



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**AMANDA PINHEIRO LEITÃO MATOS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DA IMUNOEXPRESSIONO DE 5-METILCITOSINA E  
5-HIDROXIMETILCITOSINA EM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS  
DA QUEILITE ACTÍNICA E DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE  
LÁBIO.**

**FORTALEZA**

**2023**

AMANDA PINHEIRO LEITÃO MATOS

AVALIAÇÃO DO PERFIL DA IMUNOEXPRESSÃO DE 5-METILCITOSINA E 5-HIDROXIMETILCITOSINA EM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DA QUEILITE ACTÍNICA E DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÁBIO.

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica; Área temática: Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M381a Matos, Amanda Pinheiro Leitão.  
Avaliação do perfil da imunexpressão de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina em parâmetro clínico-patológicos da queilite actínica e do carcinoma espinocelular de lábio. / Amanda Pinheiro Leitão Matos. – 2023.  
53 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.

Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva .

1. Epigenética. 2. Neoplasias Labiais . 3. Queilite. 4. Metilação. I. Título.

CDD 617.6

---

**AMANDA PINHEIRO LEITÃO MATOS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DA IMUNOEXPRESSÃO DE 5-METILCITOSINA E  
5-HIDROXIMETILCITOSINA EM PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS  
DA QUEILITE ACTÍNICA E DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE  
LÁBIO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado em : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)/ Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará(UFC) / Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Profa. Dra. Clarissa Pessoa Fernandes Forte  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

---

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dedico este trabalho a **Deus**, por toda força e sustento durante todos os momentos de minha vida.

A minha mãe **Mara Pinheiro Leitão Gomes** por ser exemplo de coragem e determinação, por me educar e ensinar sobre amor e perseverança, sendo meu maior exemplo de força na vida e meu maior porto seguro.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** por sempre me dar forças, poder de resiliência e capacidade de passar por todas as adversidades enxergando os pontos de luz, de esperança e positividade.

A minha mãe **Mara Pinheiro**, por ser meu porto mais seguro, por sempre acreditar em mim, investir seu amor, dedicação e paciência em todos os processos e etapas de minha vida. Nada de mim seria sem seu cuidado e apoio. Ao meu padrasto, **Gedeão Gomes**, por sempre buscar o melhor para mim e por todo carinho e amor durante todos esses anos de convivência.

Aos meus avós **Matilde Pinheiro** e **Mauro Leitão**, por todos os ensinamentos, dedicação à família e inspiração de vida.

Ao meu namorado, **Luid Oliveira**, por todo apoio, incentivo e por ser um ponto de segurança durante esta jornada, por lidar com os momentos de abdicação e instabilidade com muito carinho e amor, sempre arrancando um sorriso meu.

Durante o mestrado, pude entender a importância da presença de quem amamos e a demonstração de entusiasmo sobre aquilo que foge da sua vivência, estar presente durante um processo vai muito além da presença física. Para essas amigas, vai minha gratidão, por toda empolgação, preocupação e interesse neste processo, não por ser interessante a elas, mas por ser importante para mim. Meu muito obrigada, **Iana Cavalcante, Renata Prado, Isabel Leite e Marjorie Melo**.

Aos amigos que fiz durante esses 2 anos de mestrado, **Pedro Henrique, Imaculada Queiroz, Dayrine de Paula, Farah Orellana, Livia Caetano, Juliana Mara, Cassia Nobrega, Marcela Borges e Joyce Ohana**. O cotidiano do laboratório e das clínicas, se mostrou cada vez mais um lugar acolhedor, obrigada por toda ajuda, dicas, companhia e tempo de qualidade. Os dias na UFC não seriam os mesmos sem vocês. A todos os demais membros do laboratório de patologia da UFC, mestrandos, doutorandos e alunos de iniciação científica, entre eles: **Alceu, Karina Lieuthier, Amanda Menezes e José Vitor**.

Aos meus amigos e companheiro de pós-graduação, **Iury Ximenes, Everton Cavalcante e Lavina Araújo**, que sempre foram suporte dentro e fora da UFC. Obrigada por toda a força, coragem e palavras de incentivo a mim dadas. Eu amo vocês.

A todos os professores que tive o privilégio de conviver durante o mestrado, em especial, aos professores **Ana Paula Negreiros, Mario Rogério e Karuza Alves**, sou

eternamente grata por toda dedicação e ensinamentos durante essa jornada.

As egressas do PPGO e professoras, **Karine Mesquita** e **Thinali Dantas**, por todo o acolhimento e direcionamento no início desta jornada.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Paulo Goberlânio**, por contribuir com meu aprendizado e formação profissional desde o primeiro semestre de faculdade, são mais de 8 anos sendo um grande exemplo para mim. Além do quesito acadêmico e teórico, aprendi com ele sobre o verdadeiro amor e dedicação à docência. Obrigada por toda paciência, compreensão, conselho dado e principalmente por acreditar em mim!

À **Universidade de Fortaleza** (UNIFOR), por possibilitar a realização do escaneamento das lâminas desta pesquisa, em especial, à **Vladia Dias**, que sempre se mostrou disponível e muito solícita durante o processo.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação, pré-defesa e defesa deste trabalho, **Dr. Paulo Goberlânio**, **Dra. Ana Paula Negreiros**, **Dr. Roberto César** e **Dra. Thinali Dantas**. Obrigada por todas as considerações, que tornaram possível a defesa desta dissertação. Em especial, à professora **Dra. Clarissa Fernandes**, por ter me inspirado no caminho da docência e ser um grande exemplo de profissional. Desde a graduação, sou eternamente grata, por ter me orientado por anos e com muita paciência e dedicação, ter me ensinado muito do que sei hoje.

À **Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, ao meu orientador **Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa**, por toda a orientação, oportunidade dada e dedicação durante esses anos de mestrado. Obrigada por toda confiança a mim depositada.

## RESUMO

**Introdução:** A Queilite Actínica (QA) consiste em uma desordem potencialmente maligna, localizada no lábio, causada pela intensa exposição à radiação ultravioleta (UV). Ela gera alterações, como a metilação do DNA, associadas ao processo de carcinogênese de neoplasias, como o carcinoma espinocelular do lábio (CECL). A 5-metilcitosina (5mC) e a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) são alterações epigenéticas do DNA que afetam a expressão gênica, favorecendo a progressão do CECLs. O 5mC e 5hmC são considerados potenciais biomarcadores no desenvolvimento de alguns cânceres, mas não se sabe sobre a relação no CECL e da QA. Logo é necessária a realização de estudos para avaliar a utilização do 5mC e 5hmC como possíveis biomarcadores para desordens potencialmente malignas como as QAs. **Objetivos:** Esta pesquisa objetiva avaliar o impacto do 5mC e 5hmC na carcinogênese labial, correlacionando parâmetros clínicos, histológicos e imunohistoquímicos em QAs e CECLs. **Materiais e Métodos:** Para isso, serão selecionadas 15 amostras de tecido labial sadio (TLS), 30 de QA e 45 do *front tumoral* de CECLs, que foram preparados por Tissue Micro Array (TMA), em bloco único para as reações imunohistoquímicas (5hmC, 5mC). Foi realizada a coleta de dados clínicos, gradação histopatológica das displasias epiteliais nas QAs estabelecidas através do sistema binário e o grau de malignidade dos CECLs foi feito pelo sistema estabelecido por Bryne. Os dados foram expressos em forma de média e desvio-padrão e comparados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis/Dunn, Wilcoxon e correlação de Spearman (SPSS,  $p < 0,05$ ). **Resultados:** Na avaliação das amostras de CECLs ( $n=45$ ) houve diferença estatística ( $p < 0,001$ ) significativa quanto à marcação de 5mC, que foi maior que a de 5hmC. Nas lesões tumorais com estadiamento T1/2 e T3/4 também se notou uma maior marcação de 5mC em relação ao 5hmC. Ambos os pacientes do sexo masculino ( $p < 0,001$ ) e feminino ( $p = 0,003$ ) obtiveram maior positividade para 5mC quando comparados ao 5hmC. **Conclusões:** Há expressão de 5mC e 5hmC na QA e em CECL. O 5mC parece estar relacionado ao CECL, ainda sendo necessário a realização de mais estudos para avaliar a viabilidade da sua utilização como biomarcador preditivo de CECL, na preservação das lesões de QA.

### Descritores (DECs)

Repressão Epigenética; Neoplasias Labiais; Queilite; Metilação.



## ABSTRACT

**Introduction:** Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant disorder located on the lip caused by intense exposure to ultraviolet radiation (UV). It generates changes such as DNA methylation, associated with the process of carcinogenesis of neoplasms such as lip squamous cell carcinoma (CECLS). Both 5-methylcytosine (5mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) are epigenetic DNA alterations that affect gene expression, favoring the progression of CECLSs. 5mC and 5hmC are considered potential biomarkers in the development of some cancers, but their relationship in CECLS and AK celTLS is unknown. Therefore, studies are needed to elucidate the influence of these markers on CECLS carcinogenesis. **Objectives:** This research aims to evaluate the impact of 5mC and 5hmC on lip carcinogenesis, correlating clinical, histological, and immunohistochemical parameters in ACs and CECLSs. **Material and Methods:** For this, 15 samples of healthy lips, 30 of QAs, and 45 of CECLS s from the tumoral front will be selected, which were prepared by Tissue Micro Array (TMA), on a single block for immunohistochemical reactions (5hmC, 5mC). The collection of clinical data and histopathological grading of epithelial dysplasia in ACs were performed using the binary system and the system Bryne established for SCCTLS. Data will be expressed as mean and standard deviation and compared by Mann-Whitney and Kruskal-Wallis/Dunn, Wilcoxon and Spearman correlation tests (SPSS,  $p < 0.05$ ). **Results:** In the evaluation of CECL samples ( $n=45$ ), a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) was observed in relation to 5mC labeling, which was higher than that of 5hmC. Additionally, in tumor lesions with T1/2 and T3/4 staging, a greater presence of 5mC was noted compared to 5hmC. Both male ( $p < 0.001$ ) and female ( $p = 0.003$ ) patients exhibited higher levels of 5mC when compared to 5hmC. **Conclusions:** There is expression of 5mC and 5hmC in QA and in CECL. 5mC appears to be related to CECL, although further studies are needed to assess its viability as a predictive biomarker for CECL in preserving QA lesions.

### Keywords

Epigenetic Repression; Lip Neoplasms; Cheilitis; Methylation.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5mC	5- Metilcitosina
5hmC	5-Hidroximetilcitosina
AOG	2-oxaglutarato
CL	Câncer de Lábio
CECL	Carcinoma Espinocelular de Lábio
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNMT	Do inglês <i>Metiltransferases</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
LPM	Lesões Potencialmente Malignas
OMS	Organização Mundial da Saúde
QA	Queilite Actínica
RUV	Radiação Ultravioleta
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TLS	Tecido Labial Sadio
TET	Do inglês <i>Ten Eleven Translocases</i>
TNM	Classificação de tumores malignos
UV	Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 -** (Introdução Geral) Citosina da espécie mamária.

**Figure 1 -** Perfil histológico e imunohistoquímico de TLSs, QAs, e CECLS.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	(Introdução Geral) Sistema binário de risco de malignização das displasias epiteliais.....	11
<b>Tabela 1 -</b>	Imunoexpressão de 5mC e 5hmC nos grupos TLS, QA e CECL.....	42
<b>Tabela 2 -</b>	Gradação de displasia em relação a imunoexpressão de 5mC e 5hmC nas amostras de QA.....	43
<b>Tabela 3 -</b>	Imunoexpressão para 5mC e 5hmC, estadiamento e grau de recidiva das lesões de CECL.....	44
<b>Tabela 4 -</b>	Associação dos aspectos clinicopatológicos e a imunoexpressão de 5mC e 5hmC nas amostras de CECL.....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
1.1 <i>Queilite actínica uma desordem potencialmente maligna</i> .....	10
1.3 <i>Metilação do DNA</i> .....	14
<b>3. HIPÓTESES</b> .....	18
3.1 <i>Hipótese Nula</i> .....	18
3.2 <i>Hipótese Alternativa</i> .....	18
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	19
4.1 <i>Objetivo geral</i> .....	19
4.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	19
<b>5. CAPÍTULO</b> .....	20
5.1 <i>Capítulo 1</i> .....	20
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
<i>Caracterização do Estudo e Princípios Éticos</i> .....	25
<i>Seleção da amostra</i> .....	25
<i>Análise histomorfológica</i> .....	25
<i>Confecção do Tissue Microarrayer</i> .....	26
<i>Imuno-histoquímica</i> .....	26
<i>Aquisição das imagens e análise de imuno-histoquímica</i> .....	27
<i>Análise estatística</i> .....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	28
<i>Dados clinicopatológicos e histológico das amostras de CECLS e QAs</i> .....	28
<i>Análise da imunexpressão de 5mC e 5hmC das amostras de CECLS, QAs e TLSs</i> .....	28
<i>Relação entre a gradação da displasia nas amostras de QA e a imunomaração de 5mC e 5hmC</i> .....	29
<i>Correlação entre a imunexpressão de 5hmC e 5mC, o estadiamento TNM e recidiva dos casos de CECL</i> .....	29
<i>Relação entre sexo, idade e marcação nuclear de 5hmC e 5mC</i> .....	30
<i>Associação entre grau histológico, invasão vascular, invasão perineural com os imunomarcadores 5hmC e 5mC nas amostras de CECLS</i> .....	30
<b>DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>FIGURAS</b> .....	41
<b>TABELAS</b> .....	42
<b>6. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	46
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>8. ANEXOS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### *1.1 Queilite actínica uma desordem potencialmente maligna*

A Queilite Actínica (QA) consiste em uma desordem potencialmente maligna, localizada no lábio em decorrência de intensa exposição à RUV. Por razões anatômicas, como o fato de o lábio inferior ser fortemente evertido, há uma maior incidência de raios solares no local, sendo essa a porção mais acometida. A estrutura da membrana semimucosa do lábio não possui os mecanismos fisiológicos e anatômicos de proteção, como por exemplo a pele, que exibe atributos como espessa camada córnea, presença da melanina na camada epidérmica, além de barreiras de proteção criadas por glândulas sebáceas e sudoríparas. (NICOLAU et al., 1964).

O fator de risco principal para o desenvolvimento é a exposição à RUV, que, em excesso, gera danos acumulativos no tecido do lábio. Em decorrência deste fato, a QA é reportada com maior frequência em países de clima tropical (LUCENA et al., 2012), pois o dano advém da exposição à radiação ionizante, causado pela interação direta com moléculas alvo ou indiretamente pela formação de radicais livres, que possuem alta afinidade por elétrons e pontes de hidrogênio, com o DNA como alvo primário (BIAGLOW et al., 1987).

O fototipo da pele, sexo e predisposição genética também são fatores responsáveis pelo surgimento destas lesões. Indivíduos do sexo masculino com fototipo baixo e mais de 50 anos que se submetem à exposição crônica ou excessiva aos raios UV, seja no cotidiano ou na jornada de trabalho, possuem grandes chances de desenvolver a QA. Atividades econômicas que envolvem elevada exposição à luz solar, como agricultura e pesca, aumentam os riscos de surgimento da lesão (SANTOS et al., 2018; KAUGARS et al., 1999).

Clinicamente, a QA é encontrada na conformação isolada ou multifocal, aguda ou crônica. A aguda é mais branda quanto aos danos celulares, apresentando características clínicas, como fissuras ou crostas e até ulcerações, que surgem após exposição solar intensa em um curto período. Possui, entretanto, reversibilidade após a remoção do fator etiológico, atingindo, em maior frequência, indivíduos jovens. Já a cronificação da QA se apresenta de forma assintomática e demanda um longo período para que ocorra, podendo apresentar alterações inerentes ao epitélio com caráter irreversível, sendo necessário o mínimo de 15 anos de exposição até que esses efeitos

histológicos irreversíveis sejam visíveis às análises (SANTOS et al., 2018). O caráter clínico da forma crônica da QA inclui perda da divisão clara entre o vermelhão do lábio e a pele, perda de elasticidade do tecido do lábio, tecido atrófico, presença de áreas eritematosas, erosivas e até placas hiperkeratóticas que podem variar quanto a espessura (MARKOPOULOS et al., 2004).

Os aspectos histopatológicos apresentados pela QA envolvem hiperplasia ou atrofia do epitélio, hiperqueratose e displasia, as quais são divididas em graus, variando de leve, moderado, severo até carcinoma *in situ*. Em nível de tecido conjuntivo, é possível encontrar infiltrado inflamatório local, vasodilatação e elastose solar que ocorre a partir da degeneração de fibras colágenas que passam a apresentar basofilia com aspecto amorfo.

Embora a classificação da OMS seja adotada na prática laboratorial histopatológica, a classificação de displasias das lâminas, principalmente as moderadas, costuma sofrer variabilidade de interpretação entre os examinadores. A subnotificação de displasias severas, tidas como moderadas, gera preocupação em decorrência da maior chance de transformação maligna. As opções de tratamento dessas duas classificações também se diferem, nas quais a displasia moderada deve ser somente acompanhada enquanto a displasia severa deve ser removida cirurgicamente. A fim de reduzir discordâncias no momento do diagnóstico, Kujan et al. em 2006 propôs um sistema binário de gradação histológica, utilizando os mesmos parâmetros firmados pela OMS (DANCYGER et al., 2018). (Tabela 1)

**Tabela 1:** Sistema binário de risco de malignização das displasias epiteliais.

Risco de Malignização	Classificação de displasia segundo Barnes et al. 2005
Baixo	Displasias epiteliais ausentes, questionáveis ou leves
Alto	Displasias epiteliais moderadas ou severas

Fonte: Adaptado de KUJAN et al. (2006)

Histórico do paciente, histórico da lesão e o grau de displasia da lesão são fatores que devem ser considerados para estabelecer o diagnóstico. Porém, vale salientar

que este diagnóstico pode ser puramente clínico sem biópsia prévia, como na manifestação aguda. As características histomorfométricas identificadas têm relevância no planejamento e tratamento da QA. O acompanhamento e recomendações do uso de fotoprotetor pelo paciente são importantes e determinantes no monitoramento da evolução da lesão nos casos agudos, por exemplo (ARNAUD et al., 2014).

Alguns estudos recentes revelam que amostras de QA já apresentam características clássicas de metilação que são vistas em CEC de pele, apontando que o *imprinting* epigenético pode apresentar vias comuns entre o fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de neoplasias malignas (RODRÍGUEZ-PAREDE et al., 2018).

## **1.2 Carcinoma Espinocelular de Lábio**

O câncer de lábio (CL) é encontrado no vermelhão do lábio, resultante da evolução das alterações histopatológicas da QA. Pode ser categorizado tanto como câncer de cabeça e pescoço quanto câncer de pele por muitas vezes os limites da lesão partirem da membrana semimucosa do lábio e atingirem a região perioral (ZITCH et al., 1995).

O Carcinoma Espino Celular (CCE) é considerado o tipo histológico com maior incidência na cavidade oral e representando até 90% dos casos diagnosticados em região de cabeça e pescoço. Se origina do epitélio de revestimento do trato aerodigestivo superior, atingindo lábio e cavidade oral; nasofaringe; orofaringe; hipofaringe e laringe (SANTOS et al., 2023).

Pelos mesmos motivos dos casos de QA, o CECL possui uma maior prevalência em lábio inferior, principalmente pela incidência de radiação ultravioleta nessa localidade anatômica. Ocorre com maior frequência em pacientes leucodermas em decorrência da menor presença de melanina no tecido, que protege os queratinócitos contra danos causados pelos raios UV. Acomete pacientes do sexo masculino com mais de 50 anos. Por ser fotodependente, o CECL é relacionado a pessoas que trabalham com exposição solar (BOTA et al., 2017).

Embora o CECL apresente elevados índices de sobrevida, é necessária a realização de abordagens promotoras de saúde para detectar precocemente essa lesão. Fatores, como estadiamento clínico avançado, tumores com grandes diâmetros e mal diferenciados, são importantes preditores prognósticos dessa enfermidade. A margem cirúrgica e um planejamento terapêutico bem elaborado, incluindo o registro detalhado de informações do protocolo cirúrgico e das características tumorais, também contribuem



para obtenção de resultados clínicos favoráveis e facilitam estudos retrospectivos com base em registros hospitalares (SENA et.al., 2010).

Emprega-se o sistema de estadiamento clínico de tumores (TNM) para caracterizar o tumor, prever o prognóstico e determinar a terapia mais apropriada para cada caso. Esse sistema associa informações sobre o tamanho, a presença de metástase à distância e envolvimento linfonodal para atribuir o estágio clínico do câncer (NEVILLE, 2009; STRIEDER et al., 2017). Além do TNM, os sistemas de gradação histológica de malignidade (SGHM) estão sendo amplamente adotados para uma previsão mais precisa do prognóstico (STRIEDER et al., 2017). Bryne, em 1998, elaborou um sistema de gradação, que atualmente é um dos mais comuns e específico para a parte invasiva do CECL e se baseia em parâmetros histopatológicos, que, quando somados, estimam o grau de malignidade, como grau de ceratinização; pleomorfismo nuclear; padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário.

O CECL apresenta fatores prognósticos cruciais que influenciam o comportamento progressivo da doença. Tumores menores que 2 cm podem variar em seu quadro clínico e histopatológico enquanto a localização das células escamosas no lábio superior ou inferior não mostra diferenças significativas na ocorrência de recorrências e/ou metástases. No entanto, o tamanho do tumor, maior que 0,5 cm, tem uma relação direta com a probabilidade de metástase e recidiva. O tipo mais prevalente é o ulcerativo, que demonstra maior tendência a metástases e recorrências, especialmente no formato ulcerativo-vegetativo e vegetativo que estão associados a lesões maiores. Além disso, o tamanho do tumor está relacionado aos graus II e III, em que as maiores taxas de metástases e recorrências são observadas (ABREU et al., 2004).

Quando diagnosticado precocemente, é possível impedir que haja uma evolução brusca no processo de carcinogênese. Espera-se que a expectativa de cura fique em média de 80-90% com uma mortalidade de 10-15%. O tratamento dessas lesões consistem na remoção cirúrgica da lesão com margens, podendo estar associado a outras terapias. A estratégia de tratamento escolhida é determinada por diversas questões e o resultado pode ser afetado por fatores de confusão, como abuso de álcool e fumo, idade e sexo do paciente e presença de comorbidades (CHOQUET et al., 2020) (CURRY et al., 2014; BIAGLOW et al., 1987).

Diversos elementos presentes no microambiente tumoral das células epiteliais neoplásicas possuem impacto na progressão do Carcinoma Espinocelular de Lábio (CECL). Alterações epigenéticas, inflamação crônica e imunossupressão são fatores que

induzem uma sequência de eventos que engatilham a transformação do estroma celular e desencadeia a proliferação celular neoplásica (CURRY et al., 2014).

A exposição à radiação UV é determinante no processo de malignização do CECL, por meio da liberação de radicais livres, interferindo nos mecanismos epigenéticos das células do meio e podendo afetar o sistema de metilação do DNA além de influenciar na estabilização da expressão gênica e viabilizar mecanismos de resposta genômica a partir de influência extrínseca. A literatura mostra que os sítios de mutação genômica de cânceres de pele, os quais têm como fator causal principal a exposição solar, coincidem frequentemente com as ilhas CpG, região onde é apontada com maior facilidade e onde é formada a 5-metilcitosina (DROUIN et al., 1997; YOU et al., 2001; MARTINEZ-FERNANDEZ et al., 2017).

### ***1.3 Metilação do DNA***

A epigenética consiste no estudo das modificações relacionadas ao DNA e histonas herdáveis. Visto que essas modificações não alteram a sequência de bases nitrogenadas, elas possuem caráter reversível. As referidas alterações ocorrem no DNA e nos fatores associados, responsáveis por conter informações que vão além do sequenciamento do DNA, as quais devem ser preservadas durante a divisão celular. Estes critérios e a replicação são influenciados pelo ambiente e hábitos em que estão inseridos, causando mudanças significativas na expressão gênica. Formada por um conjunto de mecanismos que podem favorecer a transcrição de alguns genes ou bloquear esse processo, a metilação consiste em um processo potencialmente reversível, tendo como forte característica a plasticidade gênica que pode ser modulada pelo meio externo (OLIVEIRA et al., 2010; MORGAN et al., 2004).

A determinação da origem celular está diretamente relacionada com o mecanismo de expressão gênica, no qual uma célula indiferenciada irá tomar as características e funções do tecido e órgãos aos quais pertence. Alterações nos mecanismos epigenéticos, como o perfil de metilação, podem interferir na expressão de um gene, sendo determinante para a diferenciação de fenótipos tumorais, por exemplo. Essa alteração determina local, origem e grau de evolução da neoplasia (OKANO et al., 1999).

Por definição, a metilação é a adição covalente de um grupo metil no carbono 5 da citosina na molécula de DNA, gerando, assim, a configuração 5-metilcitosina (5mC). Os radicais metil são obtidos através da dieta do indivíduo, em maioria a metionina,

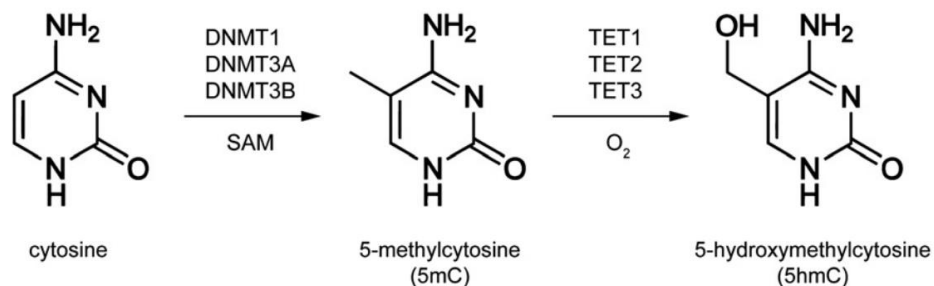
seguido do folato, colina e vitamina B12. Essa adição é realizada pelas metiltransferases, são elas: DNMT1 consideradas as metilases de manutenção, responsáveis pela metilação de fitas hemimetiladas e a DNMT2, DNMT3A e DNMT3B1, responsáveis pela metilação de fitas sem metilação prévia (HERMANN et al., 2004). (Figura 2)

A metilação do DNA pode ser modulada por fatores poluentes, como os íons metálicos; infecções; uso de medicamentos; exposição à radiação solar e hábitos, como o fumo. Quando o gene é metilado, a DNA transferase não estará apta a se ligar ao gene em decorrência da presença da cadeia metil, logo, esse gene não será transcrito, havendo silenciamento. Esse processo de metilação ocorre nas ilhas CpG, conhecidas como regiões promotoras de gene que, na essência, são citosinas ligadas a guaninas através de uma cadeia de fosfato (RAZIN et al., 2011).

O 5mC é considerado um importante regulador da metilação do DNA, obtendo um importante papel em diversos processos celulares, como na evolução neoplásica de lesões. Os mais diversos estudos buscam elucidar fatores epigenéticos relacionados a processos anormais na tumorigênese, associados com o silenciamento da transcrição genética causado pelo processo de metilação (DAHL et al., 2011).

Alterações, como a hipermetilação e a hipometilação, são vistas com frequência no processo de tumorigênese. Respectivamente, são evidenciadas pela supressão intensa de um gene, inativando a expressão gênica ou pela expressão intensa do gene, intensificando a ação. Quando um gene com função de supressão tumoral é hipermetilado, ele tem a finalidade bloqueada e não é capaz de exercê-la, influenciando assim no desenvolvimento neoplásico. Assim, como ocorre quando um oncogene é hipometilado, ele obtém total exercício do objetivo, colaborando para o desenvolvimento da neoplasia (BINKLEY et al., 2004; COSTA et al., 2004).

Por volta da década de 70, houve o primeiro relato da presença de 5hmC em mamíferos, que consiste em uma forma oxidada do 5mC. Ocasionalmente pela TET, o 5mC é catalisado e convertido em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), seja de forma ativa, através da ação oxidativa de TET, ou através da replicação passiva dependente da perda. (Figura 2)



**Figura 1:** Citosina da espécie mamária. FONTE: Dahl et al., 2011.

O grupo TET é composto por TET1, TET2, e TET3 que contêm domínio de dioxigenase dependente de 2-OG e Fe (II) no terminal C. Tem sido proposto na literatura que o 5hmC age como intermediário no processo de desmetilação. Algumas vias que envolvem a remoção do grupo metil da metilcitosina por meio da hidroximetilcitosina foram sugeridas e validadas *in vivo* (BACHMAN et al., 2014). A função e os mecanismos que o 5hmC envolve ainda não estão completamente elucidados, visto que alguns estudos também relatam que a ação dele pode ocorrer independente da desmetilação do DNA (TAHILIANI et al., 2009; ITO et al., 2010).

## 2. JUSTIFICATIVA

Estima-se que, para o triênio de 2023 a 2025, surjam cerca de 15.100 novos casos de câncer em todo o Brasil. O câncer de cavidade oral tem o posto de oitavo tipo de neoplasia mais frequente no país e ocupa a quinta posição na região Nordeste (8,35 por 100 mil). Para o desenvolvimento dessas lesões tumorais, alguns fatores de riscos são apontados e estão entre eles as alterações epigenéticas causadas pela exposição a raios ionizantes (SANTOS et al.,2023; SUNG, et al., 2021).

A busca por biomarcadores preditivos, como 5mC e 5hmC, desempenha um papel crucial na detecção precoce e no acompanhamento de desordens potencialmente malignas, como a QA. Esses biomarcadores epigenéticos têm sido amplamente estudados por sua capacidade de indicar alterações na metilação do DNA e, portanto, fornecem informações valiosas sobre a progressão de lesões potencialmente malignas para condições malignas.

No contexto específico do estado do Ceará, situado em uma região tropical, a relevância da pesquisa de biomarcadores é ainda mais evidente. Com uma exposição solar intensa e constante devido ao clima, a população local, incluindo agricultores e pessoas que trabalham em barracas de praia, apresenta um risco aumentado de desenvolver condições mucocutâneas, como a queilite actínica. Nesse cenário, a identificação precoce de alterações epigenéticas por meio da análise de 5mC e 5hmC pode permitir intervenções oportunas e eficazes, reduzindo, assim, o impacto negativo dessas desordens potencialmente malignas na saúde pública e na qualidade de vida dos indivíduos afetados.

### **3. HIPÓTESES**

#### ***3.1 Hipótese Nula***

Não haverá diferença estatística relevante entre a imunexpressão de 5hmC e 5mC nos grupos de Carcinoma Espinocelular de Lábio, Queilite Actínica e Tecido de Lábio Saudável.

#### ***3.2 Hipótese Alternativa***

Haverá diferença estatística relevante entre a imunexpressão de 5hmC e 5mC nos grupos de Carcinoma Espinocelular de Lábio, Queilite Actínica e Tecido de Lábio Saudável.

## **4. OBJETIVOS**

### ***4.1 Objetivo geral***

Avaliar o perfil da imunexpressão de 5mC e 5hmC correlacionando parâmetros clínico-patológicos em Tecido Labial Saudável, Queilites Actínicas e em Carcinoma Espinocelulares de Lábio.

### ***4.2 Objetivos Específicos***

- Comparar a imunexpressão de 5mC e 5hmC entre as amostras de TLS, QA e CECL;
- Analisar as células positivas para 5mC e 5hmC nas amostras de CECLs e relacionar aos parâmetros clínico-patológicos dos pacientes da amostra.

## 5. CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de mestrado e doutorado (dissertações e teses) e permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará), protocolado com número 2.191.839 (ANEXO I). Serão respeitados todos os aspectos éticos expressos na Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde /Ministério da Saúde que traz as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de pesquisas com seres humanos e em conformidade com a norma do CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).

Desta forma, a presente dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com a revista científica escolhida.

### *5.1 Capítulo 1*

“Avaliação do perfil da imunoexpressão de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina em parâmetros clínico-patológicos da queilite actínica e do carcinoma espinocelular de lábio.”. (*Evaluation of the immunoexpression profile of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in clinicopathological parameters of actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma*).

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology And Oral Radiology* (ISSN: 2212-4403)



**Research Article****Title page**

Avaliação do perfil da imunoexpressão de 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina em parâmetros clínico-patológicos da queilite actínica e do carcinoma espinocelular de lábio.

Amanda Pinheiro Leitão Matos<sup>1</sup>, Paulo Goberlânio de Barros Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>1</sup>, Mario Rogério Lima Mota<sup>1</sup>, Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes<sup>1</sup>, André Alves Crispim<sup>2</sup>, Fabrício Bitu Sousa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ce, Brazil.

<sup>2</sup> Hospital Haroldo Juaçaba, Cancer Institute of Ceará, Fortaleza, Ce, Brazil.

\*Correspondence author: PhD. MSc. DDS. Fabrício Bitu Sousa

Department of Dental Clinic School of Pharmacy, Dentistry  
and Nursing Federal University of Ceará

Rua Monsenhor Furtado, 1273 - Rodolfo Teófilo –

Cep 60416-030 Fortaleza - CE, Brazil.

Phone / Fax Number: +55 85 3366 8232

E-mail: [fbitu@hotmail.com](mailto:fbitu@hotmail.com)

**Funding:** None reported

**Conflict of interest:** None reported.

## RESUMO

**Introdução:** A Queilite Actínica (QA) consiste em uma desordem potencialmente maligna, localizada no lábio, causada pela intensa exposição à radiação ultravioleta (UV). Ela gera alterações, como a metilação do DNA, associadas ao processo de carcinogênese de neoplasias, como o carcinoma espinocelular do lábio (CECL). A 5-metilcitosina (5mC) e a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) são alterações epigenéticas do DNA que afetam a expressão gênica, favorecendo a progressão do CECLs. O 5mC e 5hmC são considerados potenciais biomarcadores no desenvolvimento de alguns cânceres, mas não se sabe sobre a relação no CECL e da QA. Logo é necessária a realização de estudos para avaliar a utilização do 5mC e 5hmC como possíveis biomarcadores para desordens potencialmente malignas como as QAs. **Objetivos:** Esta pesquisa objetiva avaliar o impacto do 5mC e 5hmC na carcinogênese labial, correlacionando parâmetros clínicos, histológicos e imunohistoquímicos em QAs e CECLs. **Materiais e Métodos:** Para isso, serão selecionadas 15 amostras de tecido labial sadio (TLS), 30 de QA e 45 do *front tumoral* de CECLs, que foram preparados por Tissue Micro Array (TMA), em bloco único para as reações imunohistoquímicas (5hmC, 5mC). Foi realizada a coleta de dados clínicos, gradação histopatológica das displasias epiteliais nas QAs estabelecidas através do sistema binário e o grau de malignidade dos CECLs foi feito pelo sistema estabelecido por Bryne. Os dados foram expressos em forma de média e desvio-padrão e comparados pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis/Dunn, Wilcoxon e correlação de Spearman (SPSS,  $p < 0,05$ ). **Resultados:** Na avaliação das amostras de CECLs ( $n=45$ ) houve diferença estatística ( $p < 0,001$ ) significativa quanto à marcação de 5mC que foi maior que a de 5hmC. Nas lesões tumorais com estadiamento T1/2 e T3/4 também se notou uma maior marcação de 5mC em relação ao 5hmC. Ambos os pacientes do sexo masculino ( $p < 0,001$ ) e feminino ( $p = 0,003$ ) obtiveram maior positividade para 5mC quando comparados ao 5hmC. **Conclusões:** Há expressão de 5mC e 5hmC em tecido maligno de QA, na QA e em CECL. O 5mC parece estar relacionado ao CECL, podendo ser utilizado como biomarcador preditivo na preservação das lesões de QA.

### Descritores (DECs)

Repressão Epigenética; Neoplasias Labiais; Queilite; Metilação.

## INTRODUÇÃO

O câncer de lábio (CL) consiste em uma lesão maligna que acomete, em maior parte, a região labial. O subtipo mais comum é o Carcinoma Espinocelular (CEC), uma

neoplasia maligna que tem origem no tecido epitelial de revestimento do trato aerodigestivo superior. Em um panorama de visão acerca dos cânceres de cabeça e pescoço, há uma redução da incidência das lesões de laringe e nasofaringe, seguida de um crescimento dos casos de câncer de boca e lábio.<sup>1-2</sup>

Na maioria dos casos, os Carcinomas Espinocelulares de Lábio (CECL) se desenvolvem no lábio inferior<sup>3</sup> e acometem o vermelhão do lábio em decorrência dos níveis de incidência solar, o fator de risco principal. O mecanismo próprio de proteção contra a radiação ultravioleta (UV) mais conhecido é a pigmentação de melanina na pele, que funciona como uma barreira física, reduzindo a penetração da radiação UV pela epiderme.<sup>4</sup> Sendo essa, a razão de haver um maior nível de incidência dessas lesões em pacientes leucodermas. Homens são os mais acometidos, em especial leucodermas<sup>5</sup>, e que têm atividades ocupacionais e/ou socioeconômicas relacionadas com longa e prolongada exposição à radiação UV, tendo uma elevada incidência em países onde essas atividades ao ar livre ocupam parte da economia, como na Austrália, por exemplo.<sup>6</sup>

Ao avaliar o prognóstico de CECL localizados no vermelhão de lábio inferior e superior, ambos apresentam níveis de sobrevida similares. Já aqueles localizados na região de comissura mostram um pior prognóstico associado. Logo, fatores como estadiamento, em especial os estágios de T e N, são determinantes para a previsibilidade do prognóstico dessas lesões<sup>7</sup>. Pacientes com CECL possuem uma sobrevida maior, relacionada a um bom prognóstico quando comparados aos carcinomas orais e, quando diagnosticados precocemente, possuem grande chance de cura. Já pacientes com lesões de tamanho maior que 3cm possuem chances de metástase.<sup>8-9</sup>

O CECL costuma ser precedido pela Queilite Actínica (QA), uma lesão potencialmente maligna de cunho inflamatório crônico e assintomático. Assim como o CECL, é desenvolvida a partir da exposição constante e contínua à radiação iônica emitida pela exposição solar. Justificado pelo grau de incidência de radiação proporcionada pela localização, o lábio é a região mais acometida, com a QA envolvendo cerca de 95% dos casos, o lábio inferior. Além do fototipo baixo da pele, pessoas do sexo masculino são as que mais apresentam essa lesão, com histórico de anos de exposição solar. Entretanto, ela ocorre com maior frequência em pacientes na quinta década de vida. Clínicamente pode se apresentar como uma ferida, ressecada e com edema.<sup>10-11</sup>

A radiação ultravioleta é fator desencadeante de ambos QA e CECL, podendo danificar mecanismos de dano e reparo do DNA,<sup>12</sup> além de causar nele alterações de natureza epigenética, que apesar de não serem permanentes podem ter uma influência

importante no desenvolvimento da carcinogênese. A exposição a radiação ionizante provou poder apresentar maiores riscos de desenvolvimento de CECL quando comparado à exposição ao álcool e tabaco.<sup>13-16</sup>

Estas alterações genéticas, conhecidas como marcadores epigenéticos, são responsáveis por regular a organização da cromatina e o padrão de expressão gênica, sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA, logo se configurando como reversíveis. A metilação é o marcador epigenético mais conhecido e é associado ao grupo metil da quinta posição da citosina. A 5-metilcitosina (5mC) é um padrão preservado através da ação das metiltransferases do DNA (DNMTs),<sup>16-17</sup> responsáveis por realizar a catalização e adição covalente de grupos metil à citosina no DNA, mais precisamente nas ilhas CpG. No momento em que o grupo metil se liga, a DNA transferase é impossibilitada de realizar a transcrição do DNA, logo, de forma simplificada, a metilação silencia o gene. Em específico, o 5mC possui um papel importante em processos de regulação gênica do DNA, que é estabelecida durante o período de desenvolvimento embrionário, contribuindo em aspectos importantes durante a diferenciação celular, algo que se aplica ao exercer um papel importante na via epigenética do desenvolvimento de neoplasias malignas.<sup>18-22</sup>

A 5-hidroximetilcitosina (5hmC) consiste na forma oxidada do 5mC. Estudos recentes mostraram que a ten-eleven-translocação (TET), uma família de enzimas catalizadoras, é responsável por realizar a conversão de 5mC em 5hmC. O 5hmC é conhecido como a 'sexta base genômica' e vem sendo associado ao desenvolvimento de algumas doenças como aterosclerose coronária<sup>23-26</sup> e ao processo de carcinogênese de diversos tipos de câncer, dentre eles, o CEC. Diversos estudos apontam o 5hmC como um suposto marcador para possível malignização de algumas lesões, visto que a QA é considerada uma lesão que pode evoluir para o CECL.<sup>27</sup> O diagnóstico precoce e instrumentos que possibilitem uma maior predictibilidade, quanto ao potencial carcinogênico de lesões como a QA, são necessários. Pois frente a um diagnóstico precoce, o CECL possui um melhor prognóstico. Logo se fazem necessárias maiores investigações acerca do processo de carcinogênese labial e a possível relação com a presença ou ausência de 5mC e 5hmC.<sup>12,20,28,29,30</sup>

Com base no que foi exposto, esta pesquisa tem o objetivo de avaliar o perfil da imunoexpressão de 5mC e 5hmC, correlacionando parâmetros clínicos-patológicos, em Queilites Actínicas e no Carcinoma de Espinocelular Labial.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Caracterização do Estudo e Princípios Éticos***

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo realizado no Hospital Haroldo Juaçaba-Instituto do Câncer do Ceará (ICC). A pesquisa em questão foi devidamente submetida e aprovada pelo comitê técnico-científico do Hospital Haroldo Juaçaba- Instituto do Câncer do Ceará e pelo Comitê de Ética e Pesquisa do referido hospital (número do protocolo 2.191.839), seguindo os preceitos éticos assegurados pelas diretrizes 466/12 em ética e pesquisa (Anexo I).

### ***Seleção da amostra***

As amostras que compuseram os grupos do presente estudo, foram de Tecido Labial Sadio (TLS), QA e CECL.

Todo o tecido utilizado nas análises, foi obtido através de biópsias excisionais de QAs e CECLS. Foram previamente fixados e embebidos em parafina, coletados nos anos de 2010 a 2019 no Hospital Haroldo Juaçaba, Instituto do Câncer do Ceará. As amostras de TLS, foram selecionadas a partir das margens cirúrgicas livres de alterações histológicas das amostras de QAs. Dados clínicos das lesões, como o estadiamento tumoral (TNM), recidiva, sexo e idade dos pacientes foram adquiridos nos prontuários médicos.

### ***Análise histomorfológica***

Após o corte das amostras de biopsias excisionais, foi realizada a coloração com Hematoxilina e Eosina e então, um único patologista realizou as análises sob microscopia de luz (Nikon Eclipse-E200. Tokyo, Japan), a fim de realizar a gradação histopatológica. Os casos de CECLS tiveram a gradação realizada segundo Bryne (1998) e foram classificadas em alto e baixo grau de malignidade. Já as lâminas de QA, foram classificadas através do sistema binário, alto e baixo risco de transformação maligna.<sup>31</sup>

### ***Confecção do Tissue Microarrayer***

Primariamente, foi realizada uma análise histológica das amostras resultantes das biópsias, feitas por um único patologista. Foi possível selecionar áreas com displasia e elastose solar nos blocos de QA, região de *front* tumoral nas amostras de CECLS e locais que houvesse tecido epitelial livre de alterações morfológicas para os casos de TLSs.

Para a confecção dos blocos, utilizou-se o dispositivo Tissue Microarrayer (Quick-Ray UNITMA®) (TMA). A etapa subsequente consistiu no puncionamento de cada uma das áreas previamente selecionadas e demarcadas de forma que fosse obtido um fragmento de 2mm de diâmetro, o qual foi transferido, em ordem para o bloco chamado receptor. Ao todo foram confeccionados 3 blocos de TMA, um referente a cada grupo de análise.<sup>32</sup>

### ***Imuno-histoquímica***

Com o uso de um micrótomo, as secções dos blocos de TMA foram realizadas com espessura de 3µm e montadas em lâmina de vidro silanizado logo em seguida. O controle utilizado foi feito a partir de um corte de cérebro humano.<sup>30,33</sup>

A recuperação antigênica foi realizada com citrato ph 6 em banho maria e foram utilizados os anticorpos primários anti-5mC (AB10805, 1:200, Abcam®) e 5hmC (AB214728, 1:400, Abcam ®) e a contra coloração de escolha foi a hematoxilina de Harris.

A positividade de 5mC e 5hmC foi determinada a partir da presença da coloração acastanhada no núcleo das células tumorais e epiteliais presentes nas amostras. Salientando que essa marcação é correspondente a presença global da metilação e da hidroximetilação. Para a quantificação das células positivas, foram realizadas fotomicrografias de 5 campos de cada amostra do TMA, no aumento de 400x, da região epitelial, nos casos de TLS e QAs. Já nas amostras de CECLS, foram capturados também 5 campos de áreas com a presença de infiltrado de células neoplásicas, no *front* tumoral.<sup>34</sup>

Todas as análises destes testes foram realizadas por um único patologista sem conhecimento prévio dos dados clínico-patológicos dos pacientes e dos grupos.

### ***Aquisição das imagens e análise de imuno-histoquímica.***

O equipamento para o escaneamento das lâminas utilizadas no estudo foi cedido pela Universidade de Fortaleza (UNIFOR) do Departamento de Patologia no Núcleo de Atenção Médica Integrada (NAMI). O aparelho de scanner utilizado foi da marca Panoramic DESK, 3DHISTECH ®. O software do scanner abre no computador acoplado ao aparelho e o operador deve selecionar a área de interesse removendo o que não é referente a amostra na lâmina, dando seguimento ao escaneamento.

Após o escaneamento, os arquivos são exportados para o software CaseViewer- 3DHISTECH ® onde foram realizadas as fotomicrografias das lâminas. Ele é capaz de simular funções presentes em microscópios, como a possibilidade de selecionar as objetivas e aumentos necessários para o estudo. Foi utilizado o aumento de 400x, com a opção *take snapshot* foram capturadas fotos referentes a 5 campos de cada amostra e em seguida foi feita a quantificação das células com marcação nuclear.

Por fim a contagem foi realizada através do uso do software Image J ®, com o comando *multi point*, contabilizando as células do front tumoral advindas dos cortes de CECLS e células epiteliais das lesões de QAs e TLSs positivas e negativas, afim de que a média e o desvio padrão sejam feitos de forma coerente.

### ***Análise estatística***

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%.

Foram calculadas as médias e desvio-padrão dos percentuais de imunoexpressão para cada uma das proteínas estudadas bem como da relação 5mC/5hmC. Os dados foram comparados por meio dos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis/Dunn (análise entre grupos) e Wilcoxon e correlação de Spearman (análise intragrupos).

## RESULTADOS

### Dados clinicopatológicos e histológico das amostras de CECLS e QAs

No presente estudo, foram analisadas 45 amostras de CECLS, o qual 75,5% (n=34) era composto por pacientes do sexo masculino e 24,5% pelo sexo feminino 53,3% (n=24), com idade até 65 anos e 46,7% (n=21), com idade superior a 65 anos. Apresentavam estadiamento T1/2 66,6% (n=30) e T3/4 33,4% (n=15); N0 86,6% (n=39) e N+ 13,4% (n=6); e M0 em 93,3% (n=39) e M1 6,7% (n=6). Com recidiva de 6,7% (n=3) dos casos.

Quanto aos achados histopatológicos, foi possível observar que 62,2% (n=28) das amostras, apresentavam baixo grau histológico dos CECLS 88,8% (n=40), não possuíam invasão vascular e cerca de 73,3% (n=33) não tinha invasão perineural.

Já nas amostras de QAs (n=30), foi observada uma porcentagem de 63,33% (n=19) de lesões que apresentaram gradação da displasia de baixo risco e 36,67% (n=11) de alto risco.

### Análise da imunexpressão de 5mC e 5hmC das amostras de CECLS, QAs e TLSs.

Todos os grupos de amostras, apresentaram células positivas para ambos os anticorpos, 5mC e 5hmC. Foi realizada a contabilização geral de núcleos positivos para 5hmC, 5mC. Na comparação da média de marcação em TLS (n=15), foi visto que as células positivas para 5mC ( $85.45 \pm 15.68$ ) foram superiores as de 5hmC ( $58.79 \pm 28.49$ ), porém não foi observada diferença estatística relevante ( $p=0,074$ ).

Nas amostras de QAs (n=30), os núcleos marcados para 5mC ( $84.52 \pm 23.45$ ) não mostraram diferença significativa em relação aos marcados para 5hmC ( $74.00 \pm 16.42$ ) ( $p=0,063$ ). Já nas amostras de CECLs (n=45), houve um aumento estatisticamente significativo na expressão de 5mC ( $91.97 \pm 5.65$ ) ( $p < 0,001$ ) em comparação à marcação de 5hmC ( $64.24 \pm 20.30$ ).

No entanto, ao comparar todas as razões, constatou-se uma diferença estatisticamente relevante entre os grupos QA e CECL em relação ao TLS ( $p=0,013$ ). Ao analisar a imunexpressão de 5mC entre os grupos, não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes ( $p=0,843$ ). O mesmo aconteceu as células positivas para 5hmC, em que não houve diferença relevante observada ( $p=0,191$ ) entre os grupos QA ( $74.00 \pm 16.42$ ), CECL ( $64.24 \pm 20.30$ ) e TLS ( $58.79 \pm 28.49$ ). (Tabela 1)



### **Relação entre a gradação da displasia nas amostras de QA e a imunomarcagem de 5mC e 5hmC.**

As displasias presentes nas amostras de QA foram classificadas em baixo risco (n=19) e alto risco (n=11). Nos casos de baixo risco, observou-se uma maior expressão nuclear do 5mC ( $85.03 \pm 26.10$ ) em comparação ao 5hmC ( $71.42 \pm 16.92$ ), demonstrando diferença estatisticamente significativa entre os marcadores ( $p=0,041$ ). Já nas amostras classificadas como alto risco, não foi encontrada diferença estatística entre os marcadores de 5hmC ( $81.73 \pm 13.85$ ) e 5mC ( $83.43 \pm 18.51$ ) ( $p=0,465$ ). A comparação da marcação de 5hmC com a gradação, não apresentou diferença estatística ( $p=0,146$ ), assim como a de 5mC ( $p=0,693$ ). (Tabela 2)

### **Correlação entre a imunexpressão de 5hmC e 5mC, o estadiamento TNM e recidiva dos casos de CECL.**

O grau de estadiamento das lesões de CECLs foi determinado pela classificação TNM. Nos casos classificados como T1/2 (n=30), foi encontrada diferença estatística entre a marcação de 5hmC ( $58.74 \pm 22.55$ ) e 5mC ( $92.87 \pm 5.27$ ), sendo a marcação de 5mC maior ( $p=0,005$ ). Nas amostras classificadas como T3/4 (n=15), também foi observada uma maior marcação de 5mC ( $92.52 \pm 5.08$ ) em relação à marcação de 5hmC ( $66.08 \pm 22.46$ ), com diferença estatística ( $p=0,043$ ). No entanto, ao comparar os positividade de 5mC ( $p=0,713$ ) e 5hmC ( $p=0,624$ ) entre as classificações T1/2 e T3/4, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

Em relação ao envolvimento linfonodal (N), as amostras classificadas como N0 (n=39) apresentaram diferença significativa na comparação de 5hmC ( $69.38 \pm 18.19$ ) e 5mC ( $90.91 \pm 5.42$ ) ( $p=0,008$ ). Da mesma forma, as amostras classificadas como N+ (n=6) também mostraram diferença estatisticamente significativa ( $p=0,028$ ), com menor expressão de 5hmC ( $53.19 \pm 27.89$ ) e maior expressão de 5mC ( $95.53 \pm 2.88$ ). No entanto, ao comparar a imunexpressão de 5hmC entre N0 e N+, não foi encontrada diferença estatística ( $p=0,233$ ), assim como no caso do 5mC ( $p=0,099$ ).

Ao analisar a presença de metástase, os casos classificados como M0 (n=42) não apresentaram diferença estatística entre o 5hmC ( $61.07 \pm 18.34$ ) e 5mC ( $91.75 \pm 5.84$ ) ( $p=0,201$ ). Da mesma forma, os casos classificados como M1 (n=3) também não mostraram diferença estatisticamente significativa entre a expressão de 5hmC ( $47.15 \pm 29.33$ ) e 5mC ( $93.56 \pm 4.44$ ). Embora os casos de M0 tenham mostrado uma leve

redução de 5hmC em comparação com os de M1, essa diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,398$ ). O mesmo ocorreu com as amostras de 5mC, que também não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ( $p=0,735$ ).

Cerca de 42 casos analisados não apresentaram recidiva, e nesses casos não foi observada diferença estatística entre o 5hmC ( $66.02\pm 18.89$ ) e 5mC ( $91.58\pm 5.76$ ) ( $p=0,502$ ). Da mesma forma, nos casos em que houve recidiva, também não foi encontrada diferença estatística entre os a imunexpressão de 5hmC ( $45.83\pm 29.88$ ) e 5mC ( $96.04\pm 0.91$ ) ( $p=0,208$ ). A imunexpressão para 5hmC não mostrou relevância estatística quando comparados os grupos com e sem recidiva ( $p=0,765$ ), assim como o 5mC também não demonstrou diferença relevante ( $p=0,208$ ). (Tabela 3)

### **Relação entre sexo, idade e marcação nuclear de 5hmC e 5mC.**

Os pacientes do sexo feminino apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento de 5mC ( $91.62\pm 7.18$ ) em comparação aos de 5hmC ( $61.78\pm 15.39$ ) ( $p=0,003$ ). Da mesma forma, os pacientes do sexo masculino também apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento da imunexpressão de 5mC ( $92.10\pm 5.15$ ) em relação aos de 5hmC ( $64.99\pm 21.80$ ) ( $p<0,001$ ). Quando analisamos a expressão de 5hmC isoladamente, pacientes do sexo feminino e masculino não mostraram diferenças significativas entre si ( $p=0,269$ ), assim como nos de 5mC ( $p=0,553$ ).

Os pacientes das amostras foram divididos por idade, aqueles com até 65 anos apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento da expressão de 5mC ( $93.03\pm 4.46$ ) em comparação aos de 5hmC ( $62.99\pm 20.72$ ) ( $p<0,001$ ). Da mesma forma, pacientes com idade superior a 65 anos também apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento da positividade das células para 5mC ( $90.92\pm 6.59$ ) em relação aos de 5hmC ( $65.63\pm 20.40$ ) ( $p<0,001$ ). Ao analisar as marcações de 5hmC isoladamente, pacientes do grupo "até 65" e ">65" não mostraram diferenças significativas entre si ( $p=0,690$ ), assim como nos de 5mC ( $p=0,814$ ). (Tabela 4)

### **Associação entre grau histológico, invasão vascular, invasão perineural com os imunomarcadores 5hmC e 5mC nas amostras de CECLS.**

Em todas as amostras de CECLS foram realizadas análises histológicas, incluindo a mensuração do grau histológico e a presença ou ausência de invasão vascular

e perineural. Vinte e oito amostras obtiveram gradação histológica baixa, mostrando significância estatística quanto ao aumento da imunexpressão de 5mC ( $92.77 \pm 5.02$ ) em relação aos de 5hmC ( $62.17 \pm 17.84$ ) ( $p < 0,001$ ). Nos casos com grau histológico alto, que foram dezessete, também houve diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento da imunexpressão de 5mC ( $89.77 \pm 6.41$ ) em comparação aos de 5hmC ( $65.18 \pm 23.56$ ) ( $p =$ ). Ao analisar as marcações de 5hmC isoladamente, pacientes dos grupos "baixo" e "alto" não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p = 0,765$ ), assim como na expressão de 5mC ( $p = 0,208$ ).

Na avaliação de invasão vascular, 40 pacientes não apresentaram invasão e mostraram diferença estatisticamente significativa quanto ao aumento da marcação para 5mC ( $92.12 \pm 5.24$ ) em relação aos de 5hmC ( $64.56 \pm 18.47$ ) ( $p < 0,001$ ). Entretanto, 5 pacientes apresentaram invasão vascular, mas esses casos não mostraram relevância estatística quanto ao aumento da imunexpressão de 5mC ( $89.28 \pm 8.35$ ) em relação aos de 5hmC ( $53.84 \pm 29.36$ ) ( $p < 0,068$ ). Ao analisar isoladamente as marcações de 5hmC, os pacientes dos grupos "não" e "sim" não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p = 0,348$ ), assim como na expressão de 5mC ( $p = 0,440$ ).

Por fim, em 33 casos, não foi observada invasão perineural, e houve diferença estatisticamente significativa no aumento das contagens nucleares de 5mC ( $92.25 \pm 5.28$ ) em relação às de 5hmC ( $63.18 \pm 18.58$ ) ( $p < 0,001$ ). Também houve disparidade na comparação da imunexpressão de 5hmC ( $63.47 \pm 23.97$ ) em relação ao 5mC ( $90.50 \pm 6.58$ ), com maiores marcações para 5mC ( $p = 0,015$ ). Ao analisar a marcação de 5hmC isoladamente, os pacientes do grupo "não" e "sim" não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p = 0,968$ ), assim como na imunexpressão de 5mC ( $p = 0,571$ ). (Tabela 4)

## **DISCUSSÃO**

A partir do conhecimento de que a metilação do DNA é um processo epigenético com característica de reversibilidade, essa verificação é realizada através da imunexpressão de 5mC e 5hmC. No presente estudo, realizamos a investigação da presença de 5mC e 5hmC global pela reação de imunohistoquímica nos tecidos coletados. Nossos resultados se basearam na positividade nuclear das células.

O aumento da expressão gênica ocorre aliada à progressão da maturação da metilação, o que implica no fenótipo expresso nos pacientes que possuem essa progressão em andamento. A metilação possui, muitas vezes, a capacidade e o poder de determinar

a diferenciação de tecidos e até a gradação de neoplasias a partir da ação, podendo justificar uma presença acentuada em lesões malignas e potencialmente malignas.<sup>18</sup>

Após busca na literatura, verificamos que certos estudos indicaram uma ligação entre o potencial carcinogênico das lesões e a diminuição na marcação de hidroximetilação através do 5hmC. No entanto, essa associação não pôde ser observada em nosso estudo, uma vez que não foi identificada uma perda significativa de células positivas para 5hmC nas amostras de TLS em comparação com as de QA e CECL. O que difere de resultados, como os apresentados por Jawert et al., em 2013, nos quais se constatou uma redução significativa no número de células positivas para 5hmC em carcinomas de células escamosas em comparação com a expressão em tecido epitelial saudável. Essa diferença sugere um possível papel da perda de marcação dessa hidroximetilação em processos carcinogênicos.<sup>35</sup>

Uma vez que o 5hmC é derivado do 5mC, alguns estudos indicam uma possível ligação entre o aumento na expressão de 5mC e a diminuição da expressão de 5hmC no mesmo contexto. Isso é ilustrado pelo estudo de Lian, em 2012, que observou uma redução de 5hmC e associou essa descoberta ao acúmulo de 5mC em melanomas. Em nossos próprios resultados, também observamos uma diferença significativa entre a presença de 5hmC e 5mC, demonstrando um aumento de 5mC nas lesões de CECLS. Essa coexistência das bases de citosina é comum em muitos locais genômicos, incluindo corpos de genes.<sup>36-37</sup>

O aumento da expressão de 5mC indica que há menos hidroxilação, ou seja, menor conversão em 5hmC, mantendo a metilação em genes específicos. A ampla distribuição dos marcadores de metilação e hidroximetilação afeta diretamente a ação específica de acordo com o gene. Sabe-se que o 5hmC é mais seletivo em relação ao alvo genético do que o 5mC, resultando em uma associação positiva entre a presença de 5hmC e a expressão gênica, pois permite que haja transcrição, o que não ocorre na presença de 5mC.<sup>37</sup>

Além disso, a maior expressão de 5mC em comparação com 5hmC indica uma possível relação entre a metilação e a hidroximetilação na genética tumoral, supondo que as duas possuam localização similar. O 5hmC influencia a expressão genética ao participar do processo de desmetilação, criando funções antagônicas quando ambos estão no mesmo local: o aumento de um está ligado à redução do outro. No entanto, alguns autores sugerem que os níveis de sítios CpG não se correlacionam bem com a metilação total, indicando que o 5hmC e o 5mC têm funções independentes.<sup>38</sup>

A literatura revela que em casos de carcinomas hepáticos, por exemplo, o aumento de 5mC no tecido maligno, muitas vezes pode coincidir com a redução de 5hmC no mesmo tecido, diferente do que foi observado no nosso estudo, em que, apesar de haver alteração de nível dessas duas marcações, não houve diferença de 5hmC entre os grupos. Entretanto, o status volátil de metilação no DNA é reflexo do balanço desses dois eventos epigenéticos devido à capacidade de reversibilidade.<sup>39</sup>

Nas avaliações quanto ao estadiamento tumoral dos casos de CECL, ambos T1/2 e T3/4 demonstraram diferenças significativas quanto à imunomarcagem de 5mC e 5hmC, mas não diferenças entre si. Logo, não é apontada nenhuma discrepância entre essas duas evoluções tumorais e os marcadores, podendo-se notar que a quantidade de 5mC e 5hmC não demonstraram influência clara frente à análise T do estadiamento TNM. Assim como a não relação linfonodal, que expressou diferenças nos entre 5mC e 5hmC de N0 e N+, apontando também que essa discrepância não influenciou no envolvimento com células neoplásicas dos linfonodos.

Foi proposto que o tempo de oxidação da metilcitosina durante a proliferação celular é responsável por reduzir os níveis de hidroximetilcitosina no DNA genômico, como aqueles observados durante a tumorigênese. Isto justifica a diferença na expressão de 5mC e 5hmC nas amostras de CECLS, que está aumentada. Dessa forma, como apresentado nos nossos resultados, a marcação de 5mC está significativamente maior que as de 5hmC durante a progressão tumoral. Logo, a relação da imunexpressão de 5mC com a atividade de replicação das células está correlacionada e pode ser observada em nossos resultados, pois ambas as avaliações de estadiamento, T1/2 e T3/4, apresentam maior expressão 5mC quando comparada a expressão de 5hmC. Porém, não há diferença entre T1/2 e T3/4, demonstrando que, independente do tamanho do tumor, o 5mC permanece em maior atividade que o 5hmC.<sup>40, 41</sup>

O grau de malignização tumoral auxilia a predição diagnóstica do CECL. Ele se baseia nas alterações das características morfológicas e moleculares da região frontal invasiva dos carcinomas, o que é capaz de refletir no prognóstico do paciente melhor que em qualquer outra área analisada. Em nosso estudo, tanto o grupo de tumores que apresentaram alto grau de malignidade quanto os de baixo grau mantiveram a expressão do 5mC elevada, diferente do 5hmC que teve menor expressão, mostrando que a expressão do 5mC independe do grau de malignidade apresentada.<sup>42, 43</sup>

Os fatores de risco para cânceres de cabeça e pescoço podem estar associados à invasão perineural, uma interação complexa entre o câncer e o microambiente. Esse

processo é influenciado tanto pelo câncer quanto pelo hospedeiro, resultando em vantagens migratórias e de crescimento para ambos na interface entre lesão e nervo. A relação entre a exposição à radiação ionizante, álcool e tabaco está diretamente ligada a alterações epigenéticas. Diversos estudos sugerem a regulação das alterações epigenéticas para inibir a invasão, o que contrasta diretamente com os resultados das análises que conduzimos em CECL. Nelas, notamos que a imunoeexpressão acentuada de 5mC é observada tanto em lesões com invasão, quanto em lesões sem invasão perineural, sugerindo que não existe relação entre a expressão desse evento epigenético específico e a infiltração perineural.<sup>45, 46, 47</sup>

A invasão vascular não costuma ser vista no CECL. Em nossa pesquisa, ela correspondeu a 11% da amostra total de CECL. Seu desenvolvimento depende da progressão e do tamanho da lesão, acometendo com maior frequência lesões que medem acima de 2 cm além de ser associada à invasão neural e muscular.<sup>47</sup> Não foi possível observar diferença estatística na relação de expressão de 5mC e 5hmC no grupo com invasão, porém foi observado nas lesões que não tiveram invasão vascular, o que pode ser justificado pelo menor número de lesões com invasão vascular em contraste com a maiores de lesões sem invasão.

Concluimos que há expressão de 5mC e 5hmC na QA e em CECL. O 5mC parece estar relacionado ao CECL, ainda sendo necessário a realização de mais estudos para avaliar a viabilidade da sua utilização como biomarcador preditivo de CECL, na preservação das lesões de QA.

## REFERÊNCIAS

1. Kerawala, C., Roques, T., Jeannon, J.-P., Bisase, B., 2016. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J. Laryngol. Otol.* 130, S83–S89. <https://doi.org/10.1017/S0022215116000499>
2. Aupérin, A., 2020. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Current Opinion in Oncology* 32, 178–186. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000629>
3. Louredo, Bv., Vargas, Pa., Pérez-de-Oliveira, Me., Lopes, Ma., KowaTLski, Lp., Curado, Mp., 2022. Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. *Med Oral* e274–e284. <https://doi.org/10.4317/medoral.25147>

4. Silva, L.V.D.O., De Arruda, J.A.A., Abreu, L.G., Ferreira, R.C., Da Silva, L.P., Pelissari, C., Silva, R.N.F., Nóbrega, K.H.S., De Andrade, B.A.B., Romañach, M.J., Agostini, M., Nonaka, C.F.W., Alves, P.M., Pontes, H.A.R., Rivero, L.F., De Souza, L.B., Trierveiler, M., Mendonça, E.F., Gomes, A.P.N., Martins, M.D., Andrade, E.S.D.S., Da Silveira, M.M.F., Sobral, A.P.V., Mesquita, R.A., 2020. Demographic and Clinicopathologic Features of Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma: a Brazilian Multicentre Study. *Head and Neck Pathol* 14, 899–908. <https://doi.org/10.1007/s12105-020-01142-2>
5. Miranda-Filho, A., Bray, F., 2020. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncology* 102, 104551. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.104551>
6. Han, A.Y., Kuan, E.C., Mallen-St Clair, J., Alonso, J.E., Arshi, A., St John, M.A., 2016. Epidemiology of Squamous Cell Carcinoma of the Lip in the United States: A Population-Based Cohort Analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 142, 1216. <https://doi.org/10.1001/jamaoto.2016.3455>
7. Kornevs, E., Skagers, A., Tars, J., Bigestans, A., Lauskis, G., Libermanis, O., 2005. 5 year of experience with lower lip cancer. *Stomatologija* 7, 95–98.
8. Louredo, Bv., Vargas, Pa., Pérez-de-Oliveira, Me., Lopes, Ma., KowaTLski, Lp., Curado, Mp., 2022. Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. *Med Oral* e274–e284. <https://doi.org/10.4317/medoral.25147>
9. Rodríguez-Blanco, I., Flórez, , Paredes-Suárez, C., Rodríguez-Lojo, R., González-Vilas, D., Ramírez-Santos, A., Paradela, S., Conde, I., Pereiro-Ferreirós, M., 2018. Actinic Cheilitis Prevalence and Risk Factors: A Cross-sectional, Multicentre Study in a Population Aged 45 Years and Over in North-west Spain. *Acta Derm Venerol* 98, 970–974. <https://doi.org/10.2340/00015555-3014>
10. Faria, M.H.D., Silva, L.M.A.C., Mafra, R.P., Santos, M.M.D., Soares, S.C.M., Moura, J.M.B.D.O., 2022. Actinic cheilitis in rural workers: prevalence and associated factors. *einstein (São Paulo)* 20, eAO6862. [https://doi.org/10.31744/einstein\\_journal/2022AO6862](https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2022AO6862)

11. Sinha, R.P., Häder, D.-P., 2002. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1, 225–236. <https://doi.org/10.1039/b201230h>
12. Mello, F., Melo, G., Modolo, F., Rivero, E., 2019. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. *J Clin Exp Dent* 0–0. <https://doi.org/10.4317/jced.55133>
13. Rodriguez-Archilla, A., Irfan-Bhatti, A., 2021. Risk factors for actinic cheilitis: A meta-analysis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 15, 285–289. <https://doi.org/10.34172/joddd.2021.047>
14. Dancyger A, Heard V, Huang B, Suley C, Tang D, Ariyawardana A. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. *J Invest Clin Dent*. novembro de 2018;9(4):e12343.
15. Boothman, D.A., Meyers, M., Odegaard, E., Wang, M., 1996. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 358, 143–153. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(96\)00115-7](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(96)00115-7)
16. Fathima, T., Arumugam, P., Girija As, S., Priyadharsini, J.V., 2020. Decoding the Genetic Alterations in Genes of DNMT Family (DNA Methyl-Transferase) and their Association with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 21, 3605–3612. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.12.3605>
17. Robertson, K.D., 2000. Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a, and 3b during the G0/G1 to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Research* 28, 2108–2113. <https://doi.org/10.1093/nar/28.10.2108>
18. Oakes, C.C., Seifert, M., Assenov, Y., Gu, L., Przekopowicz, M., Ruppert, A.S., Wang, Q., Imbusch, C.D., Serva, A., Koser, S.D., Brocks, D., Lipka, D.B., Bogatyrova, O., Weichenhan, D., Brors, B., Rassenti, L., Kipps, T.J., Mertens, D., Zapatka, M., Lichter, P., Döhner, H., Küppers, R., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Byrd, J.C., Plass, C., 2016. DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 48, 253–264. <https://doi.org/10.1038/ng.3488>



19. Baylin, S.B., Jones, P.A., 2016. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a019505. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
20. Portela, A., Esteller, M., 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 28, 1057–1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
21. Goll, M.G., Bestor, T.H., 2005. EUKARYOTIC CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 481–514. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721>
22. Meissner, A., 2010. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 28, 1079–1088. <https://doi.org/10.1038/nbt.1684>
23. Y., Zon, L.I., Mihm, M.C., Kaiser, U.B., Schatton, T., Woda, B.A., Murphy, G.F., Shi, Y.G., 2012. Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma. *Cell* 150, 1135–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.033>
24. Song, C.-X., He, C., 2011. The hunt for 5-hydroxymethylcytosine: the sixth base. *Epigenomics* 3, 521–523. <https://doi.org/10.2217/epi.11.74>
25. Jiang, D., Wang, Y., Chang, G., Duan, Q., You, L., Sun, M., Hu, C., Gao, L., Wu, S., Tao, H., Lu, K., Zhang, D., 2019. DNA hydroxymethylation combined with carotid plaques as a novel biomarker for coronary atherosclerosis. *Aging* 11, 3170–3181. <https://doi.org/10.18632/aging.101972>
26. Kohli, R.M., Zhang, Y., 2013. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472–479. <https://doi.org/10.1038/nature12750>
27. Chen, Z., Shi, X., Guo, L., Li, Y., Luo, M., He, J., 2017. Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels correlate with cancer progression and poor survival: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8, 1944–1952. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13719>
28. Babu, G., Ravikumar, R., Rafi, M., Nair, L., Nazeer, F., Thomas, S., George, P., Kainickal, C., 2022. Treatment outcomes of squamous cell carcinoma of the lip: A retrospective study. *Oncol Lett* 25, 8. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13594>
29. Varela-Centelles, P., Gonzalez-Moles, M.Á., Seoane-Romero, J., Leira-Feijoo, Y., Takkouche, B., Seoane-Romero, J.M., 2022.

- Immunohistochemical analysis of epithelium adjacent to lip cancer: A meta-analysis. *Oral Diseases* 28, 57–65. <https://doi.org/10.1111/odi.13643>
30. Kriaucionis, S., Heintz, N., 2009. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. *Science* 324, 929–930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
  31. Bryne, M., 2008. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Diseases* 4, 70–77. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.1998.tb00260.x>
  32. Dantas, T.S., Barros Silva, P.G.D., Lima Verde, M.E.Q., Ribeiro Junior, A.D.L., Cunha, M.D.P.S.S., Mota, M.R.L., Alves, A.P.N.N., Leitão, R.F.D.C., Sousa, F.B., 2019. Role of Inflammatory Markers in Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 20, 3635–3642. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.12.3635>
  33. Münzel, M., Globisch, D., Brückl, T., Wagner, M., Welzmler, V., Michalakis, S., Müller, M., Biel, M., Carell, T., 2010. Quantification of the Sixth DNA Base Hydroxymethylcytosine in the Brain. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 5375–5377. <https://doi.org/10.1002/anie.201002033>
  34. Bianco, B.C., Scotti, F.M., Vieira, D.S.C., Biz, M.T., Castro, R.G., Modolo, F., 2015. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, myofibroblasts, and Ki-67 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Int. J. Exp. Pathol.* 96, 311–318. <https://doi.org/10.1111/iep.12140>
  35. Jäwert, F., Hasséus, B., Kjeller, G., Magnusson, B., Sand, L., Larsson, L., 2013. Loss of 5-hydroxymethylcytosine and TET2 in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 33, 4325–4328.
  36. Lian, C.G., Xu, Y., Ceol, C., Wu, F., Larson, A., Dresser, K., Xu, W., Tan, L., Hu, Y., Zhan, Q., Lee, C., Hu, D., Lian, B.Q., Kleffel, S., Yang, Y., Neiswender, J., Khorasani, A.J., Fang, R., Lezcano, C., Duncan, L.M., Scolyer, R.A., Thompson, J.F., Kakavand, H., Houvras, Y., Zon, L.I., Mihm, M.C., Kaiser, U.B., Schatton, T., Woda, B.A., Murphy, G.F., Shi, Y.G., 2012. Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma. *Cell* 150, 1135–1146. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.033>

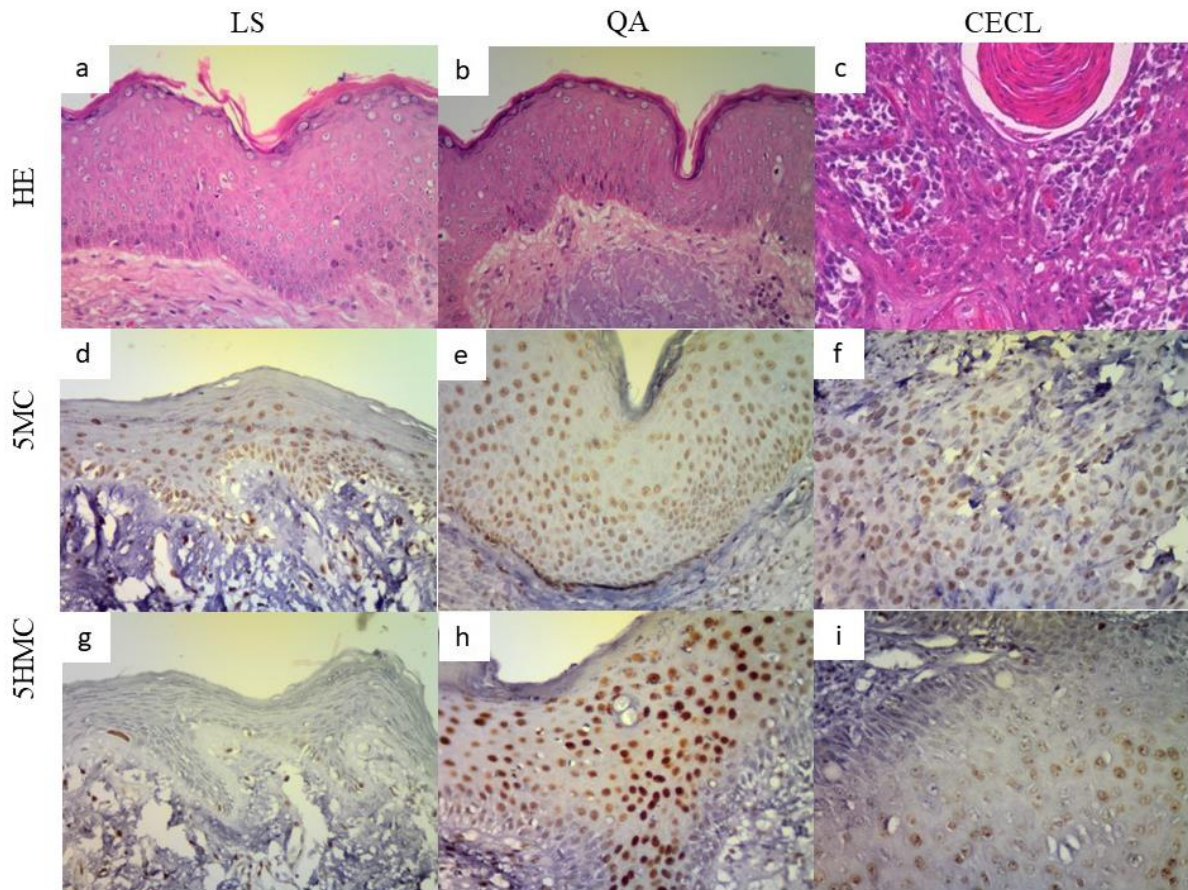
37. Jin, S.-G., Wu, X., Li, A.X., Pfeifer, G.P., 2011. Genomic mapping of 5-hydroxymethylcytosine in the human brain. *Nucleic Acids Research* 39, 5015–5024. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr120>
38. Wang, Z., Du, M., Yuan, Q., Guo, Y., Hutchinson, J.N., Su, L., Zheng, Y., Wang, J., Mucci, L.A., Lin, X., Hou, L., Christiani, D.C., 2020. Epigenomic analysis of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) reveals novel DNA methylation markers for lung cancers. *Neoplasia* 22, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.01.001>
39. Liu, C., Liu, L., Chen, X., Shen, J., Shan, J., Xu, Y., Yang, Z., Wu, L., Xia, F., Bie, P., Cui, Y., Bian, X., Qian, C., 2013. A decrease of 5-Hydroxymethylcytosine Is Associated with Progression of Hepatocellular Carcinoma through Downregulation of TET1. *PLoS ONE* 8, e62828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062828>
40. Bachman, M., Uribe-Lewis, S., Yang, X., Williams, M., Murrell, A., Balasubramanian, S., 2014. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature Chem* 6, 1049–1055. <https://doi.org/10.1038/nchem.2064>
41. Cuevas-Nunez, M.C., Gomes, C.B.F., Woo, S.-B., Ramsey, M.R., Chen, X.L., Xu, S., Xu, T., Zhan, Q., Murphy, G.F., Lian, C.G., 2018. Biological significance of 5-hydroxymethylcytosine in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 125, 59-73.e2. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.06.006>
42. Ginno, P.A., Gaidatzis, D., Feldmann, A., Hoerner, L., Imanci, D., Burger, L., Zilbermann, F., Peters, A.H.F.M., Edenhofer, F., Smallwood, S.A., Krebs, A.R., Schübeler, D., 2020. A genome-scale map of DNA methylation turnover identifies site-specific dependencies of DNMT and TET activity. *Nat Commun* 11, 2680. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16354-x>
43. Akhter, M., Hossain, S., Rahman, Q., Molla, M., 2011. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol* 15, 168. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.84485>
44. Baumeister, P., Welz, C., Jacobi, C., Reiter, M., 2018. Is Perineural Invasion of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Linked to Tobacco Consumption?

- Otolaryngol.--head neck surg. 158, 878–881.  
<https://doi.org/10.1177/0194599817750354>
45. Bakst, R., Wong, R., 2016. Mechanisms of Perineural Invasion. *J Neurol Surg B* 77, 096–106. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571835>
46. Hurník, P., Chyra, Z., Ševčíková, T., Štembírek, J., Trtková, K.S., Gaykalova, D.A., Buchtová, M., Hrubá, E., 2022. Epigenetic Regulations of Perineural Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front. Genet.* 13, 848557. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.848557>
47. Abreu, M.A.M.M., Pimentel, D.R.N., Silva, O.M.P., Blachman, I.T., Michalany, N.S., Hirata, C.H., Weckx, L.L.M., Alchorne, M.M.A., 2004. Carcinoma espinocelular do lábio: avaliação de fatores prognósticos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 70, 765–770. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992004000600010>

## FIGURAS

**Figura 1** . Perfil histológico e imunohistoquímico de TLSs, QAs, e CECLS.

Microfotografias ilustrativas. TLSs= Margem de ressecção cirúrgica correspondente a um lábio sadio; QA= Queilite actínica e CECLS= front de invasão de carcinoma de células escamosas de lábio. Coloração H&E (A,B e C) (200x). Imunohistoquímica para 5mC (D, E, e F) (200x). Imunohistoquímica para 5hmC (G, H e I) (200x).



## TABELAS

**Tabela 1:** Imunoexpressão de 5mC e 5hmC nos grupos TLS, QA e CECL.

	Marcador		p-Valor
	5hmC	5mC	
<b>Total da amostra</b>			
TLS (n=15)	58.79±28.49	85.45±15.68	0,074
QA (n=30)	74.00±16.42	84.52±23.45	0,063
CECL (n=45)	64.24±20.30	91.97±5.65	<b>&lt;0,001</b>
<b>p-Valor</b>	0,191	0,843	

**Tabela 2:** Gradação de displasia em relação a imunexpressão de 5mC e 5hmC nas amostras de QA.

	Marcador		p-Valor
	5hmC	5mC	
<b>Displasia gradação</b>			
Baixo risco (n=19)	71.42±16.92	85.03±26.10	<b>0,041</b>
Alto risco (n=11)	81.73±13.85	83.43±18.51	0,465
<b>p-Valor</b>	0,146	0,693	

**Tabela 3:** Imunoexpressão para 5mC e 5hmC, estadiamento e grau de recidiva das lesões de CECL.

	Marcador		p-Valor
	5hmC	5mC	
<b>T</b>			
T1/2 (n=30)	58.74±22.55	92.87±5.27	<b>0,005</b>
T3/4 (n=15)	66.08±22.46	92.52±5.08	<b>0,043</b>
<b>p-Valor</b>	0,713	0,624	
<b>N</b>			
N0 (n=39)	69.38±18.19	90.91±5.42	<b>0,008</b>
N+ (n=6)	53.19±27.89	95.53±2.88	<b>0,028</b>
<b>p-Valor</b>	0,233	0,099	
<b>M</b>			
M0 (n=42)	61.07±18.34	91.75±5.84	0,201
M1 (n=3)	47.15±29.33	93.56±4.44	0,109
<b>p-Valor</b>	0,398	0,735	
<b>recidiva</b>			
Não (n=42)	66.02±18.89	91.58±5.76	0,502
Sim (n=3)	45.83±29.88	96.04±0.91	0,109
<b>p-Valor</b>	0,765	0,208	



**Tabela 4:** Associação dos aspectos clinicopatológicos e a imunexpressão de 5mC e 5hmC nas amostras de CECL.

	Marcador		p-Valor
	5hmC	5mC	
<b>Sexo</b>			
Feminino (n=11)	61.78±15.39	91.62±7.18	<b>0,003</b>
Masculino (n=34)	64.99±21.80	92.10±5.15	<b>&lt;0,001</b>
<b>p-Valor</b>	0,269	0,553	
<b>Idade</b>			
Até 65 (n=24)	62.99±20.72	93.03±4.46	<b>&lt;0,001</b>
>65 (n=21)	65.63±20.40	90.92±6.59	<b>&lt;0,001</b>
<b>p-Valor</b>	0,690	0,814	
<b>Grau histológico</b>			
Baixo (n=28)	62.17±17.84	92.77±5.02	<b>&lt;0,001</b>
Alto (n=17)	65.18±23.56	89.77±6.41	<b>0,006</b>
<b>p-Valor</b>	0,765	0,208	
<b>Invasão vascular</b>			
Não (n=40)	64.56±18.47	92.12±5.24	<b>&lt;0,001</b>
Sim (n=5)	53.84±29.36	89.28±8.35	0,068
<b>p-Valor</b>	0,348	0,440	
<b>Invasão perineural</b>			
Não (n=33)	63.18±18.58	92.25±5.28	<b>&lt;0,001</b>
Sim (n=12)	63.47±23.97	90.50±6.58	<b>0,015</b>
<b>p-Valor</b>	0,968	0,571	

## **6. CONCLUSÃO GERAL**

O presente estudo fornece evidências de que há expressão de 5mC e 5hmC em tecido maligno de QA, na QA e em CECL. A partir da relação do 5mC com imunoeexpressão de 5mC pode ser utilizada como um biomarcador preditivo em lesões de QA e CECL

1. A utilização de biomarcadores preditivo em lesões potencialmente malignas e malignas em um cotidiano clínico é determinante para preservação;
2. Nas lesões de CECLS observou-se a relação entre o aumento de 5mC em relação ao 5hmC.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABREU, M. A. M. M. et al. Carcinoma espinocelular do lábio: avaliação de fatores prognósticos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 70, n. 6, p. 765–770, dez. 2004.
- ARNAUD, R. R. et al. Queilite actínica: avaliação histopatológica de 44 casos. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 43, n. 6, p. 384–389, dez. 2014.
- BACHMAN, M. et al. 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nature Chemistry*, v. 6, n. 12, p. 1049–1055, dez. 2014.
- BINKLEY, N. et al. Assay Variation Confounds the Diagnosis of Hypovitaminosis D: A Call for Standardization. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, n. 7, p. 3152–3157, Jul. 2004.
- BIAGLOW, J. E. The effects of ionizing radiation on mammalian cells. *Journal of Chemical Education*, v. 58, n. 2, p. 144, fev. 1981.
- BOTA, J. P.; LYONS, A. B.; CARROLL, B. T. Squamous Cell Carcinoma of the Lip—A Review of Squamous Cell Carcinogenesis of the Mucosal and Cutaneous Junction. *Dermatologic Surgery*, v. 43, n. 4, p. 494–506, abr. 2017.
- CHOQUET, H. et al. Genetic and environmental factors underlying keratinocyte carcinoma risk. *JCI Insight*, v. 5, n. 10, p. e134783, 21 maio 2020.
- COSTA, F. B.; WEBER, M. B. Avaliação dos hábitos de exposição ao sol e de fotoproteção dos universitários da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 79, n. 2, p. 149–155, abr. 2004.
- CURRY, J. M. et al. Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Seminars in Oncology*, v. 41, n. 2, p. 217–234, abr. 2014.
- DAHL, C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. *Clinica Chimica Acta*, v. 412, n. 11–12, p. 831–836, maio 2011.
- DANCYGER, A. et al. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, v. 9, n. 4, p. e12343, nov. 2018.
- DE SANTANA SARMENTO, D. J. et al. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. *International Journal of Dermatology*, v. 53, n. 4, p. 466–472, abr. 2014.

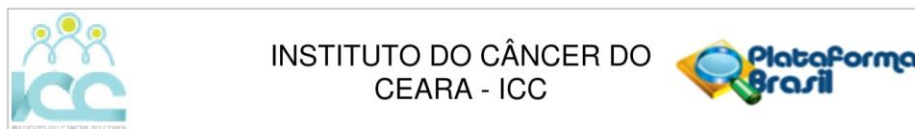
- DE SOUZA LUCENA, E. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers: Actinic cheilitis in beach workers. *Oral Diseases*, v. 18, n. 6, p. 575–579, set. 2012.
- DROUIN, R.; THERRIEN, J.-P. UVB-induced Cyclobutane Pyrimidine Dimer Frequency Correlates with Skin Cancer Mutational Hotspots in p53. *Photochemistry and Photobiology*, v. 66, n. 5, p. 719–726, nov. 1997.
- HERMANN, A.; GOYAL, R.; JELTSCH, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase Methylates DNA Processively with High Preference for Hemimethylated Target Sites. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 46, p. 48350–48359, nov. 2004.
- ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, v. 466, n. 7310, p. 1129–1133, ago. 2010.
- KAUGARS, G. E. et al. Actinic cheilitis: A review of 152 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 88, n. 2, p. 181–186, ago. 1999.
- KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*, v. 42, n. 10, p. 987–993, nov. 2006.
- MORGAN, H. D. et al. Activation-induced Cytidine Deaminase Deaminates 5-Methylcytosine in DNA and Is Expressed in Pluripotent Tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 50, p. 52353–52360, dez. 2004.
- MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Diseases*, v. 10, n. 4, p. 212–216, jul. 2004.
- MARTINEZ-FERNANDEZ, L. et al. UV-induced damage to DNA: effect of cytosine methylation on pyrimidine dimerization. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 2, n. 1, p. 17021, 9 jun. 2017.
- NEVILLE BW et al. Patologia epitelial. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE, editors. *Patologia oral e maxilofacial*. 3 rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 363-453, 2009.
- NICOLAU, S. G.; BAELUS, L. CHRONIC ACTINIC CHEILITIS AND CANCER OF THE LOWER LIP. *The British Journal of Dermatology*, v. 76, p. 278–289, jun. 1964.

- OKANO, M. et al. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, v. 99, n. 3, p. 247–257, out. 1999.
- OLIVEIRA, N. F. P. D. et al. Metilação de DNA e Câncer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 56, n. 4, p. 493–499, 31 dez. 2010.
- RAZIN, A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing---a three-way connection. *The EMBO Journal*, v. 17, n. 17, p. 4905–4908, 1 set. 1998.
- RODRÍGUEZ-PAREDES, M. et al. Methylation profiling identifies two subclasses of squamous cell carcinoma related to distinct cells of origin. *Nature Communications*, v. 9, n. 1, p. 577, 8 fev. 2018.
- SANTOS, M. D. O. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, 6 fev. 2023.
- SANTOS, R. F. D. et al. Prevalence of and Factors Associated with Actinic Cheilitis in Extractive Mining Workers. *Brazilian Dental Journal*, v. 29, n. 2, p. 214–221, mar. 2018.
- SENAT FEDERAL (Brasil). Lei nº 10.406, de 10 de janeiro de 2002. Institui o Código Civil. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2002/110406.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2002/110406.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- SENAT FEDERAL (Brasil). Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/18078.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/18078.htm)>. Acesso em: 12 abr. 2023.
- STRIEDER, L. et al. Comparative analysis of three histologic grading methods for squamous cell carcinoma of the lip. *Oral Diseases*, v. 23, n. 1, p. 120–125, jan. 2017.
- SUNG, W.-W. et al. Favorable Lip and Oral Cancer Mortality-to-Incidence Ratios in Countries with High Human Development Index and Expenditures on Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 18, n. 11, p. 6012, 3 jun. 2021.
- TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science*, v. 324, n. 5929, p. 930–935, 15 maio 2009.

- WARNACK, E. M. H. B. et al. Methylation in Health, Disease, and Development. *Nature*, v. 402, n. 6758, p. 215–216, nov. 1999.
- WARNACKULASURIYA, S.; JOHNSON, NEWELL. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa: Potentially malignant disorders. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 36, n. 10, p. 575–580, 26 Jul. 2007.
- ZITSCH, R. P. et al. Outcome Analysis for Lip Carcinoma. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, v. 113, n. 5, p. 589–596, nov. 1995.
- YOU, Y.-H.; PFEIFER, G. P. Similarities in sunlight-induced mutational spectra of CpG-methylated transgenes and the p53 gene in skin cancer point to an important role of 5-methylcytosine residues in solar UV mutagenesis<sup>11</sup>Edited by J. Miller. *Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 389–399, jan. 2001.

## 8. ANEXOS

### Anexo I- Parecer do comitê de ética. -



INSTITUTO DO CÂNCER DO  
CEARA - ICC

Plataforma  
Brasil

#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Influência da imuno-expressão de proteínas de reparo do DNA no prognóstico e sobrevida de pacientes com câncer de boca e de orofaringe

**Pesquisador:** Paulo Góberlânio de Barros Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 70596317.6.0000.5528

**Instituição Proponente:** Instituto do Cancer do Ceara

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.191.839

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional de corte transversal, no qual serão selecionados os dados de 100 pacientes que se submeteram, no período de 01 de janeiro de 2008 a 31 de dezembro de 2014, à cirurgia de ressecção de carcinomas de células escamosas em região de boca e orofaringe sem tratamentos neoadjuvantes, no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC),

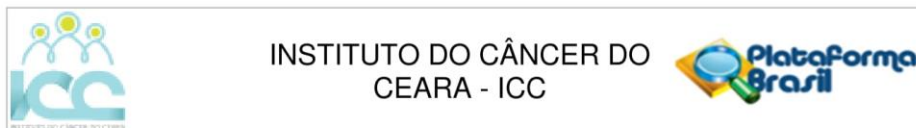
##### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência da imuno-expressão das proteínas do reparo de DNA (imuno-marcação para MSH2,MSH6, MLH1, PMS2, PCNA e RFC) , bem como p16 e Ki67 no prognóstico e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca e orofaringe diagnosticados e tratados em uma instituição terciária de referência estadual

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Há benefícios com o conhecimento científico adquirido, haja visto que o prognóstico do câncer de boca e de orofaringe são significativamente distintos o que se deve provavelmente aos seus diferentes comportamentos biológicos.Os riscos são os pertinentes ao manuseio de prontuários e informações que devem ser resguardadas.

**Endereço:** PAPI JÚNIOR, 1222  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.430-230  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@icc.org.br



Continuação do Parecer: 2.191.839

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sem comentários

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos presentes e adequados

**Recomendações:**

Adequar no texto divergências quando referido pacientes diagnosticados e tratados no HHJ, sendo um critério de exclusão a presença de neoadjuvância

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem comentários.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado aprova o Projeto de Pesquisa, mas com a recomendação de Adequar no texto divergências quando referido pacientes diagnosticados e tratados no HHJ, sendo um critério de exclusão a presença de neoadjuvância

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_920771.pdf	01/07/2017 21:40:26		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	01/07/2017 21:39:26	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fieldepositario.pdf	01/07/2017 21:36:40	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	01/07/2017 21:35:15	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	01/07/2017 21:34:00	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito

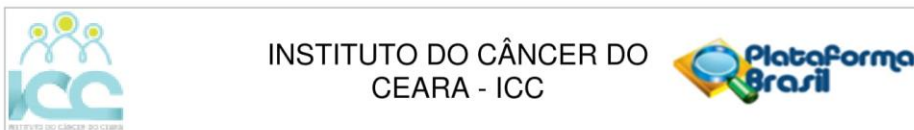
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222  
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230  
 UF: CE Município: FORTALEZA  
 Telefone: (85)3288-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: eco@icc.org.br





Continuação do Parecer: 2.191.839

Não

FORTALEZA, 28 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Marcelo Gurgel Carlos da Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** PAPI JÚNIOR, 1222  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.430-230  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@icc.org.br