):1407-25.
- [3] Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *Journal* 2002 Nov;68(10):617-21.
- [4] Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquet J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2008 Mar;37(3):127-33.
- [5] 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. *Molecular cancer therapeutics* 2007 Nov;6(11):2967-75.
- [6] Blancafort P, Jin J, Frye S. Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules. *Molecular pharmacology* 2013 Mar;83(3):563-76.
- [7] Martins MD, Castilho RM. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis* 2013 Jul 29;1(Suppl 5):1-12.
- [8] Lee SH, Nam HJ, Kang HJ, Samuels TL, Johnston N, Lim YC. Valproic acid suppresses the self-renewal and proliferation of head and neck cancer stem cells. *Oncology reports* 2015 Jul 23.
- [9] Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, De Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *International journal of molecular sciences* 2012;13(2):2331-53.
- [10] Chen JH, Yeh KT, Yang YM, Chang JG, Lee HE, Hung SY. High expressions of histone methylation- and phosphorylation-related proteins are associated with prognosis of oral squamous cell carcinoma in male population of Taiwan. *Medical oncology* 2013 Jun;30(2):513.
- [11] 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 Aug 26;333(6046):1157-60.
- [12] Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006 Jun;27(6):1121-5.
- [13] Piscopo M, Campisi G, Colella G, Bilancione M, Caccamo S, Di Liberto C, et al. H3 and H3.3 histone mRNA amounts and ratio in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. *Oral diseases* 2006 Mar;12(2):130-6.
- [14] Mancuso M, Matassa DS, Conte M, Colella G, Rana G, Fucci L, et al. H3K4 histone methylation in oral squamous cell carcinoma. *Acta biochimica Polonica* 2009;56(3):405-10.
- [15] Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 2005 Jun 30;435(7046):1262-6.
- [16] Kurdistani SK. Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* 2011;67:91-106.
- [17] Burdelski C, Ruge OM, Melling N, Koop C, Simon R, Steurer S, et al. HDAC1 overexpression independently predicts biochemical recurrence and is associated with rapid tumor cell proliferation and genomic instability in prostate cancer. *Experimental and molecular pathology* 2015 Jun;98(3):419-26.
- [18] Jolly MK, Boareto M, Huang B, Jia D, Lu M, Ben-Jacob E, et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Frontiers in oncology* 2015;5:155.
- [19] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009 Nov 25;139(5):871-90.
- [20] Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer research* 2006 Dec 1;66(23):11271-8.
- [21] Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral oncology* 2012 Oct;48(10):997-1006.
- [22] Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, nose, & throat journal* 2006 Feb;85(2):74.
- [23] Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *The Journal of pathology* 1992 Apr;166(4):375-81.

- [24] Califano J, Ahrendt SA, Meininger G, Westra WH, Koch WM, Sidransky D. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer research* 1996 Dec 15;56(24):5720-2.
- [25] Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 2015 Jul;51(7):643-51.
- [26] Ayer DE. Histone deacetylases: transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends in cell biology* 1999 May;9(5):193-8.
- [27] Haigentz M, Jr., Kim M, Sarta C, Lin J, Keresztes RS, Culliney B, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin in patients with recurrent/metastatic head and neck cancer. *Oral oncology* 2012 Dec;48(12):1281-8.
- [28] Gonzalez-Ramirez I, Soto-Reyes E, Sanchez-Perez Y, Herrera LA, Garcia-Cuellar C. Histones and long non-coding RNAs: the new insights of epigenetic deregulation involved in oral cancer. *Oral oncology* 2014 Aug;50(8):691-5.
- [29] Giudice FS, Pinto DS, Jr., Nor 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.
- [30] Chang HH, Chiang CP, Hung HC, Lin CY, Deng YT, Kuo MY. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral oncology* 2009 Jul;45(7):610-4.
- [31] Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003 Mar;983:84-100.
- [32] Jayani RS, Ramanujam PL, Galande S. Studying histone modifications and their genomic functions by employing chromatin immunoprecipitation and immunoblotting. *Methods in cell biology* 2010;98:35-56.
- [33] Hansen JC, Tse C, Wolffe AP. Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* 1998 Dec 22;37(51):17637-41.
- [34] Song JS, Kim YS, Kim DK, Park SI, Jang SJ. Global histone modification pattern associated with recurrence and disease-free survival in non-small cell lung cancer patients. *Pathology international* 2012 Mar;62(3):182-90.
- [35] Barlesi F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, et al. Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007 Oct 1;25(28):4358-64.
- [36] Chen C, Zhao M, Yin N, He B, Wang B, Yuan Y, et al. Abnormal histone acetylation and methylation levels in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer investigation* 2011 Oct;29(8):548-56.
- [37] Pogribny IP, Rusyn I. Role of epigenetic aberrations in the development and progression of human hepatocellular carcinoma. *Cancer letters* 2014 Jan 28;342(2):223-30.
- [38] Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004 Nov 18;432(7015):396-401.
- [39] Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell* 2007 Sep 13;1(3):313-23.
- [40] Chen X, Song N, Matsumoto K, Nanashima A, Nagayasu T, Hayashi T, et al. High expression of trimethylated histone H3 at lysine 27 predicts better prognosis in non-small cell lung cancer. *International journal of oncology* 2013 Nov;43(5):1467-80.
- [41] Chen H, Yan Y, Davidson TL, Shinkai Y, Costa M. Hypoxic stress induces dimethylated histone H3 lysine 9 through histone methyltransferase G9a in mammalian cells. *Cancer research* 2006 Sep 15;66(18):9009-16.
- [42] 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. *International journal of oncology* 2006 Jul;29(1):117-24.
- [43] Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell death and differentiation* 2005 Apr;12(4):395-404.
- [44] Glazak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 2007 Aug 13;26(37):5420-32.
- [45] Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010 Jan;31(1):27-36.

- [46] Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* 2004 May 1;59(2):177-89.
- [47] Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2005 Apr;113(4):264-8.
- [48] Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochemical pharmacology* 2003 Oct 15;66(8):1547-54.
- [49] 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 surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2013 Mar;115(3):385-92.
- [50] Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Acebal F, Gil-Montoya JA, Brener S, et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. *Oral diseases* 2010 Jan;16(1):68-75.
- [51] 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. *British journal of cancer* 2009 Apr 7;100(7):1128-34.
- [52] Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemporary clinical dentistry* 2013 Jan;4(1):7-12.
- [53] Perisanidis C, Perisanidis B, Wrba F, Brandstetter A, El Gazzar S, Papadogeorgakis N, et al. Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2012 Jan;41(1):40-6.
- [54] Raju B, Mehrotra R, Oijordsbakken G, Al-Sharabi AK, Vasstrand EN, Ibrahim SO. Expression of p53, cyclin D1 and Ki-67 in pre-malignant and malignant oral lesions: association with clinicopathological parameters. *Anticancer research* 2005 Nov-Dec;25(6C):4699-706.
- [55] Hwang YS, Park KK, Chung WY. Stromal transforming growth factor-beta 1 is crucial for reinforcing the invasive potential of low invasive cancer. *Archives of oral biology* 2014 Jul;59(7):687-94.
- [56] Andreolas C, Kalogeropoulou M, Voulgari A, Pintzas A. Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2008 Apr 15;122(8):1745-56.
- [57] Armstrong AJ, Marengo MS, Oltean S, Kemeny G, Bitting RL, Turnbull JD, et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. *Molecular cancer research : MCR* 2011 Aug;9(8):997-1007.
- [58] Katz E, Dubois-Marshall S, Sims AH, Gautier P, Caldwell H, Meehan RR, et al. An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. *PloS one* 2011;6(2):e17083.
- [59] de Araujo VC, Pinto Junior DS, de Sousa SO, Nunes FD, de Araujo NS. Vimentin in oral squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies* 1993;250(2):105-9.
- [60] Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nature medicine* 2013 Nov;19(11):1438-49.
- [61] 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. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2007 Jan;18(1):58-65.
- [62] 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. *British journal of cancer* 2006 Mar 13;94(5):661-71.
- [63] Pena C, Garcia JM, Garcia V, Silva J, Dominguez G, Rodriguez 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. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006 Nov 1;119(9):2098-104.
- [64] Bedi U, Mishra VK, Wasilewski D, Scheel C, Johnsen SA. Epigenetic plasticity: a central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *Oncotarget* 2014 Apr 30;5(8):2016-29.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular (CEC) de boca está entre as seis neoplasias malignas mais frequentes no mundo (FERLAY et al., 2010) e pode ser precedido por distúrbios potencialmente malignos, dentre os quais, o mais comum é a leucoplasia bucal (LB) (WARNAKULASURIYA, JOHNSON e VAN DER WAAL, 2007). O processo de formação e progressão do câncer de boca é denominado de carcinogênese bucal e está relacionado com aquisição de alterações gênicas que levam uma célula epitelial normal a se tornar uma célula neoplásica e invadir os tecidos adjacentes. (CALIFANO *et al.*, 1996). Existe na literatura muitos trabalhos publicados a respeito desse processo, contudo, são poucos os estudos que relacionam o processo de carcinogênese bucal a alterações epigenéticas.

Epigenética é o termo usado para descrever mecanismos que provocam alterações na expressão gênica sem que ocorram modificações na sequência do DNA (MARTINS e CASTILHO, 2013). As diversas modificações podem ocorrer na cauda das histonas como metilação, fosforilação, ribosilação e principalmente a acetilação. (GASCHE e GOEL, 2012)

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 cromatina (ZUPKOVITZ et al., 2006). Nesse trabalho estudamos a acetilação da histona 3 durante o processo de carcinogênese bucal e sua relação com a proliferação e a transição epitélio-mesênquima processos importantes na formação e desenvolvimento tumoral.

Os nossos resultados demonstram uma diminuição na acetilação da histona 3 nos CEC de boca quando comparamos aos estágios iniciais da carcinogênese. Desta forma, no CEC há uma condensação da cromatina fenômeno este que está relacionado ao silenciamento de alguns genes importantes envolvidos na inibição do ciclo celular e progressão tumoral (CHANG *et al.*, 2009; GIUDICE *et al.*, 2013). Outro achado interessante deste estudo foi a identificação da histona 3 acetilada como

marcador prognóstico nos CEC de boca. Os CECs hipoacetilados exibiram pior prognóstico.

Paralelamente a hipoacetilação de histona 3 nos CEC observamos um aumento progressivo da marcação do KI67 durante a carcinogênese bucal. Com esse achado podemos inferir que há um distúrbio no controle do ciclo celular, induzindo aumento da proliferação celular etapa importante no processo de carcinogênese (GONZALEZ-MOLES *et al.*, 2010). Resultado esse que corrobora com o fato da cromatina estar mais condensada, podendo haver silenciamento de genes importantes para o controle do ciclo celular.

Considerando os resultados relacionados a EMT, houve um aumento tanto da marcação da vimentina quanto do TGF- β 1 nos CECs de boca quando comparados a MBN e LB. Esse aumento pode ser relacionado a uma modificação no fenótipo e comportamento dos CECs, conferindo as células características mesenquimais, relacionado a agressividade (LIU *et al.*, 2010).

Embora haja muitos avanços científicos no últimos anos, a carcinogênese bucal ainda não é um processo totalmente compreendido. Alterações epigenéticas, e em especial, a acetilação de histonas, carecem de mais estudos. Além do mais, o uso de inibidores da enzima HDAC (que promove a compactação da cromatina e por consequência a diminuição da transcrição gênica) pode ser uma nova alternativa terapêutica. Esse tipo de terapia já vem sendo utilizado, como bons resultados, em neoplasias linfoproliferativas e alguns estudos estão sendo realizados em CEC de boca, podendo ser um novo alvo terapêutico para essa neoplasia (CHIKAMATSU *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2015)

REFERENCIAS

ACKLAND, M. L. et al. Epidermal growth factor-induced epithelio-mesenchymal transition in human breast carcinoma cells. **Lab Invest**, v. 83, n. 3, p. 435-48, Mar 2003

ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1438-49, Jun 2009.

AKHURST, R. J.; DERYNCK, R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. **Trends Cell Biol**, v. 11, n. 11, p. S44-51, Nov 2001.

ALBERTS B., B. D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J. Biologia molecular da célula. **Artes Médicas**, v. 3ed., p. p.956-967, 1997.

ANDISHEH-TADBIR, A.; MEHRABANI, D.; HEYDARI, S. T. Sociodemographic and etiological differences of head and neck squamous cell carcinoma in young and old patients in southern Iran. **J Craniofac Surg**, v. 21, n. 1, p. 126-8, Jan 2010. ISSN 1536-3732

ANDREOLAS, C. et al. Fra-1 regulates vimentin during Ha-RAS-induced epithelial mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. **Int J Cancer**, v. 122, n. 8, p. 1745-56, Apr 15 2008.

ARMSTRONG, A. J. et al. Circulating tumor cells from patients with advanced prostate and breast cancer display both epithelial and mesenchymal markers. **Mol Cancer Res**, v. 9, n. 8, p. 997-1007, Aug 2011.

ATTISANO, L.; WRANA, J. L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1646-7, May 31 2002.

BANOCZY, J.; RIGO, O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 19, n. 5, p. 265-7, Oct 1991

BARNES L, E. J., REICHART PA, SIDRANSKY D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. **WHO Classification of Tumours**, 2005.

BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. e74-9, Mar 2010

BATSAKIS, J. G.; SUAREZ, P.; EL-NAGGAR, A. K. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. **Oral Oncol**, v. 35, n. 4, p. 354-9, Jul 1999.

BECK, C.; SCHREIBER, H.; ROWLEY, D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. **Microsc Res Tech**, v. 52, n. 4, p. 387-95, Feb 15 2001.

BEDI, U. et al. Epigenetic plasticity: a central regulator of epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 8, p. 2016-29, Apr 30 2014.

BERTOLINO, P. et al. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. **Chest**, v. 128, n. 6 Suppl, p. 585S-590S, Dec 2005.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. TGF-beta and cancer. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 17, n. 1-2, p. 29-40, Feb-Apr 2006.

BLANCAFORT, P.; JIN, J.; FRYE, S. Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules. **Mol Pharmacol**, v. 83, n. 3, p. 563-76, Mar 2013.

BLICK, T. et al. Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines parallel the CD44(hi)/CD24 (lo/-) stem cell phenotype in human breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 235-52, Jun 2010.

BLUMENSCHNEIN, G. R., JR. et al. Phase III trial comparing carboplatin, paclitaxel, and bexarotene with carboplatin and paclitaxel in chemotherapy-naive patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: SPIRIT II. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 11, p. 1879-85, Apr 10 2008

BRANDIZZI, D. et al. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 13, n. 9, p. E544-8, Sep 2008

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, v. 166, n. 4, p. 375-81, Apr 1992.

BURDELSKI, C. et al. HDAC1 overexpression independently predicts biochemical recurrence and is associated with rapid tumor cell proliferation and genomic instability in prostate cancer. **Exp Mol Pathol**, v. 98, n. 3, p. 419-26, Jun 2015.

CALIFANO, J. et al. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous cell carcinoma patients. **Cancer Res**, v. 56, n. 24, p. 5720-2, Dec 15 1996.

CAMPISI, J. Cancer, aging and cellular senescence. **In Vivo**, v. 14, n. 1, p. 183-8, Jan-Feb 2000.

CARNEIRO, N. K. et al. Possible association between TGF-beta1 polymorphism and oral cancer. **Int J Immunogenet**, v. 40, n. 4, p. 292-8, Aug 2013.

CARRARD, V. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Dis**, v. 17, n. 2, p. 171-9, Mar 2011.

CARRARD, V. C.; BROUNS, E. R.; VAN DER WAAL, I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 3, p. e411-3, May 2013.

CASTILHO, R. M. Transição epitélio-mesênquimal em carcinoma epidermóides bucais. Análise através da expressão das proteínas CTBP, vimentina e b-catenina e da identificação gênica de larga escala [Dissertação de Mestrado]. , v. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 2003.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-64, Mar 25 2011.

CHANG, H. H. et al. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. **Oral Oncol**, v. 45, n. 7, p. 610-4, Jul 2009.

CHAW, S. Y. et al. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. **Oral Oncol**, v. 48, n. 10, p. 997-1006, Oct 2012.

CHEN, J. H. et al. High expressions of histone methylation- and phosphorylation-related proteins are associated with prognosis of oral squamous cell carcinoma in male population of Taiwan. **Med Oncol**, v. 30, n. 2, p. 513, Jun 2013.

CHEN, Y. K. et al. Aberrant expression in multiple components of the transforming growth factor-beta1-induced Smad signaling pathway during 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 47, n. 4, p. 262-7, Apr 2011

CHIKAMATSU, K. et al. Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Sci**, Aug 30 2013.

CHOI, Y. H.; CHOI, K. C.; PARK, Y. E. Relationship of transforming growth factor beta 1 to angiogenesis in gastric carcinoma. **J Korean Med Sci**, v. 12, n. 5, p. 427-32, Oct 1997.

COOPER, C. E.; SPRINGETT, R. Measurement of cytochrome oxidase and mitochondrial energetics by near-infrared spectroscopy. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 352, n. 1354, p. 669-76, Jun 29 1997.

DA SILVA, S. D. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma. **Clin Exp Metastasis**, v. 32, n. 1, p. 55-63, Jan 2015.

DE ARAUJO, V. C. et al. Vimentin in oral squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v. 250, n. 2, p. 105-9, 1993.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, v. 29, n. 2, p. 117-29, Oct 2001.

DUMONT, N.; ARTEAGA, C. L. Targeting the TGF beta signaling network in human neoplasia. **Cancer Cell**, v. 3, n. 6, p. 531-6, Jun 2003.

EPSTEIN, J. B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J Can Dent Assoc**, v. 68, n. 10, p. 617-21, Nov 2002.

ERLICH, R. B. et al. Preclinical evaluation of dual PI3K-mTOR inhibitors and histone deacetylase inhibitors in head and neck squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**, v. 106, n. 1, p. 107-15, Jan 3 2012.

ERLICH, R. B. et al. Valproic acid as a therapeutic agent for head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, n. 3, p. 381-9, Feb 2009.

ESTELLER, M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. **Br J Cancer**, v. 94, n. 2, p. 179-83, Jan 30 2006.

EVANS, R. M. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. **Bioessays**, v. 20, n. 1, p. 79-86, Jan 1998.

FEINBERG, A. P.; TYCKO, B. The history of cancer epigenetics. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 2, p. 143-53, Feb 2004.

FERLAY, J.; PARKIN, D. M.; STELIAROVA-FOUCHER, E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. **Eur J Cancer**, v. 46, n. 4, p. 765-81, Mar 2010

FRIESS, H. et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. **Gastroenterology**, v. 105, n. 6, p. 1846-56, Dec 1993

GAITAN-CEPEDA, L. A.; PENICHE-BECERRA, A. G.; QUEZADA-RIVERA, D. Trends in frequency and prevalence of oral cancer and oral squamous cell carcinoma in Mexicans. A 20 years retrospective study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 1, p. e1-5, Jan 2011.

GALBIATTI, A. L. et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 79, n. 2, p. 239-47, Mar-Apr 2013.

GALLINARI, P. et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. **Cell Res**, v. 17, n. 3, p. 195-211, Mar 2007

GAN, C. P. et al. Valproic acid: growth inhibition of head and neck cancer by induction of terminal differentiation and senescence. **Head Neck**, v. 34, n. 3, p. 344-53, Mar 2012.

GASCHE, J. A.; GOEL, A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncol**, v. 8, n. 11, p. 1407-25, Nov 2012.

GIEHL, K.; IMAMICHI, Y.; MENKE, A. Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. **Cells Tissues Organs**, v. 185, n. 1-3, p. 123-30, 2007.

GILLENWATER, A. M.; 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**, v. 6, n. 11, p. 2967-75, Nov 2007.

GIUDICE, F. S. et al. Inhibition of histone deacetylase impacts cancer stem cells and induces epithelial-mesenchyme transition of head and neck cancer. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58672, 2013.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. **Oral Dis**, v. 16, n. 1, p. 68-75, Jan 2010.

GORSCHE, S. M. et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. **Cancer Res**, v. 52, n. 24, p. 6949-52, Dec 15 1992.

GRASSADONIA, A. et al. Role of Hydroxamate-Based Histone Deacetylase Inhibitors (Hb-HDACIs) in the Treatment of Solid Malignancies. **Cancers (Basel)**, v. 5, n. 3, p. 919-42, 2013

GUPTA, P. C.; WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of areca nut usage. **Addict Biol**, v. 7, n. 1, p. 77-83, Jan 2002.

HADDAD, R. I.; SHIN, D. M. Recent advances in head and neck cancer. **N Engl J Med**, v. 359, n. 11, p. 1143-54, Sep 11 2008.

HAIGENTZ, M., JR. et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor romidepsin in patients with recurrent/metastatic head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 48, n. 12, p. 1281-8, Dec 2012.

HALKIDOU, K. et al. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. **Prostate**, v. 59, n. 2, p. 177-89, May 1 2004.

HAWINKELS, L. J. et al. Active TGF-beta1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Cancer Sci**, v. 100, n. 4, p. 663-70, Apr 2009.

HERRMANN, H. et al. Functional complexity of intermediate filament cytoskeletons: from structure to assembly to gene ablation. **Int Rev Cytol**, v. 223, p. 83-175, 2003.

HILDEBRAND, L. D. et al. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 2, p. e328-34, Mar 2010

HO, P. S. et al. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. **BMC Cancer**, v. 9, p. 260, 2009.

HOLMSTRUP, P. et al. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol**, v. 42, n. 5, p. 461-74, May 2006.

HRZENJAK, A. et al. Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 9, p. 2203-10, Sep 2006.

HUANG, B. H. et al. Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. **Cell Death Differ**, v. 12, n. 4, p. 395-404, Apr 2005.

HUANG, E. H. et al. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. **Surgery**, v. 141, n. 4, p. 415-9, Apr 2007

HWANG, Y. S.; PARK, K. K.; CHUNG, W. Y. Stromal transforming growth factor-beta 1 is crucial for reinforcing the invasive potential of low invasive cancer. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 7, p. 687-94, Jul 2014.

ITO, K. et al. Neuroendocrine differentiation in a case of acinic cell carcinoma of the parotid gland. **Acta Pathol Jpn**, v. 40, n. 4, p. 279-87, Apr 1990.

IVASKA, J. et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Exp Cell Res**, v. 313, n. 10, p. 2050-62, Jun 10 2007

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontol 2000**, v. 57, n. 1, p. 19-37, Oct 2011.

JUNG, A.; BRABLETZ, T.; KIRCHNER, T. The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression. **Ernst Schering Found Symp Proc**, n. 5, p. 109-24, 2006.

KADEMANI, D.; DIERKS, E. Surgical management of oral and mucosal dysplasias: The case for surgical excision. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 2, p. 287-92, Feb 2007.

KAMINAGAKURA, E. et al. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. **Head Neck**, v. 32, n. 11, p. 1460-6, Nov 2010.

KARAGIANNIS, T. C.; EL-OSTA, A. Clinical potential of histone deacetylase inhibitors as stand alone therapeutics and in combination with other chemotherapeutics or radiotherapy for cancer. **Epigenetics**, v. 1, n. 3, p. 121-6, Jul-Sep 2006.

KATZ, E. et al. An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. e17083, 2011.

KIM, H. S. et al. TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. **Exp Eye Res**, v. 79, n. 2, p. 263-74, Aug 2004.

KIM, J. et al. PS-341 and histone deacetylase inhibitor synergistically induce apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol Cancer Ther**, v. 9, n. 7, p. 1977-84, Jul 2010

KOMINSKY, S. L. et al. TGF-beta promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 1, p. 37-44, Jan 2007.

KOWALSKI, L. P. et al. Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 30B, n. 3, p. 167-73, May 1994.

KUMAR, B. et al. Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) reverses chemoresistance in head and neck cancer cells by targeting cancer stem cells via the downregulation of nanog. **Genes Cancer**, v. 6, n. 3-4, p. 169-81, Mar 2015

KURDISTANI, S. K. Histone modifications in cancer biology and prognosis. **Prog Drug Res**, v. 67, p. 91-106, 2011.

KUROKAWA, H. et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 9, p. 513-21, Oct 2003.

LAMBERT, R. et al. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 8, p. 633-41, Aug 2011

LAWLOR, E. R.; THIELE, C. J. Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets. **Clin Cancer Res**, v. 18, n. 10, p. 2768-79, May 15 2012.

LEE, S. H. et al. Valproic acid suppresses the self-renewal and proliferation of head and neck cancer stem cells. **Oncol Rep**, Jul 23 2015.

LEHRMANN, H.; PRITCHARD, L. L.; HAREL-BELLAN, A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. **Adv Cancer Res**, v. 86, p. 41-65, 2002.

LIANG, X. et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 47, n. 2, p. 92-7, Feb 2011.

LING, W.; MIJITI, A.; MOMING, A. Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 4, p. 775-85, Apr 2013

LIU, L. K. et al. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. **Mod Pathol**, v. 23, n. 2, p. 213-24, Feb 2010.

LIU, Q. et al. Correlation analysis of hormone receptors and the expressions of HER-2 and Ki-67 in breast cancer. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 36, n. 1, p. 78-83, 2015

LODI, G. et al. Systematic review of randomized trials for the treatment of oral leukoplakia. **J Dent Educ**, v. 66, n. 8, p. 896-902, Aug 2002.

LOGULLO, A. F. et al. Transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 3, p. 139-45, Mar 2003.

LOMBAERTS, M. 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**, v. 94, n. 5, p. 661-71, Mar 13 2006.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, n. 3, p. 321-9, Mar 1995.

LUND, A. H.; VAN LOHUIZEN, M. Epigenetics and cancer. **Genes Dev**, v. 18, n. 19, p. 2315-35, Oct 1 2004.

LUPORSI, E. et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. **Breast Cancer Res Treat**, v. 132, n. 3, p. 895-915, Apr 2012.

MANCUSO, M. et al. H3K4 histone methylation in oral squamous cell carcinoma. **Acta Biochim Pol**, v. 56, n. 3, p. 405-10, 2009.

MANDAL, M. et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. **Cancer**, v. 112, n. 9, p. 2088-100, May 1 2008

MARTINS, M. D.; CASTILHO, R. M. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. **J Carcinog Mutagen**, v. 1, n. Suppl 5, p. 1-12, Jul 29 2013.

MASCOLO, M. et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 2, p. 2331-53, 2012.

MEHTA, F. S. et al. An epidemiologic study of oral cancer and precancerous conditions among 101,761 villagers in Maharashtra, India. **Int J Cancer**, v. 10, n. 1, p. 134-41, Jul 15 1972

MIN, S. K. et al. Expression of HAT1 and HDAC1, 2, 3 in Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Peripheral T-Cell Lymphomas, and NK/T-Cell Lymphomas. **Korean J Pathol**, v. 46, n. 2, p. 142-50, Apr 2012.

MINCIONE, G. et al. Loss of expression of TGF-beta1, TbetaRI, and TbetaRII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. **Int J Oncol**, v. 32, n. 2, p. 323-31, Feb 2008.

MUTOH, H. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is generated via TGF-beta by myofibroblasts in gastric intestinal metaplasia and carcinoma without H. pylori infection. **Cancer Sci**, v. 101, n. 8, p. 1783-9, Aug 2010.

NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 1, p. 1-10, Jan 2008.

NIJKAMP, M. M. et al. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Radiother Oncol**, v. 99, n. 3, p. 344-8, Jun 2011.

NOGUCHI, A. 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**, v. 115, n. 3, p. 385-92, Mar 2013.

O'SULLIVAN, B.; SHAH, J. New TNM staging criteria for head and neck tumors. **Semin Surg Oncol**, v. 21, n. 1, p. 30-42, 2003.

OLIVEIRA, M. L. et al. A 10-year analysis of the oral squamous cell carcinoma profile in patients from public health centers in Uruguay. **Braz Oral Res**, v. 29, n. 1, p. 1-8, 16/06 2015

PANDEY, M. et al. Evaluation of surgical excision of non-homogeneous oral leukoplakia in a screening intervention trial, Kerala, India. **Oral Oncol**, v. 37, n. 1, p. 103-9, Jan 2001.

PATEL, S. G.; LYDIATT, W. M. Staging of head and neck cancers: is it time to change the balance between the ideal and the practical? **J Surg Oncol**, v. 97, n. 8, p. 653-7, Jun 15 2008.

PENA, C. 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**, v. 119, n. 9, p. 2098-104, Nov 1 2006.

PINDBORG, J. J.; REIBEL, J.; HOLMSTRUP, P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. **J Oral Pathol**, v. 14, n. 9, p. 698-708, Oct 1985.

PINDBORG JJ, R. P., SMITH CJ, VAN DER WAAL I. . World Health Organization: histological typing of cancer and pre-cancer of the oral mucosa. **Berlin: Springer-Verlag**, 1997.

PISCOPO, M. et al. H3 and H3.3 histone mRNA amounts and ratio in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. **Oral Dis**, v. 12, n. 2, p. 130-6, Mar 2006.

PRAHLAD, V. et al. Rapid movements of vimentin on microtubule tracks: kinesin-dependent assembly of intermediate filament networks. **J Cell Biol**, v. 143, n. 1, p. 159-70, Oct 5 1998.

QIU, H. et al. Cancer stem cells: a potential target for cancer therapy. **Cell Mol Life Sci**, May 13 2015.

QIU, T. et al. Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials. **Future Oncol**, v. 9, n. 2, p. 255-69, Feb 2013.

REDDI, S. P.; SHAFER, A. T. Oral premalignant lesions: management considerations. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 18, n. 4, p. 425-33, Nov 2006.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

REN, A. et al. Inhibition of H3K9 methyltransferase G9a induces autophagy and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 459, n. 1, p. 10-7, Mar 27 2015.

ROBSON, H. et al. Transforming growth factor beta 1 expression in human colorectal tumours: an independent prognostic marker in a subgroup of poor prognosis patients. **Br J Cancer**, v. 74, n. 5, p. 753-8, Sep 1996

ROPERO, S.; ESTELLER, M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. **Mol Oncol**, v. 1, n. 1, p. 19-25, Jun 2007

SAITO, K. et al. Expression of p53 protein and Ki-67 antigen in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. **J Periodontol**, v. 70, n. 6, p. 581-6, Jun 1999

SAKAI, H. et al. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. **J Comp Pathol**, v. 127, n. 4, p. 233-8, Nov 2002.

SAKAMOTO, K. et al. Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. **Ann Surg Oncol**, v. 19, n. 2, p. 612-9, Feb 2012

- SAKUMA, T. et al. Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol**, v. 29, n. 1, p. 117-24, Jul 2006.
- SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF-beta1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 8, p. 7635-44, Aug 2014.
- SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol**, v. 39, n. 6, p. 619-25, Sep 2003.
- SCHEPMAN, K. P. et al. Prevalence study of oral white lesions with special reference to a new definition of oral leucoplakia. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 32B, n. 6, p. 416-9, Nov 1996.
- SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 32, n. 3, p. 233-45, Jun 2003.
- SCHLUTER, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol**, v. 123, n. 3, p. 513-22, Nov 1993.
- SEDDA, S. et al. The TGF-beta/Smad System in IBD Pathogenesis. **Inflamm Bowel Dis**, Jul 30 2015.
- SELIGSON, D. B. et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. **Nature**, v. 435, n. 7046, p. 1262-6, Jun 30 2005
- SEOANE-ROMERO, J. M. et al. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 1, p. e35-40, Jan 2012.
- SEOMUN, Y. et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells. **Biochem J**, v. 358, n. Pt 1, p. 41-8, Aug 15 2001
- SIMPLE, M. et al. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 51, n. 7, p. 643-51, Jul 2015.
- SLOOTWEG, P. J.; KOOLE, R.; HORDIJK, G. J. The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 30B, n. 2, p. 138-41, 1994
- SONG, J. et al. Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. **APMIS**, v. 113, n. 4, p. 264-8, Apr 2005.
- STARBORG, M. et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **J Cell Sci**, v. 109 (Pt 1), p. 143-53, Jan 1996. I
- STRANSKY, N. et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science**, v. 333, n. 6046, p. 1157-60, Aug 26 2011.

SULLIVAN, N. J. et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. **Oncogene**, v. 28, n. 33, p. 2940-7, Aug 20 2009

TABOR, M. P. et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. **J Pathol**, v. 199, n. 3, p. 354-60, Mar 2003

TAN, M. et al. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 1016-28, Sep 16 2011.

Thiagalingam S et al. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.983, p.84-100, Mar 2003.

THIERY, J. P. et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871-90, Nov 25 2009

THOMASOVA, D.; ANDERS, H. J. Cell cycle control in the kidney. **Nephrol Dial Transplant**, Dec 23 2014.

THOMPSON, T. C. et al. Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. **J Cell Biochem Suppl**, v. 16H, p. 54-61, 1992.

THURN, K. T. et al. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. **Future Oncol**, v. 7, n. 2, p. 263-83, Feb 2011.

TOH, Y. 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**, v. 110, n. 3, p. 362-7, Jun 20 2004.

TOMATIS, L. Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. International Agency for Research on Cancer. **Environ Health Perspect**, v. 101 Suppl 5, p. 149-51, Dec 1993

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 317-23, Apr-May 2009.

VAN DER WAAL, I.; SCHEPMAN, K. P.; VAN DER MEIJ, E. H. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. **Oral Oncol**, v. 36, n. 3, p. 264-6, May 2000.

VERDONE, L.; CASERTA, M.; DI MAURO, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. **Biochem Cell Biol**, v. 83, n. 3, p. 344-53, Jun 2005.

VERHEIJEN, R. et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. **J Cell Sci**, v. 92 (Pt 4), p. 531-40, Apr 1989.

VILLAR-GAREA, A.; ESTELLER, M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. **Int J Cancer**, v. 112, n. 2, p. 171-8, Nov 1 2004.

WADE, P. A.; KIKYO, N. Chromatin remodeling in nuclear cloning. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 9, p. 2284-7, May 2002.

WAKEFIELD, L. M.; ROBERTS, A. B. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. **Curr Opin Genet Dev**, v. 12, n. 1, p. 22-9, Feb 2002.

WALKER, R. A.; DEARING, S. J. Transforming growth factor beta 1 in ductal carcinoma in situ and invasive carcinomas of the breast. **Eur J Cancer**, v. 28, n. 2-3, p. 641-4, 1992.

WARNAKULASURIYA, S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. **Oral Oncol**, v. 46, n. 6, p. 407-10, Jun 2010

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 10, p. 575-80, Nov 2007.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 3, p. 127-33, Mar 2008.

WEI, W.; LEWIS, M. T. Identifying and targeting tumor-initiating cells in the treatment of breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 22, n. 3, p. R135-55, Jun 2015.

WINN, D. M. et al. The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. **Oral Dis**, Mar 24 2015.

XU, J.; LAMOUILLE, S.; DERYNCK, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. **Cell Res**, v. 19, n. 2, p. 156-72, Feb 2009.

YOSHIKAWA, M. et al. Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in human renal epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 1, p. 58-65, Jan 2007.

YUAN, C. et al. High expression of the histone demethylase LSD1 associates with cancer cell proliferation and unfavorable prognosis in tongue cancer. **J Oral Pathol Med**, v. 44, n. 2, p. 159-65, Feb 2015.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E. G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. **J Clin Invest**, v. 119, n. 6, p. 1429-37, Jun 2009.

ZHANG, F. et al. Sensitization to gamma-irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in non-small cell lung cancer (NSCLC) cells. **Cancer Biol Ther**, v. 8, n. 9, p. 823-31, May 2009.

ZHANG, Z.; FILHO, M. S.; NOR, J. E. The biology of head and neck cancer stem cells. **Oral Oncol**, v. 48, n. 1, p. 1-9, Jan 2012.

ZUPKOVITZ, G. et al. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 21, p. 7913-28, Nov 2006.