

LUIZ FERNANDO BARBOSA DE PAULO

Avaliação da expressão gênica e proteica da via de sinalização Wnt/ β -catenina em amostras de leucoplasia bucal e sua relação com fatores prognósticos com ênfase na transformação maligna.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do Título de Doutor em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

UBERLÂNDIA, 2016

LUIZ FERNANDO BARBOSA DE PAULO

Avaliação da expressão gênica e proteica da via de sinalização Wnt/ β -catenina em amostras de leucoplasia bucal e sua relação com fatores prognósticos com ênfase na transformação maligna.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do Título de Doutor em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Banca Examinadora

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Profa. Dra. Flaviana Soares Rocha

Prof. Dr. Sergio Vitorino Cardoso

Profa. Dra. Carla Silva Siqueira

Profa. Dra. Mirna Scalon Cordeiro

UBERLÂNDIA, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- P331a
2016 Paulo, Luiz Fernando Barbosa de, 1988
Avaliação da expressão gênica e proteica da via de sinalização WNT/B-catenina em amostras de leucoplasia bucal e sua relação com fatores prognósticos com ênfase na transformação maligna / Luiz Fernando Barbosa de Paulo. - 2016.
99 f. : il.
- Orientador: Adriano Mota Loyola.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Leucoplasia bucal - Teses. 3. Mucosa bucal - Doenças - Teses. I. Loyola, Adriano Mota. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Dedicatória

Dedico este trabalho a...

Meu pai Ronan e minha mãe Leila que se sacrificaram muitas vezes
para possibilitar esta conquista.

Agradecimentos

O primeiro e mais importante agradecimento vai ao Prof. Adriano Loyola que além da oportunidade a mim oferecida, abriu as portas de sua casa e junto com sua família me acolheram tão bem. Obrigado pelas orientações, ensinamentos e principalmente pela paciência e respeito às minhas decisões.

Agradeço aos professores Sergio Vitorino Cardoso, Paulo Rogério de Faria e aos colegas do Departamento de Patologia Bucal pelo excelente convívio e importante colaboração para o desenvolvimento deste trabalho. Um agradecimento especial à colega Flávia Sayuri Matsuo pelas orientações e por se fazer sempre disposta a ajudar, sem sua ajuda não teria sido possível.

Agradeço também a todos os funcionários do Hospital Odontológico, Laboratório de Patologia Bucal e Laboratório de Imunologia pelos esforços e empenho dedicados à execução deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer ao meu orientador do mestrado, Prof. Antônio Francisco Durighetto Jr. pelas orientações, conselhos e principalmente pela formação humana e dedicação aos pacientes.

Finalmente, agradeço a todos os que me disseram que não era possível o que almejava. Com dedicação e força de vontade faz-se o que quiser.

Sumário

Resumo - - - - -	6
Abstract - - - - -	7
1 Introdução: - - - - -	8
2 Proposição - - - - -	28
3 Material e Método - - - - -	30
4 Resultados - - - - -	41
5 Discussão - - - - -	64
6 Conclusão - - - - -	76
Referências - - - - -	78
Anexos - - - - -	94

Resumo

A leucoplasia bucal (LB) é a principal lesão cancerizável da cavidade oral. O diagnóstico deve ser confirmado pelos achados histológicos, para excluir qualquer outra alteração da mucosa bucal e verificar sinais de malignidade, além da gradação da displasia epitelial. A via de sinalização WNT/ β -catenina compõe a regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos em diferentes espécies, com um papel decisivo no desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celular. Alterações em componentes desta via também já foram descritos nas neoplasias da cavidade oral e desordens cancerizáveis da mucosa oral. O objetivo deste trabalho foi identificar o padrão de transcrição de genes (expressão funcional) pertencentes à via de sinalização WNT/ β -catenina e sua relação com os respectivos produtos gênicos em uma amostra tecidual de LB, bem como sua relação com fatores clínico-patológicos considerados marcadores de sua transformação maligna. Para tal, uma amostra de conveniência de LB foi selecionada dentre os pacientes atendidos no serviço de diagnóstico estomatológico (FOUFU) de 1994 a 2014. A avaliação de expressão gênica e proteica foram realizadas pelo método de qPCR e Imunohistoquímica respectivamente. A maior parte dos pacientes pertencia ao gênero masculino (53,8%) e apresentava idade mediana de 56 anos, variando de 34 a 93 anos. A maior parte dos pacientes era tabagista e o local de maior acometimento foi a mucosa de bochecha. Aproximadamente 75% dos pacientes apresentavam LBR e em seis casos foi evidenciada transformação maligna da lesão. Tamanho inicial da lesão foi um fator associado à um maior risco de transformação maligna. No geral, a expressão relativa de todos os genes, foi maior no grupo controle do que no grupo LB. Verificou-se a expressão mais elevada de proteína Wnt1, β -catenina, c-Myc, CiclinaD1 na mucosa normal do que no grupo de LB. Para GSK3 β , APC e E-caderina foi maior expressão no grupo LB do que no grupo de controle. A interrupção do tabagismo oferece melhor prognóstico ao paciente, refletindo numa melhora clínica e histológica das LB. Em conclusão, o presente estudo mostrou que uma redução na expressão de *CCNTB1*, *CDH1* e *APC* pode ser um evento crucial na progressão e transformação maligna das LB e que um aumento da expressão de *CCND1* na LAR pode ser considerado um fator de piora do prognóstico destas lesões.

Palavras-chave: Leucoplasia bucal, Carcinoma de células escamosas bucal, Transformação maligna, Displasia epitelial, WNT/ β -catenina.

Abstract

Oral leukoplakia (LB) is the main precancerous lesions of the oral cavity. The diagnosis must be confirmed by histological findings, to exclude any alteration of the oral mucosa and verify signs of malignancy, as well as gradations of epithelial dysplasia. The WNT/ β -catenin pathway comprise the regulation of a wide variety of physiological processes in different species, with a decisive role in embryonic development, cell proliferation and differentiation. Alterations in components of this pathway have also been reported in neoplasms of the oral cavity and precancerous disorders of oral mucosa. The objective of this study was to identify the pattern of gene transcription (functional expression) belonging to the signaling pathway WNT/ β -catenin and their relationship with their gene products in a tissue sample of LB and its relationship with clinicopathological factors considered markers of malignant transformation. For this purpose, a sample of LB was selected in patients treated at the oral diagnosis department (FOUFU) from 1994 to 2014. The evaluation of gene and protein expression were performed by qPCR and immunohistochemistry method respectively. Most patients belonged to males (53.8%) and had a median age of 56 years, ranging from 34-93 years. Most of the patients were smokers and the place most affected was the cheek. Approximately 75% of patients had LBR and in six cases was evidenced malignant transformation of the lesion. Initial lesion size was a factor associated with an increased risk of malignant transformation. Overall, the relative expression of all genes was higher in the control group than in the group LB. It was found higher protein expression of WNT 1, β -catenin, c-Myc, CiclinD1 in normal mucosa than in group LB. For GSK3 β , APC and E-cadherin was higher expression in the LB group than in the control group. The smoking cessation offers better prognosis for the patient, reflecting a clinical and histologic improvement of LB. In conclusion, the present study showed that a reduction in the expression of *CCNTB1*, *CDH1* and *APC* may be a critical event in the progression and malignant transformation of LB and increased *CCND1* expression in LAR can be considered a prognosis worsening factor of this disease.

Keywords: Oral leukoplakia, Squamous cell carcinoma, Malignant transformation, Epithelial dysplasia, WNT/ β -catenin pathway.

1-INTRODUÇÃO

1.1 Leucoplasia Oral

O carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) está entre os dez cânceres humanos mais comuns, representando 90% de todos os cânceres nessa região (INCA, 2016). Embora ainda indefinida, sua etiologia tem sido mais frequentemente atribuída ao tabagismo, alcoolismo e ao HPV (Warnakulasuriya et al., 2007). Parte de sua história natural está vinculada a presença de lesões cancerizáveis, em especial as leucoplasias como exemplificado na Figura 1 (Lapthanasupkul et al., 2007).

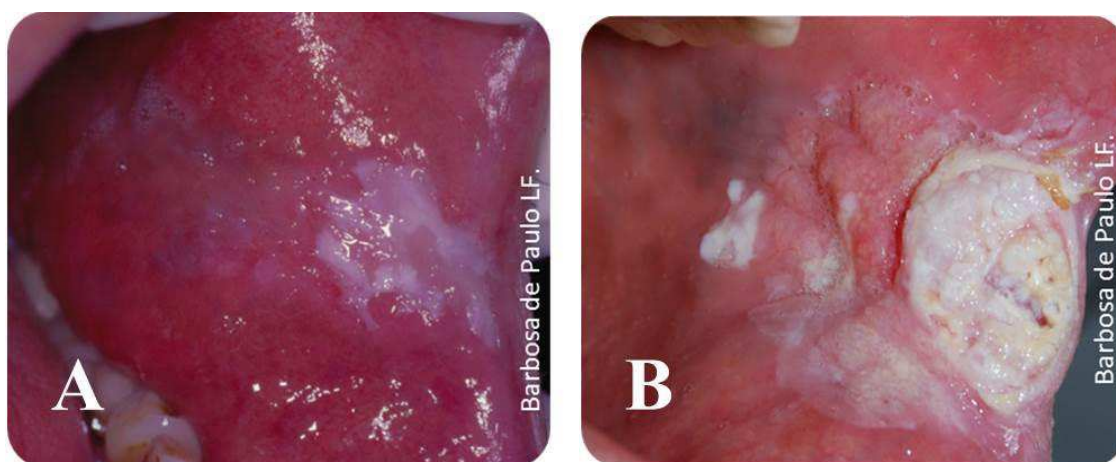


Figura 1 – Imagens clínicas de paciente diagnosticado com leucoplasia em mucosa de bochecha retrocomissural esquerda. O acompanhamento de oito anos revelou transformação maligna para carcinoma de células escamosas . Fonte: Fotos de acervo pessoal do CD Mestre Luiz Fernando Barbosa de Paulo.

Leucoplasia bucal (LB) tem sido considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em documento específico (Barnes et al., 2005), como parte do grupo de lesões epiteliais precursoras do câncer bucal (e de outras mucosas), sem merecer, na sua obra de referência, uma definição objetiva, como identificada nas séries anteriores a 2005 (WHO, 1978; Axell et al., 1984; Axell et al., 1994). Contudo, de acordo com um grupo de trabalho colaborador da OMS, coordenado pelo Prof. Warnakulasuriya, o termo leucoplasia tem sido utilizado para reconhecer lesões de mucosa expressas clinicamente com placas brancas, que possuem risco questionável de transformação maligna, excluídas aquelas outras doenças que não apresentam nenhum risco de malignização, não possuindo um quadro histopatológico diagnóstico. Portanto, Warnakulasuriya et al. (2007) definiram a LB como sendo uma placa branca de risco

questionável, tendo excluído outras doenças ou distúrbios conhecidos que não carregam risco aumentado para câncer. Acrescentam os autores que um diagnóstico provisório de leucoplasia é feito quando uma lesão predominantemente branca identificada clinicamente, não pode ser claramente diagnosticada como nenhuma outra doença ou desordem da mucosa bucal. Desta forma, a realização de biopsia é mandatória para avaliação dos aspectos histológicos que descartem outras possibilidades diagnósticas (Warnakulasuriya et al., 2007; Dionne et al., 2014). Completa os autores, que o diagnóstico definitivo é feito quando qualquer fator etiológico, exceto tabaco e nós de areca, seja excluído, e os achados histopatológicos tenham descartado outro tipo de doença (Warnakulasuriya et al., 2007; Van der Waal., 2009). Embora não estejam relacionadas a achados histopatológicos específicos, algumas LB mostram graus variados de displasia epitelial ou mesmo carcinoma in situ (Warnakulasuriya et al., 2007; Lapthanasupkul et al., 2007).

Clinicamente, as leucoplasia podem ser classificadas em homogêneas e não homogêneas (Figura 2). A primeira forma surge como uma placa levemente elevada, fina, de coloração branco-acinzentada, uniforme, podendo apresentar bordas bem definidas ou que se fundem gradualmente à mucosa normal adjacente. Já as lesões não homogêneas podem ser nodulares, verrucosas ou ainda com a presença de áreas eritroplásicas permeando as áreas brancacentas (Warnakulasuriya et al., 2007; Lapthanasupkul et al., 2007). O diagnóstico clínico das LB pode ainda ser auxiliado por ferramentas e procedimentos auxiliares que destacam características próprias das lesões, tais como autofluorescência, quimiluminescência ou mesmo a pigmentação por corantes vitais, tais como azul de toluidina e lugol (Dionne et al., 2014).

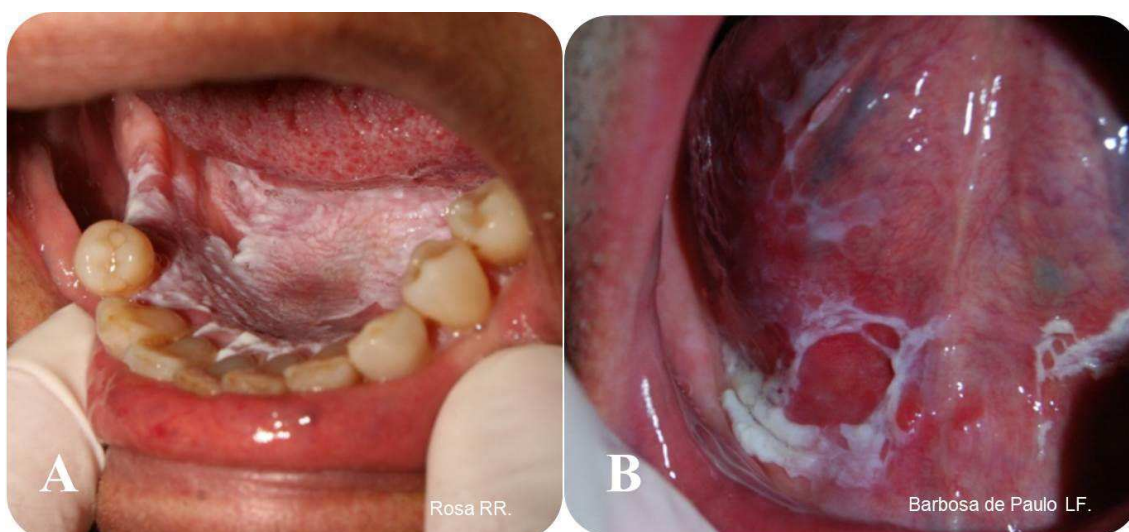


Figura 2 – Imagens de leucoplasias bucais. Em (A), nota-se lesão homogênea em assoalho bucal, com discreto pregueamento superficial, que não se traduz como verrucosidades ou fissuras. Em B pode-se notar outra lesão não homogênea em região lateral de ventre lingual e soalho bucal de bordos irregulares e áreas verrucosas. Fonte: Unidade de Diagnóstico Estomatológico (UDE) da Universidade Federal de Uberlândia.

A etiologia da LB tem sido considerada dentro do campo etiológico dos CCEB: álcool e tabaco, em especial o tabaco fumado, constituem-se os fatores mais frequentemente citados nesta relação, chegando a ser descrito em 80% de todos os casos. Todavia, casos associados ao uso do tabaco não fumado (tabaco mascado, por exemplo) têm sido também considerados. E mais, casos têm sido descritos que tanto CCEB quanto de LB podem desenvolver em pacientes sem aparente exposição a fatores causais conhecidos. Isto tem sido relatado especialmente em pacientes abaixo dos 40 anos de idade, para os quais a exposição ao HPV tem sido um fator relevante (Rodrigues et al., 2000; Ariyawardana et al., 2007; Van der Waal et al., 2010; Dionne et al., 2014). Outro aspecto importante na dinâmica da patogenia destas lesões é que a exposição ao tabaco tem sido associada ao aparecimento de displasia nestas lesões (Jaber, 2010). Não obstante, revisões críticas realizadas sobre a pertinência desta relação tem mostrado que não há segurança estatística em assumir definitivamente esta clássica presunção (Arduino et al., 2013).

A transformação maligna das LB para CCEB tem sido um fato bem documentado há anos. Alguns estudos ainda afirmam que 0,13% a 36,4% de todas

leucoplasias orais sofrem transformação maligna após um período de 1 a 11 anos (Lee et al., 2006). Em um estudo, Petti e Scully (2003) estimaram uma taxa de transformação maligna para a população em geral da ordem 5,56%. Diferenças em relação à amostra estudada, diferenças sócio-econômico-culturais entre as diversas populações estudadas, a localização das lesões, os desenhos de estudo utilizados e o tempo de acompanhamento dos pacientes são alguns dos fatores justificadores das variações dos índices de transformação encontrados (Arduino et al., 2013).

Têm sido relatados na literatura alguns fatores assumidos como classicamente relacionados à transformação maligna para as LB: sexo feminino, lesões de longa duração, incidência em pacientes não fumantes (ausência relativa de causa), lesões localizadas em língua e soalho bucal, dimensão acima de 200 mm², leucoplasias não homogêneas e a presença de displasia em diversos graus (Banoczy & Siba, 1976; Lee et al., 2000; Holmstrup et al., 2006; van der Waal, 2009; Arduino et al., 2013; Dionne et al., 2014; Warnakulasuriya & Ariyawardana, 2016).

Mais recentemente, as pesquisas têm sido direcionadas ao estudo das modificações que são implicadas na progressão das LB para CCEB e que, portanto, possam ter importância prognóstica para elas. Eventos genéticos e epigenéticos, vinculados às alterações morfológicas (atipias e displasias epiteliais) e da proliferação celular tem sido alvo de investigações com esta finalidade (Chattopadhyay et al., 2002; Ray et al., 2003; Fan et al., 2006; Chattopadhyay e Ray, 2008; Kuribayashi et al., 2009; Scully e Bagan, 2009). Encontrar marcadores que possam discernir entre casos que progredirão para câncer, poderão favorecer sobremaneira o prognóstico do paciente (Nasser et al., 2011; Lingen et al., 2011).

Alguns estudos avaliando a expressão suprabasal de p53, angiogênese, presença de tipos de HPV de alto risco, como o HPV 16, padrões de expressão imunoistoquímica de ciclina D1, β -catenina, p27 e p63 já foram realizados em lesões displásicas da cavidade oral. (Van der Wall, 2009; Lingen et al., 2011). Contudo, ainda não há um biomarcador ou uma gama de biomarcadores que possam ser utilizados para se estabelecer prognóstico mais preciso de lesões displásicas da mucosa bucal, levando à necessidade de novas pesquisas (Smith et al., 2009; Van der Waal, 2009).

Mais ainda, algumas evidências de maior frequência de transformação maligna em determinadas localizações, poderiam estar relacionadas a ocorrência de aneuploidias e perdas de heterozigosidade (Zhang et al., 2001a; Zhang et al., 2001b; Islam et al., 2010; Castagnola et al., 2011; Zhang et al., 2012). Todavia, tem sido aconselhado não considerar o *status* da ploidia de DNA como um único fator de predição para a transformação maligna das LB (Bremmer et al., 2011).

Parece mais consensual, muito embora sem isenção de críticas, o papel que tem assumido a identificação e avaliação da displasia epitelial como fator preditor de transformação maligna e prognóstico (Dionne et al., 2014; Warnakulasuriya & Ariyawandana, 2016). Alguns autores chegam a considerar a intensidade da displasia como um fator preditor “padrão ouro” (do inglês, *gold standard* predictor) (Warnakulasuriya et al., 2008; Mehenna et al., 2010; Warnakulasuriya et al., 2011, Dionne et al., 2014). A percepção de uma gradual progressão das alterações morfológicas em células individuais da camada basal em direção a superfície, e de arquitetura na configuração do tecido epitelial, tem embasado a formulação de gradações das displasias, com objetivo de identificar aí, alguma relevância na predição da transformação maligna (Mithani et al., 2007; Arduino et al., 2013).

Revisando a transformação maligna em LB, Warnakulasuriya & Ariyawandana (2016), realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de identificar os níveis de transformação maligna destas lesões, bem como os fatores que seriam significativamente implicados com estes fenômenos. Os autores encontraram uma taxa estimada de transformação maligna para a população estudada foi de 3,5%, em um espectro variando de 0,13% a 34,0%. A média de transformação maligna foi de 14,9%. Além disto, também evidenciou que a taxa anual média de transformação maligna foi de 3,8%, variando de 0,3% a 6,9%. Baseado nas observações recolhidas, os seguintes fatores foram determinantes neste processo: idade avançada, sexo feminino, LB maiores que 200mm², tipo homogêneo de LB, tipo eritroleucoplasia, e mais altos graus de displasia epitelial. Neste estudo, os autores realçaram alguns trabalhos relevantes nesta linha, relacionados a presença de displasias nas lesões biopsiadas e seu significado na transformação maligna, descritos sumariamente a seguir. Em estudo conduzido na Dinamarca, Shhepman et al. (1998) seguiram 166 pacientes diagnosticados em um intervalo de 21 anos, com um período de seguimento de aproximadamente dois anos.

Os autores observaram 20 pacientes (12,0%) desenvolveram carcinoma de células escamosas. A análise estatística univariada mostrou que mostrou risco aumentado de transformação maligna em mulheres não fumantes, com LB não homogêneas e com alto grau de displasia epitelial. Holmstrup et al. (2006) não observaram nenhuma relação entre transformação maligna e presença de displasia, independentemente do seu grau. Já Arduino et al. (2009), seguindo 207 casos de LB em pacientes italiano, por um período médio de 54 meses, concluíram que o risco de transformação maligna não parece ser previsível. Em sua amostra, todos os casos apresentavam algum grau de transformação maligna. Também Liu et al. (2012) observaram transformação em amostra de LB em Shangai em 17,8% dos pacientes. Entre os fatores associados ao alto risco de transformação maligna, os autores nomearam idade mais avançada, localização latero-ventral lingual, o tipo não homogêneo, e a presença de alto grau de displasia. Ho et al. (2012) observaram taxas de transformação maligna de 3% e 15% em uma amostra de 65 casos de LB apresentando algum grau de displasia. Nesta amostra, os autores observaram que a pior evolução foi observada para os casos com os mais altos graus de displasia.

Em função da subjetividade na identificação da displasia, em especial na sua gradação, qualidade da amostra estudada, representatividade do fragmento biopsiado em relação a toda a lesão, a busca pelo melhor caminho ainda tem sido uma constante na literatura (Barnes et al., 2005; Kujan et al., 2006). Várias tentativas de se definir o melhor critério para identificação e gradação da displasia epitelial em leucoplasia têm sido exploradas em trabalhos avulsos e por iniciativa da OMS (WHO, 1978; Pindborg et al., 1997; Warnakulasuriya et al., 2001; Kujan et al., 2006; Warnakulasuriya et al., 2007; Warnakulasuriya & Ariyawardana, 2016). Em 2005, a OMS (Barnes et al., 2005) delimitou critérios histopatológicos para melhor caracterizar a displasia em leucoplasias, considerando alterações histológicas importantes, que poderiam contribuir para um diagnóstico mais preciso. Essas alterações foram divididas em dois grupos: o primeiro, comportando os aspectos arquiteturais do epitélio (alteração na estratificação do epitélio, perda da polaridade de células basais, cones epiteliais “em forma de gota”, aumento do número de figuras mitóticas, disqueratose, pérolas de queratinas nos cones epiteliais); e um segundo grupo que agrega as alterações citológicas do epitélio (anisocariose, anisonucleose, pleomorfismo nuclear, anisocitose, pleomorfismo celular, aumento da dimensão nuclear, figuras mitóticas atípicas, aumento do número e da

dimensão dos nucléolos, hipercromatismo). O documento da OMS enfatiza que a displasia deve ter seu diagnóstico definido pela presença de características histológicas e citológicas específicas, podendo ser graduada em leve, moderada e intensa. Em geral, a displasia leve é caracterizada por uma alteração arquitetural limitada no terço inferior do revestimento epitelial, acompanhada por uma atipia citológica mínima. A displasia moderada estende-se para o terço médio do epitélio, apresentando um grau maior de atipia citológica. A displasia severa acomete dois terços do epitélio, mostrando uma considerável alteração arquitetural associada a uma grande atipia citológica. As alterações utilizadas para essa gradação estão compiladas na Tabela 1 e ilustradas na figura 3.

Tabela 1: Critérios morfocitológicos para gradação de displasia epitelial (OMS)

Alterações de Arquitetura	Alterações Citológicas
Perda de Polaridade da camada basal	Alteração do tamanho nuclear e celular
Projeções epiteliais em forma de gota	Pleomorfismo nuclear e celular
Aumento do número de mitoses	Aumento da proporção núcleo / citoplasma
Mitoses superficiais anormais	Núcleos aumentados de tamanho
Ceratinização celular prematura	Figuras de mitose atípicas
	Nucléolos numerosos e aumentados
	Hipercromatismo

Adaptação da Tabela 3.6 encontrada em Barnes et al. (2005), intitulada: “Critérios usados para o diagnóstico de displasia”.

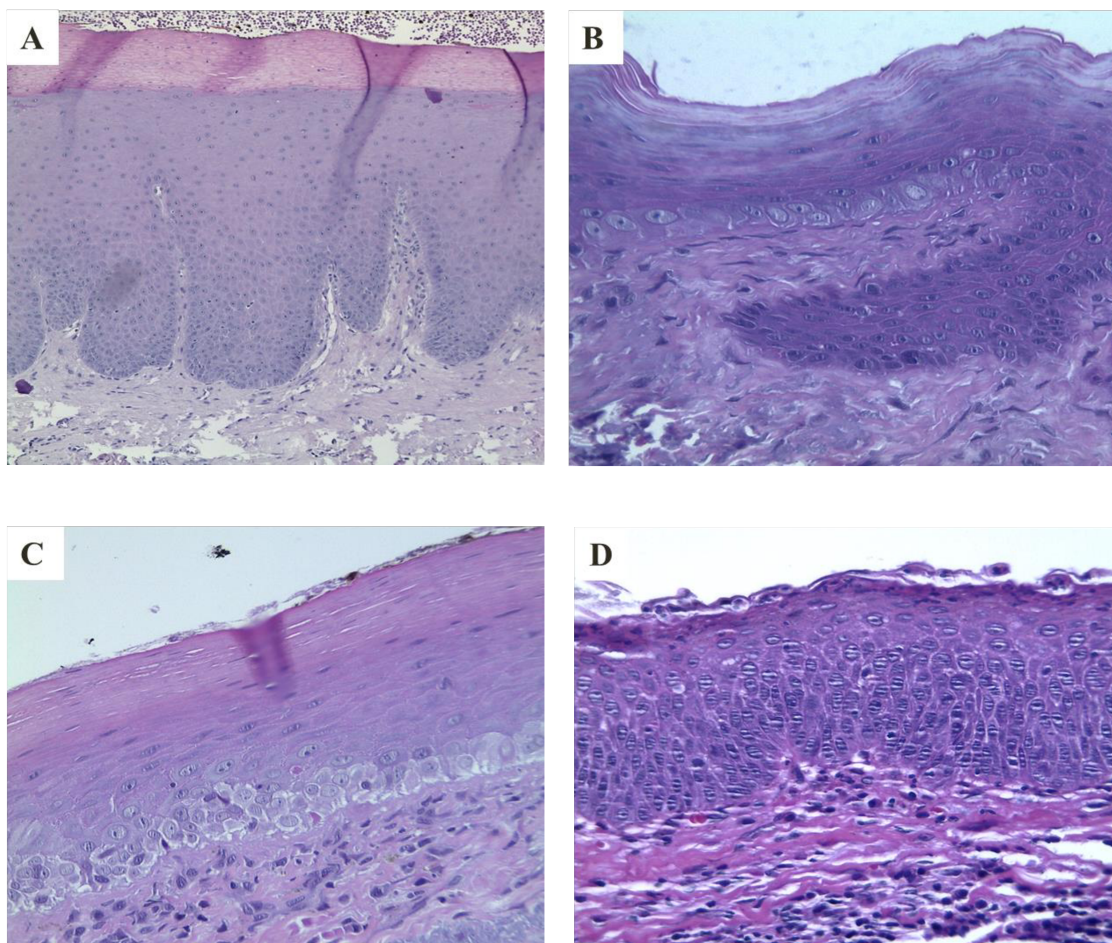


Figura 3 – Cortes histológicos corados em H&E. Em A, nota-se epitélio apresentando hiperqueratose e hiperplasia de camada basal. Em B, evidencia-se Leucoplasia apresentando displasia epitelial leve. Em C, observa-se outro caso de Leucoplasia apresentando displasia epitelial moderada. Em D pode-se notar a presença de intenso desarranjo arquitetural e citológico em uma lesão apresentando displasia epitelial severa. Hematoxilina e Eosina (aumento original: 40X).

Apesar dos critérios para diagnóstico preconizados pela OMS serem amplamente reconhecidos e aceitos, há uma grande variabilidade na interpretação inter e intra examinadores quanto à presença ou ausência de displasia epitelial, bem como com sua gradação histológica e critérios arquiteturais e citológicos utilizados (Kujan et al., 2007). Warnakulasuriya et al. (2008) acreditam que essa variabilidade é atribuída, principalmente, à subjetividade inerente aos critérios utilizados na gradação da lesão, além de variabilidade nos critérios de amostragem das biopsias, a utilização de procedimentos auxiliares para melhorar a precisão na identificação de lesões displásicas, por exemplo (Barnes et al., 2005; Kujan et al., 2006).

Em vista disso, Kujan et al. (2006, 2007) propuseram e avaliaram um sistema binário de gradação baseado nos mesmos critérios citológicos e arquiteturais epiteliais estabelecidos pela OMS (Barnes et al., 2005). Nesta proposta, os autores procuram agrupar as alterações em displasia epitelial de baixo risco de transformação, designadas neste trabalho como lesões de baixo risco (LBR), e displasia epitelial de alto risco de transformação maligna, designadas aqui como lesão de alto risco (LAR). O objetivo, segundo os autores, era exatamente reduzir as categorias de gradação, para polarizar a interpretação, diminuindo a influência da subjetividade na categorização intermediária da displasia. Baseados na história de transformação maligna de uma série de casos de leucoplasias, e da expressão das alterações citológicas e arquiteturais epiteliais nestas lesões, os autores assim agruparam estas alterações afim de definir as categorias de risco já mencionadas: LAR: observação de, no mínimo, quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas; LBR: associada a observação de menos que quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas. De acordo com os autores, esta proposta mostrou um alto nível de concordância de acerto de gradação pelos patologistas bucais participantes da avaliação. Com esta proposta, foi possível identificar que aproximadamente 11,0% das lesões de baixo risco sofreram transformação maligna, enquanto que 28 lesões das 35 consideradas de alto risco (80,0%) transformaram-se em CCEB. Ou seja, pelo sistema binário, os autores puderam identificar uma maior associação entre transformação maligna e LAR. Os autores ainda identificaram valores de 0,85 de sensibilidade, 0,80 de especificidade, 82,0% de acurácia, e valores preditivos negativos e positivos da ordem de 85,0% e 80,0%, respectivamente.

Todavia, ainda assim, as evidências relativas a estas presunções são escassas (Arduino et al., 2013). É nesse contexto que a leucoplasia bucal pode ser considerada como um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, e esforços têm sido direcionados à descoberta dos mecanismos associados ao seu diagnóstico, a sua evolução (progressão) e à transformação maligna (Arduino et al., 2013; Warnakulasuriya & Ariyawardana, 2016).

As leucoplasias normalmente não estão associadas à morbidade e mortalidade relevantes por si mesmas. Sendo a maioria assintomática, o principal objetivo do tratamento será sempre prevenir a transformação maligna. Como consequência da

incerteza na previsão de malignização, muitos indivíduos recebem tratamentos sobre lesões que, pelos diferentes fatores sugeridos como indicadores da progressão da lesão, nunca progrediriam para CCEB (Lodi et al., 2006; Lodi et al., 2008; Van der Waal, 2009).

As opções de tratamento disponíveis permanecem limitadas, em grande parte desconhecidas e predominantemente consistem de excisão cirúrgica da lesão (Van der Waal, 2009; Montebugnoli et al., 2012). A excisão cirúrgica tradicional por bisturi pode ser em alguns casos a melhor opção. No entanto, em pacientes com lesões extensas a cirurgia pode ser difícil, dolorosa, provocar danos estéticos e funcionais graves, requerer anestesia geral e inclui complicações como a formação de cicatrizes. Para tais situações, estão disponíveis diferentes modalidades de tratamento como a criocirurgia e cirurgia a laser (e.g. evaporação) (Lodi et al., 2006; Lodi et al., 2008; Van der Waal, 2009; Montebugnoli et al., 2012).

Não se conhecem benefícios entre qualquer um dos tratamentos clínicos (vitamina A, retinóides, beta caroteno ou carotenóides, bleomicina, chá e cetorolaco) quando comparados a placebo. O tratamento com beta caroteno, licopeno e vitamina A ou retinóides, tem sido associado à índices significativos de resolução clínica, quando comparados com placebo ou inexistência de tratamento (Lodi et al., 2006; Lodi et al., 2008; Van der Waal, 2009).

Embora não haja evidências científicas de que o tratamento, de qualquer modalidade, realmente previna ou impeça o possível desenvolvimento futuro de um CCEB, indica-se tratar ativamente as leucoplasias independente da presença ou ausência de displasia epitelial (Warnakulasuriya et al., 2007; Van der Wall, 2009; Warnakulasuriya et al., 2016). Também não há dados científicos disponíveis sobre o possível valor do acompanhamento e o intervalo após o tratamento, mas sugere-se que nos casos sem displasia epitelial seja feito acompanhamento em intervalos de seis meses por toda a vida e nos casos com displasia epitelial, além do tratamento, deve ser feito acompanhamento em intervalos de três meses por toda a vida. As limitações atuais na habilidade de predizer quais lesões evoluirão para uma transformação maligna resultam em muitos pacientes tratados de maneira inadequada (Napier et al., 2003; Warnakulasuriya et al., 2007; Van der Wall, 2009; Warnakulasuriya et al., 2016).

1.2 A via de sinalização WNT

A via de sinalização WNT compõe a regulação de uma grande variedade de processos fisiológicos em diferentes espécies, com um papel decisivo no desenvolvimento embrionário (Klaus & Birchmeier, 2008). As WNTs constituem uma família de glicoproteínas secretadas, ricas em aminoácido cisteína, com aproximadamente 350-400 aminoácidos. Nos seres humanos, existem 19 membros conhecidos dessa família, os quais desempenham papéis essenciais na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Giles et al., 2003; MacDonald et al., 2009).

A transdução de sinal se inicia com a ligação das glicoproteínas WNTs a dois membros distintos de receptores de superfície celular: o receptor da família Frizzled (FZ) e receptores da família de proteínas relacionadas a receptor LDL, conhecidos como LRP, os quais atuam como co-receptores essenciais para a interação entre WNT e FZ. Até o presente momento, 10 receptores FZ e dois membros da família LRP, os receptores LRP-5 e 6, foram identificados em seres humanos. Os receptores FZ tem um domínio amino terminal rico no aminoácido cisteína, local em que ocorre a ligação das WNTs, sete domínios transmembranares e uma porção carboxi-terminal voltada para a face citoplasmática da membrana celular (Lusting & Behrens, 2003).

As glicoproteínas WNTs ligam aos receptores de superfície celular e estimulam três vias de sinalização WNTs distintas: a via canônica, a via de polaridade planar da célula e a via WNT/cálcio (Lusting & Behrens, 2003). A via canônica, também conhecida como via clássica, ativa genes-alvo através da estabilização de β -catenina no citoplasma e sua translocação até o núcleo (Dihlmann & Doeberitz, 2005). Na ausência de sinalização WNT, o pool citosólico de β -catenina é continuamente degradado, como resultado da sua fosforilação pela proteína GSK3 β e subsequente degradação através da via ubiquitina-proteossomo (Dakeng et al., 2012).

Além da GSK3 β , outras proteínas fazem parte do complexo citoplasmático de destruição da β -catenina, como a axina, a caseína quinase -1 (CKI) e a proteína APC (do inglês: adenomatous polyposis coli) (Dakeng, et al., 2012). Axina e APC formam uma estrutura (scaffold) que permite a GSK3 β fosforilar especificamente β -catenina, bem como as próprias proteínas APC e axina, sendo que a fosforilação delas é

importante para a manutenção da estabilidade do complexo de destruição (Giles et al., 2003).

Sobre a fosforilação de β -catenina, estudos têm mostrado que ela ocorre nos resíduos de aminoácidos Ser 33, 37, 45 e Thr 41 em duas etapas, como segue: o resíduo Ser 45 é primeiramente fosforilado pela CKI, a qual é seguida pela fosforilação dos outros resíduos de aminoácidos pela GSK3 β (Amit et al., 2002). Após a finalização dessa etapa, a β -catenina é então reconhecida pela ubiquitinaligase- β - TrCP, induzindo a sua ubiquitinação, uma etapa inicial do processo de degradação de proteínas intracelulares pelo sistema ubiquitina-proteossomo (Giles et al., 2003).

Quando a via de sinalização WNT é ativada, o complexo de destruição APC-Axina-GSK3 β é inativado, permitindo que a β -catenina seja translocada do citoplasma para o núcleo, mediado pela Gal-3, onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF para promover a ativação da transcrição de genes alvos tais como MYC, CCND1 e MMP7 (Shimura et al., 2004; Dakeng et al., 2012). Para que isso ocorra, a proteína WNT deve se ligar ao receptor FZ na célula-alvo e promover o recrutamento da proteína Dishevelled (Dsh) próximo à membrana plasmática, onde interage com o receptor FZ, etapa essencial para inibir o complexo de destruição. Em relação aos receptores LRP, na presença de WNTs ativadoras, LRP 5 e 6 são fosforilados por GSK3 β e CKI, o que também promove o recrutamento de proteínas Dsh bem como a translocação da axina para a membrana plasmática e a inativação do complexo de destruição (Klaus & Birchmeier, 2008). As vias não canônicas são menos estudadas e os seus papéis durante a tumorigênese permanecem ainda desconhecidos (Lusting & Behrens 2003).

Sinais inibitórios da via WNT são modulados extracelularmente por proteínas secretadas, tais como as proteínas relacionadas com o Frizzled (FrzB), fator inibitório de WNT-1 (WIF-1) e Cerberus Xenopus. Esses fatores se ligam a WNT e antagonizam a sua função. Outro antagonista desta via é o Dkk (Dickkopf) que se liga ao co-receptor LRP e bloqueia sua disponibilidade (Lusting & Behrens, 2003).

A via de sinalização Wnt regula vários processos fisiológicos que, quando desregulados, são importantes na promoção tumoral, como proliferação celular, angiogênese, senescência, morte celular e metástases (Qiang et al., 2005; Ye et al., 2007; Ramachandran et al., 2011; Anastas & Moon, 2013). Além disso, a alta

frequência de mutações em componentes dessa via em diferentes tipos de neoplasias ressalta a sua importância durante o processo da carcinogênese (Anastas & Moon, 2013). De fato, o papel da via Wnt no desenvolvimento de tumores foi descrito pela primeira vez há trinta anos através da indução da expressão, por inserção pró-viral, de um gene até então desconhecido chamado *int-1*, promovendo a indução espontânea de hiperplasias e tumores mamários em ratas (Nusse & Varmus, 1982). A partir de então outros estudos evidenciaram a participação de diferentes componentes dessa via de sinalização no desenvolvimento tumoral (Anastas & Moon, 2013).

Dentre as mutações mais estudadas, têm-se aquelas que afetam a proteína APC, as quais foram inicialmente estudadas em pacientes portadores de polipose adenomatosa familiar, uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de numerosos pólipos adenomatosos e um grande risco do surgimento de tumor colorretal (Anastas & Moon, 2013). Além do carcinoma colorretal, mutações em APC foram identificadas também em outras neoplasias, como adenomas gástricos, hepatoblastomas e carcinoma de próstata (Oda et al., 1996; Lee et al., 2002; Miyaki et al., 1999; Gerstein et al., 2002).

Além disso, mutações no gene de β -catenina (CTNNB1) foram identificadas em vários tipos de neoplasias humanas, incluindo tumores gastrointestinais, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, melanomas e tumores pancreáticos (Miyaki et al., 1999; Saegusa et al., 2001; Takayasu et al., 2001; Abraham, et al., 2002; Clements et al., 2002; Breuhahn et al., 2006). Somado a essas alterações genéticas, nos últimos anos outros mecanismos de ativação da via canônica Wnt foram descobertos, tais como alterações epigenéticas que levam ao silenciamento de genes que codificam as proteínas inibidoras WIF-1 e DKK e a superexpressão de proteínas Wnts e dos receptores FZ (Aquilera et al., 2006; Chan et al., 2007; Sato et al., 2007; Klaus & Birghmeier, 2008; Veeck et al., 2009).

1.3 A via WNT em Leucoplasia.

Alterações em componentes da via Wnt também já foram descritos nas neoplasias da cavidade oral e desordens (ou alterações) cancerizáveis da mucosa oral, tanto para lesões cancerizáveis, isoladamente, quanto na dinâmica da transformação maligna a partir das lesões displásicas. Embora haja evidências que indiquem alterações da via Wnt/ β -catenina na carcinogênese bucal, alguma controvérsia ainda persiste

quanto a sua interpretação e significado (Liu et al., 2000; Lo Muzio, 2003; AbdulMajeed et al., 2013; Varelas et al., 2014; Sridevi et al., 2015).

A expressão imuno-histoquímica de E-caderina e cateninas (α , β e γ) foi observada em displasias em padrão semelhante ao epitélio normal. Todavia, uma importante queda nesta expressão foi observada em casos de displasia mais intensa, carcinoma *in situ* em estreita vizinhança com carcinomas invasivos. Estes achados, tem sugerido a Williams et al. (1998) que a ruptura do complexo E-caderina/ β -catenina constitui-se em evento tardio no processo de carcinogênese bucal (Williams et al, 1998)

Nakahara et al. (2000), relataram ausência de expressão imuno-histoquímica de ciclina D1 em mucosa normal, com discretíssimo aumento para leucoplasias (2,0%) e epitélio da borda de CCEB (5,0%). Estes resultados contrastam com um aumento para 35,9% dos casos de CCEB. Neste trabalho, os autores não conseguiram identificar nenhuma correlação entre a expressão de ciclina D1 e a atividade proliferativa nas lesões. Todavia, nenhuma interpretação dos achados pode ser considerada para o papel de ciclina D1 no processo de carcinogênese bucal.

Bankfalvi et al. (2002), também observaram semelhante distribuição de β -catenina em epitélio próximo da área invasiva do CCEB e em epitélio normal, envolvendo estrato intermediário profundo e queratinócitos basais; quanto a E-caderina, sua expressão foi localizada no estrato espinhoso, sendo negativa na superfície e em camada basal. Contudo, os autores puderam constatar por expressão imuno-histoquímica, uma pan-expressividade no tecido epitelial displásico, envolvendo todas as camadas teciduais nas lesões tidas como carcinomas *in situ*. Em poucos casos, salienta o autor, E-caderina e β -catenina tiveram sua expressão reduzida. Uma redução de expressão para E-caderina e β -catenina foi também observada nos casos de CCEB, guardando uma estreita correlação entre a expressão das duas proteínas. Dado interessante foi que a expressão de E-caderina mostrou reduzida em casos recorrentes. Os autores concluíram que há uma perturbação de expressão do complexo E-caderina/ β -catenina na carcinogênese bucal e que estas alterações podem ter impacto no processo de transformação maligna das alterações cancerizáveis.

Sikdar et al (2003), destacam que a perda de heterozigosidade em genes supressores de tumor, tais como o gene da polipose adenomatosa do cólon (APC) e do

gene mutado na oncogênese do câncer de cólon (MCC, do inglês mutated colon cancer gen), constitui-se num dos primeiros eventos da carcinogênese bucal. Com base neste pressuposto, os autores analisaram se este evento estava também implicado na carcinogênese bucal em indianos fumadores e mascadores de tabaco. Os autores observaram uma expressão mínima de LOH no gene APC (3,0%), e ausência de LOH no gene MMC para os casos de leucoplasia. Ausência de LOH em MMC nos pacientes com CCEB foi acompanhado de um discreto aumento de LOH no gene APC do mesmo grupo. Para os autores, estes resultados mostram que o comprometimento destes genes pode não ser um evento precoce na carcinogênese bucal.

Em 2006, Kövesi & Szende (2006) publicaram um estudo no qual investigaram a expressão de ciclina D1, p27 e p63 em LB. Os autores notaram uma expressão de ciclina D1 diretamente proporcional ao grau da displasia observada nas LB, sendo também mais forte nas eritroleucoplasias. E uma localização basal e parabasal foi bastante característica de sua expressão. Baseado no fato de que o aumento da displasia está diretamente relacionado com a transformação maligna epitelial (Warnakulasuriya & McDonald, 1995; Liu et al, 2000, Dionne et al, 2015; Warnakulasuriya et al, 2016), e que as ciclinas foram mais evidenciadas nos casos de alta gradação de displasia, os autores formulam a hipótese de que ciclina D1 pode representar um poderoso marcador de transformação maligna nas LB. Semelhante interpretação foi também abordada por Turatti et al., 2005; Santos-Garcia et al, 2006).

Shiratsuchi et al. (2007) avaliaram possíveis mutações nos genes de β -catenina (CNNTB1) e APC, bem como a expressão de ciclina D1 (CCND1) e o acúmulo nuclear/citoplasmático de β -catenina em 44 casos de carcinoma mucoepidermóide de cabeça e pescoço. Os autores observaram que em 15,4% dos casos foram encontrados mutações em β -catenina e o seu acúmulo citoplasmático em 13,6%. Mutações em APC foram observadas em apenas dois casos de CME de baixo grau. Com relação à expressão de ciclina D1, 38,5% dos casos apresentaram amplificação do gene correspondente (CCND1) e 43,2% superexpressão, o que foi significativamente correlacionada com o acúmulo de β -catenina (Shiratsuchi et al., 2007).

A localização celular de β -catenina (CNNTB1) também parece ser um fator importante no desenvolvimento de CCEB. Isso foi demonstrado por Ishida e colaboradores (2007), que encontraram expressão nuclear de β -catenina em 92% dos

casos de leucoplasias com displasia e em 29% das leucoplasias sem displasia. Também observaram que a expressão nuclear de β -catenina aumentou de maneira significativa com a severidade das displasias. Por fim, nesse mesmo estudo, os autores observaram que a expressão Wnt-3 e ciclina D1 (CCND1) era significativamente maior nos casos com expressão nuclear da β -catenina. Os autores concluíram que a ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina é importante na progressão das displasias nas leucoplasias bucais (Ishida et al., 2007).

β - e γ -cateninas também foi avaliada por Lo Muzio et al. (2009) quanto a sua expressão em lesões displásicas envolvendo a mucosa bucal. Por meio de ensaios imuno-histoquímicos, os autores puderam observar suas expressões em amostras de displasias bucais, controladas pela sua expressão em amostras de mucosa bucal normal. Os autores puderam observar que ambas as cateninas mostraram uma redução ou mesmo ausência de expressão nas displasias, associadas inversamente a intensificação da gradação das mesmas. Também acompanhando a intensificação da displasia ocorreu um deslocamento desta expressão da membrana para o citoplasma em ambas as proteínas estudadas. Os autores não conseguiram encontrar nenhuma diferença de expressão para as cateninas quanto comparou suas expressões para casos que transformaram e não transformaram em CCEB. Estes achados falaram aos autores de que as alterações na expressão das cateninas pode ser um evento consequente a transformação maligna, e não relacionado à sua indução.

Na mesma linha de avaliação, Fujii et al. (2011) também mostraram evidências da participação da via Wnt/ β -catenina no processo de carcinogênese bucal. Neste estudo, os autores evidenciaram um padrão crescente de β -catenina desde a mucosa bucal normal, passando pela displásica até o carcinoma invasivo. Este padrão de expressão foi estreitamente correlacionado com a expressão de Ki-67, mostrando um aumento da atividade proliferativa nos estágios investigados da carcinogênese. Curiosamente, os autores encontraram um aumento na expressão de Dickkopf (Dkk)-3 nestas fases da carcinogênese. Dkk-3 constitui-se uma proteína classicamente relacionada com a inibição da via Wnt/ β -catenina. Esta expressão de Dkk-3 tem sido encontrada pelos autores no citoplasma das células displásicas e nos CCEB, em especial. Segundo os autores, a mudança da expressão de Dkk-3 para o citoplasma das células epiteliais displásicas nas displasias e no CCEB sinaliza para o fato da proteína

não estar funcionalmente ativa neste compartimento, não interferindo na regulação do complexo E-caderina/ β -catenina.

Em 2012, Chaw et al. avaliaram a expressão proteica de E-caderina, β -catenina, APC e Vimentina, bem como a confirmação da expressão gênica de E-caderina e Vimentina por qPCR. Ficou evidenciado a diminuição da expressão da E-caderina e um aumento da expressão de vimentina, o que pode ser correlacionado com um pior prognóstico da doença. A localização celular de β -catenina deixou de ser predominantemente membranar, para uma localização citoplasmática/nuclear, acompanhado de aumento da gravidade da doença. Com base na expressão do grupo controle, pode se notar que a expressão de APC foi reduzida para os casos de displasia leve, mas aumentou para CCEB. A expressão gênica de E-caderina (CDH1) nas displasias e CCEB foram inferiores a 1% dos valores encontrados nos tecidos tido como normais, e a expressão de mRNA de vimentina foi 3,7 vezes maior para CCEB do que para a mucosa normal. Em lesões orais potencialmente malignas, a expressão membranar reduzida e o ganho de expressão citoplasmática/nuclear de β -catenina, bem como a expressão aberrante de APC podem ser marcadores de transformação maligna (Chaw et al., 2012).

Avaliando a expressão de marcadores de senescência e seu papel na carcinogênese bucal, Bascones-Martínez et al. (2012) compararam entre outros marcadores, a expressão de ciclina D1 entre amostras de mucosa normal, LB com e sem displasia e CCEB. Os autores puderam notar que embora a expressão de ciclina D1 aumentasse dos grupos de LB sem displasia para LB com displasia, as diferenças não foram estatisticamente significativas. Estes resultados, associados a presença também de Rb e maspin nestas lesões, corrobora a ideia de que o envelhecimento funcionando como supressor tumoral. Ou seja, o envelhecimento estaria relacionado como um fator pró-carcinogênese. Estes achados reproduzem em linhas gerais, outros resultados (Mishra & Das, 2009; Lo et al., 2011; Ramasubramanian et al., 2012). Estes resultados são complementares aos achados de Yogesh et al (2011) que também evidenciaram uma relação entre a redução da expressão de E-caderina a hiperplasia basilar, perda de coesão celular, mitoses, perda de polaridade celular e cones epiteliais “em gota”.

Em outro estudo indiano, Ramakrishna et al. (2013) confirmaram os achados de que a expressão de ciclina D1 é identificada em camadas parabasais do epitélio normal e

não conseguiram identificar diferenças significativas entre sua expressão nos diferentes graus de displasia incluídos no estudo. Os autores encontraram que o consumo de tabaco fumado tem uma relação direta com o aumento da expressão de ciclina D1 no epitélio bucal. Ainda, segundo os autores, estes achados reforçam a ideia de que a ciclina D1 é um marcador da carcinogênese bucal, em especial pela sua correlação com o fenômeno de hiperplasia basal encontrada nestas lesões.

Kaur et al. em 2013, avaliaram a expressão gênica e proteica de E-caderina (CDH1) e β -catenina (CNNTB1) em amostras de CCEB, lesões displásicas da mucosa bucal e em tecidos normais. Perdas da expressão de E-caderina e β -catenina são os primeiros eventos na tumorigênese oral; suas associações com comportamento agressivo do tumor e recorrência da doença reforçam o seu potencial como marcadores prognósticos. Correlação de perda da expressão de E-caderina e β -catenina com acumulação citoplasmática da molécula de adesão de leucócitos ativados (ALCAM, do inglês activated leukocyte cell adhesion molecule), tanto *in vitro* como em *in vivo* sugere que estas mudanças no sistema de adesão celular podem desempenhar papel fundamental na tumorigênese oral.

Níveis reduzidos de expressão para γ -catenina, β -catenina e E-caderina foram relatados também por Kyrodinou et al. (2014), achados diretamente relacionados com a desmogleinas-3 (Dsg-3). Este achado foi diretamente relacionado ao grau da displasia e a presença de CCEB, constituindo-se para os autores, uma evidência que dá ao achado um importante valor preditor da transformação maligna de leucoplasias.

Em recente trabalho, Freitas Silva et al. (2014) confirmaram a importância da ruptura estrutural do complexo E-caderina/ β -catenina na transformação maligna, a partir de sua reduzida expressão em lesões displásicas intensas e ausência em CCEB. Esta alteração parece envolver não somente a via da p-Akt, quanto também do Twist. Isto ficaria mais evidente na transformação maligna, quanto estas proteínas estariam em uma relação inversa de expressão em relação a E-caderina. Os achados remetem a uma provável interação destas proteínas no processo de transformação maligna, podendo, inclusive, constituírem-se em potenciais marcadores desta transformação.

von Zeidler et al. (2014) também exploraram a importância da expressão de E-caderinas em leucoplasias como sendo sinal precursor de sua transformação maligna.

Para tanto, estudaram sua expressão em amostras de mucosa normal, LB e CCEB metastáticos. De acordo com os autores, houve diferenças significativas na sua expressão entre os diferentes grupos estudados. Chamou a atenção, que a expressão tornava-se reduzida naquelas lesões de maior risco de transformação maligna, ou seja, com mais altos níveis de displasia. Segundo os autores, a queda na expressão de E-caderina sinaliza para fenômenos de perda de adesão celular como evento precoce na progressão de lesões cancerizáveis para CCEB. Importante que estas reduções foram encontradas principalmente nas camadas parabasais nos casos de LB de baixo risco e envolveu todo o epitélio nas de alto risco. Na mesma linha, Freitas Silva et al. (2015) também encontraram um padrão citoplasmático de expressão de β -catenina em amostras de mucosa bucal e de displasias bucais. Estudando por meio de ensaio imunohistoquímico a expressão proteica de β -catenina, os autores encontraram que esta expressão tornava-se também membranar a medida do aumento da gradação da displasia epitelial, mas havia uma redução inversamente proporcionalmente associada a acentuação do grau da displasia. Os autores reforçam a ideia de que a mudança de compartimentalização na expressão e o aumento de sua expressão citoplasmática nos casos displásicos, pode ser um evento marcador do processo de carcinogênese bucal.

A perda de heterozigossidade (LOH), mutações e alterações epigenéticas de APC foram relatadas em diferentes estudos em amostras de CCEB (Largey et al., 1994; Sikdar et al., 2003). Em geral, os estudos mostram que as alterações no gene *APC* levam a uma redução na expressão da proteína APC e, por consequência, da sua atividade supressora tumoral (Largey et al., 1994). Baseado nisso, Gao e colaboradores (2005), avaliando 34 amostras de CE oral, encontraram LOH e hipermetilação do gene APC em 31 casos. Em apenas cinco casos foi observado LOH juntamente com hipermetilação de APC. Esse estudo ainda analisou a expressão de β -catenina e verificou um aumento nos tumores pouco ou moderadamente diferenciados, indicando que a LOH e o acúmulo de β -catenina parecem contribuir para a progressão maligna de CCEB (Gao et al., 2005).

PROPOSIÇÃO

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Identificar o padrão de transcrição de genes (expressão funcional) pertencentes à via de sinalização Wnt/ β -catenina e sua relação com os respectivos produtos gênicos em uma amostra tecidual de LB e sua relação com fatores clinicopatológicos considerados marcadores de sua transformação maligna.

2.2 Específicos

2.2.1 Descrever as características sociodemográficas e clinicopatológicas da amostra estudada de LB e os eventos de transformação maligna detectados nos casos durante o seu acompanhamento clínico;

2.2.2 Avaliar a expressão gênica de genes da via Wnt/ β -Catenina, a saber, *CNNTB1*, *GSK3 β* , *APC*, *CDH1*, *c-MYC* e *CCND1*, em leucoplasias bucais;

2.2.3 Avaliar a expressão das proteínas da via Wnt/ β -Catenina, a saber, Wnt-1, E-caderina, β -catenina, APC, c-Myc e Ciclina D1 em leucoplasias bucais;

2.2.4 Analisar a relação da expressão gênica e proteica da via Wnt/ β -catenina no âmbito funcional da via e com os fatores clinicopatológicos na amostra de LB que possam indicar risco de transformação maligna.

3 Materiais e Métodos

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Federal de Uberlândia (CAAE: 04461813.1.0000.5152), segundo o parecer de número 680.597 (ANEXO A). Todos os pacientes participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

3.1 Casuística

A amostra estudada foi composta de LB (CID:K13.2) diagnosticadas em pacientes provenientes do atendimento realizado no ambulatório da Unidade de Diagnóstico Estomatológico e de Cirurgia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU), prospectivamente, e de casos recuperados retrospectivamente, a partir dos registros dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da mesma Instituição. No total, foram levantados 39 pacientes portadores de LB. Dois destes pacientes apresentaram duas lesões que foram incluídas no estudo, o que resultou em uma amostra referência de 41 lesões. Outros sete pacientes tiveram mais de uma biopsia realizada nas mesmas lesões em tempos diferentes: duas biopsias em cinco pacientes, e três biopsias em outros dois. Para estes pacientes, o intervalo de tempo entre as biopsias variou entre três e 96 meses.

Trinta dos 39 pacientes incluídos no estudo, 30 tiveram material coletado prospectivamente, no período entre 2012 e 2014. Para estes casos, parte do material foi fixada em solução de formol tamponado (pH ~7,2) a 10%, designada a partir de agora como formalina, e incluídos em parafina; outra parte foi armazenada em freezer -86°C, até o momento dos experimentos de expressão gênica funcional. Os demais casos foram fixados em formalina e incluídos em parafina, e se mantiveram arquivados no Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da FOUFU. Para estes, o diagnóstico de LB foi realizado entre 1994 e 2011.

Todos os casos tiveram o seu diagnóstico clinicopatológico baseado nos critérios divulgados pela OMS (Barnes et al, 2005) e em estudos publicados por grupos de trabalho designados pela OMS para discussão e proposição de conceitos sobre lesões

potencialmente cancerizáveis (Warnakularusiya et al., 2007; Warnakulasuriya et al., 2008; van der Waal, 2009).

Para todos os casos admitidos no estudo, os seguintes dados sociodemográficos e clinicopatológicos foram coletados: idade, sexo, localização (considerada como o epicentro da lesão), tamanho, tipo de leucoplasia (homogênea ou não homogênea), e sintomatologia associada, exposição a fatores etiológicos classicamente reconhecidos para as LB informados pelo paciente (exposição a álcool e produtos do tabaco fumado), história médica pessoal de câncer, e a data do diagnóstico da lesão maligna (transformação maligna), a partir do diagnóstico histopatológico.

Todos os casos foram analisados histopatologicamente para a caracterização de atipias celulares e alterações de arquitetura tecidual (Figura 2), designados como parâmetros para a identificação e gradação de displasias, de acordo com orientações da OMS (Barnes et al, 2005). Por sua vez, a gradação da displasia foi realizada seguindo-se os critérios de Kujan et al. (2006), como segue:

1. LB de alto risco de malignização (LAR): observação de, no mínimo, quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas;
2. LB de baixo risco de malignização (LBR): associada à observação de menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco alterações citológicas.

Todos os casos incluídos no estudo tiveram dados de acompanhamento mínimo de 12 meses.

Como critério de exclusão, estabeleceu-se a ausência dos dados sóciodemográficos e clinicopatológicos mencionados, ausência de material suficiente para a realização dos ensaios de expressão gênica funcional ou de imuno-histoquímica, e acompanhamento do paciente menor que 12 meses. Desta forma, incluímos casos que apresentaram material para análise concomitante de expressão gênica funcional, e casos para os quais apenas materiais para análise imuno-histoquímica de proteínas via Wnt/ β -Catenina estavam disponíveis.

A rotina de coleta foi estabelecida com os seguintes passos:

1. Para os casos inseridos prospectivamente: após a biopsia, os fragmentos eram hemisseccionados com lâmina de bisturi, em ambiente limpo e esterilizado. Um dos fragmentos foi imediatamente introduzido em nitrogênio líquido (-96°C), e depois de congelamento rápido, transferido para o freezer -86°C, onde ficava armazenado até o momento dos ensaios de expressão gênica; o outro fragmento era introduzido em formalina, na qual

ficava imerso no mínimo 24 horas e não mais que 72 horas, quando então era processado para inclusão em parafina e obtenção dos cortes histológicos para a realização da técnica de coloração Hematoxilina/eosina e ensaios imuno-histoquímicos.

2. Para os casos já previamente fixados em formalina e incluídos em parafina armazenados nos arquivos do Laboratório Institucional de Patologia, os blocos selecionados foram recortados para obtenção dos cortes histológicos para confecção de novas lâminas para análise a partir de colorações de Hematoxilina/eosina, e para obtenção dos cortes histológicos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos.

Todos os cortes obtidos foram armazenados em ambiente seco e em temperatura refrigerada durante o dia.

Um terceiro grupo de amostras foi estabelecido como grupo controle (n = 16) na para a realização dos ensaios imuno-histoquímicos, constituído por fragmentos de tecidos epiteliais histologicamente normais, provenientes de margens adjacentes de lesões benignas (hiperplasia fibrosa) com características morfológicas de normalidade, e de fragmentos teciduais diagnosticados como não apresentando alterações patológicas aparentes ou mesmo com diagnóstico de tecido normal.

Um quarto grupo, também identificado como controle (n = 11), foi configurado e utilizado para os experimentos de expressão gênica funcional por qPCR (quantificação de *amplicons* pela reação em cadeia da polimerase em tempo real). Este grupo foi constituído por fragmentos de mucosa de bochecha e gengiva de pacientes saudáveis, não tabagistas, resultantes de procedimentos terapêuticos diversos, e por fragmentos de mucosa adjacentes a mucocelos tratadas por exérese no Ambulatório de Diagnóstico Estomatológico e no Programa de Cuidados Específicos a Doenças Estomatológicas (PROCEDE) da Faculdade de Odontologia da UFU.

Todos os componentes dos grupos controles eram não tabagistas, com idades variando entre 20 a 40 anos.

3.2 Ensaio imuno-histoquímico

A técnica utilizada para identificação da expressão das proteínas Wnt-1, β -catenina, GSK3 β , APC, E-caderina, c-Myc e Ciclina D1 foi a da estreptavidina-biotina-peroxidase. Aspectos relativos as diluições consideradas para cada anticorpo, os

controle positivos empregados, e as respectivas referências de catálogo estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados nos ensaios imuno-histoquímicos, com os respectivos clones, origem, código do anticorpo, fabricante, diluições de uso e os respectivos controles positivos empregados.

Anticorpo	Clone	Origem	Código	Fonte	Diluição	Controle +
Wnt-1A	-	Policlonal/Coelho	ab15251	Abcam	1:100	Ca Mama
β -Catenina	H-102	Policlonal/Coelho	sc-7199	Santa Cruz	1:500	Ca Mama
GSK3- β	3D10	Monoclonal/Camundongo	ab93926	Abcam	1:1500	Ca Mama
APC	C-20	Policlonal/Coelho	sc-896	Santa Cruz	1:400	Ca Cólon
E-caderina	SPM471	Monoclonal/Camundongo	sc-56527	Santa Cruz	1:50	Cólon Normal
c-Myc	C-19	Policlonal/Coelho	sc-788	Santa Cruz	1:500	Cólon Normal
Ciclina D1	SP4	Monoclonal/Coelho	ab16663	Abcam	1:50	Ca Basocelular

*Procedência dos anticorpos: Abcam, Cambridge, UK e Santa Cruz Biotechnology, Sta Barbara, CA, USA

Para o ensaio imuno-histoquímico, cortes teciduais de 3 μ m de espessura, provenientes de tecido fixado em formol e incluídos em parafina foram obtidos e montados em lâminas polarizadas StarFrost® (Knittel Glaser, Brunsvique, BS, Alemanha). Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100% a 70%). Para a remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio 10% em etanol 95%, por 10 min., e, em seguida, lavados por sete passagens em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada de acordo com padronizações desenvolvidas no Laboratório, utilizando-se solução tampão EDTA, 1M (pH 8.0) em Decloaking Chamber™ NxGen (Biocare Medical, Concord, CA, USA) com ciclo de 110°C por 15 min.. Após o resfriamento e lavagem em cinco banhos de água destilada, os cortes foram submetidos primeiramente, ao bloqueio da biotina endógena com solução de clara de ovo, na proporção de duas claras de ovo para 200 mL de água destilada. Essa solução é previamente homogeneizada e filtrada e então incubada com as lâminas a 37°C, por 20 min., seguida de lavagens por 10 passagens em água destilada, para retirar todo o excesso da solução. Na sequência, deu-se o bloqueio da avidina endógena utilizando-se leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil), na proporção de 30g de Molico® para 180 mL de água destilada, a 37°C por 20 min., o que foi seguido de 10 banhos em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com solução de H₂O₂ em água destilada, a 10%, em três banhos de 10 min., cada. Após esse

bloqueio, os cortes foram lavados em cinco banhos de água destilada e, em seguida, a três banhos de cinco min. cada, em solução tampão TRIS-HCl 0,5M (pH 7.4). Depois desses passos, os cortes foram submetidos a incubações com o *kit* Starr Trek™ Universal HRP Detection System (STUHRP700, Biocare Medical, Concord, CA, USA). Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida a 37°C: a primeira solução utilizada foi a solução de bloqueio Background Sniper (Biocare Medical, Concord, CA, USA), por 15 min. para bloqueio de ligações inespecíficas; a após a retirada do excesso de líquido sobre as lâminas com auxílio de papel filtro, deu-se a incubação com os anticorpos primários, por 2 horas. Os cortes foram então lavados em solução de TRIS-HCl, em dois banhos de 2 min. cada, e incubados com a solução Trekkie Universal Link (disponível no *kit* Starr-Trek™) contendo anticorpo secundário, a 37°C por 20 min.. Os cortes foram novamente lavados em TRIS-HCl, em dois banhos de 2 min. cada, e imersos com a solução contendo o complexo terciário TrekAvidin-HRP (disponível no *kit* Starr-Trek™), a 37°C por 10 min., seguido de lavagem em TRIS-HCl, em 2 banhos de 2 min. cada novamente.

A revelação foi realizada com cromógeno 3-3'-diaminobenzidina tetrahydroclorido (disponível no *kit* Starr-Trek™) por 3 min., após esse passo os cortes foram lavados em água corrente e depois contracolorados com Hematoxilina de Harris. Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70% a 100%), diafanizados em xilol e finalmente montados. Os controles positivos estão especificados na Tabela 2 e a omissão dos anticorpos primários foi utilizada como controle negativo.

3.2.1 Avaliação da imuno-histoquímica

Para este procedimento foi empregado o método de avaliação semiquantitativa *Quickscore* (Detre et al, 1995). Esta avaliação leva em consideração dois parâmetros, a saber: intensidade de marcação (I) e a proporção de células marcadas (P), as quais foram consideradas na avaliação de cada lâmina, para cada proteína avaliada. Para tanto, foram avaliados 10 campos aleatórios em cada lâmina, com sequência padronizada, ampliados a 400X (aumento original). Ao final, o índice *Quickscore* (Q) foi obtido por cada expressão avaliada por lâmina a partir da fórmula $Q = P \times I$. A distribuição dos valores relativos a intensidade (I) e percentual (P) de marcação utilizados no método está detalhada na Tabela 3. Todas as análises que empregaram estes índices foram efetuadas a partir de valores de mediana para Q (MQ) por caso, por produto gênico avaliado.

Tabela 3 – Distribuição dos scores conforme a porcentagem e intensidade de células marcadas.

Variáveis		Classificação			
Score	1	2	3	4	5
Porcentagem (P)	0-20%	20-40%	40-60%	60-80%	80-100%
Score	0	1	2	3	
Intensidade (I)	Negativo	Fraco	Moderado	Forte	

3.3 Expressão funcional gênica pela reação da polimerase em cadeia, em tempo real (qPCR)

3.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*)

Os iniciadores ou *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta de “*design de primers*” da empresa Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA), através do link *PrimerQuest® Tool* (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Os parâmetros escolhidos foram definidos para *qPCR Intercalating Dyes*, considerando os seguintes fatores: temperatura de *melting* de 60°C, porcentagem de bases GC de 50%, tamanho do primer de 18-22pb, tamanho do *amplicon* de 80 a 100pb e energia livre de Gibbs (ΔG) baixa (Thornton & Basu, 2011). As sequências dos genes alvos foram obtidas pelo site da *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/genes-expression/>). Em seguida, para seleção do melhor primer/gene, utilizou-se o site da IDT® e, finalmente o programa *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tal que *primers* de menor *expect-value* (*e-value*) foram finalmente selecionados (Thornton & Basu, 2011). A Tabela 4 detalha os *primers forward* e *reverse* empregados no estudo, de acordo com os parâmetros acima mencionados.

Tabela 4 – Sequência dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) com suas respectivas referências.

Gene	Sequência	Referência IDT	Referência NCBI
<i>CNNTB1 F</i>	CCAGGTGGTGGTTAATAAGG	128954095	NM_001243027.2
<i>CNNTB1 R</i>	CTGAGGAGAACGCATGATAG	128954096	NM_001243027.2
<i>APC F</i>	GCCCTAGAAGCAGAATTAGATG	129829704	NM_001206729.1
<i>APC R</i>	CTTACTACGATGAGATGCCTTG	129829705	NM_001206729.1
<i>CDH1 F</i>	GTCAGCTACTCTAGTTCTGTTG	128954089	NM_006218.2
<i>CDH1 R</i>	GGACACACCAGTGTAGTAATG	128954090	NM_006218.2
<i>GSK3β F</i>	CTACCATCCTTATTCCTCCTCA	128954099	NM_001146156.1
<i>GSK3β R</i>	GTCCACGGTCTCCAGTATTA	128954100	NM_001146156.1
<i>CCND1 F</i>	CCACAGCTACTTGGTTTGT	128954097	NM_004958.3
<i>CCND1 R</i>	CCTACACCTATTGGACTGAAAG	128954097	NM_004958.3
<i>c-MYC F</i>	CTGCTTAGACGCTGGATTT	128954098	NM_00507111.5
<i>c-MYC R</i>	CGAGGTCATAGTTCCTGTTG	128954098	NM_00507111.5
<i>B2M F</i>	TATCCAGCGTACTCCAAAGA		NM_004048.2
<i>B2M R</i>	GGATGAAACCCAGACACATAG		NM_004048.2

B2M – gene da b2-microglobulina; *CCND1* – gene da Ciclina D1; *CNNTB1* – gene da β -catenina; *CDH1* – gene da E-caderina;
Os outros genes considerados são designados por nomes dos próprios produtos gênicos.

3.3.2 Extração de RNA

As extrações de RNAs de todas as amostras congeladas (mucosa normal e LB) foram realizadas no equipamento Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) empregando-se o *kit* de extrações de RNA Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue *Kit* (Referência: AS1280, Promega, Madison, WI, USA). Todas as etapas seguiram as recomendações do fabricante, bem como todas as soluções utilizadas disponíveis no *kit*. Previamente, foi realizada a macro dissecação de todas as amostras com o auxílio de lupa estereoscópica para remoção do tecido conjuntivo. Após a pesagem (máximo de 0,05g), cada amostra foi macerada em ambiente refrigerado (cuba com gelo) em meio contendo 200 μ L da solução de trabalho (1 mL de solução de homogeneização para cada 20 μ L de 1-tioglicerol) com auxílio do Pellet Pestles® (Sigma-Aldrich Brasil Ltda. Sao Paulo, Brazil). Seguida a aplicação de 200 μ L de tampão de lise, as amostras foram agitadas em vortex por 15s, centrifugadas a 1000g

por 2 min. a 4°C e os sobrenadantes coletados (400 µL) e colocados nos cartuchos (*cartridges*, que são suportes disponíveis no *kit*), posteriormente foram colocadas dentro do aparelho Maxwell® 16 Instrument (Promega, Madison, WI, USA) para extração dos RNAs. Ao final, o RNA total eluído de cada amostra foi alíquotado e posteriormente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000 (Thermo-Fisher, Wilmington, DE, USA), utilizando a relação 260/280 (índice de absorbância variando de 1,6 a 2,1) e 260/230 (índice de absorbância variando de 1,9 a 2,4). Todos os RNAs extraídos foram armazenados em freezer -80°C até a realização dos procedimentos de transcrição reversa.

3.3.3 Transcrição reversa

Utilizou-se o *kit* GoScript™ Reverse Transcription System (A5001, Promega, Madison, WI, USA) para a síntese de DNA complementar (cDNA). Todas as etapas foram seguidas de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, para cada amostra, 7 µL de Primer Mix (1µL de Oligo DT, 1 µL de Random Primer e 5µL de RNA total foi incubado a 70°C por 5 min.) e 13µL de RT Mix (5 µL de água livre de RNase, 4 µL de 5X Reaction Buffer, 1 µL de dNTP Mix, 1,5 µL de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 µL de RNAsin e 1 µL de Enzima RT) foram misturados e incubados em termociclador por 1 hora a 42°C e então por 10 min. a 70°C para a desnaturação da enzima transcriptase reversa. Ao final, o cDNA/amostra foi alíquotado, quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) (índices de absorbância variando de 1,6 a 2,1 para os índices 260/280 e de 1,9 a 2,1 para os índices 260/230) e armazenado em freezer -20°C até a utilização nos ensaios de qPCR.

3.3.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR

A quantificação da expressão dos genes *WNT-1*, *CNNTB1*, *GSK3β*, *APC*, *CDH1*, *c-MYC* e *CCND1* foram realizados no aparelho StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) através do método comparativo de *threshold cycles* (Ct). Todos os experimentos realizados foram montados em placas de 96 poços MicroAmp® Fast Optical, 0,1mL (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Para montagem dessas placas de 96 poços, empregou-se o programa *StepOne Software* versão 2.1 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata com apenas um controle para cada gene. As condições da

reação foram determinadas em ciclos previamente padronizados de 95°C por 2 min., 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min.. Para determinação da curva de *melting*, empregaram-se ciclos de 95°C por 15 seg., 60°C por 1 min. e 95°C por 15 seg.. A reação teve um tempo total de corrida de aproximadamente 2 horas.

Para a reação, utilizou-se o GoTaq® qPCR Master Mix (A6001, Promega, Madison, WI, USA), que contém sondas com propriedades espectrais semelhante ao SYBR® Green I, com excitação a 493 nm e emissão a 530 nm. As proporções dos reagentes utilizados no mix para cada amostra foram as seguintes: 6µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 0,5 µL de *primer forward*, 0,5 µL de *primer reverse* e 3,1 µL de água livre de RNase, totalizando 10,1 µL de mix em cada poço. A quantidade de cDNA utilizada foi de 1,9 µL (200ng de cDNA), totalizando em cada poço 12 µL de solução.

A expressão relativa ótima de cada gene foi estabelecida através da normalização do qPCR em relação ao gene endógeno *B2M*, da β 2-microglobulina (Tabela 4), pois foi o gene para o qual se obtiveram os menores índices de variações para as amostras testadas. O modelo matemático adotado para a avaliação da expressão relativa (r) entre o gene alvo e o gene endógeno foi através da diferença entre os valores de Ct do gene endógeno e dos valores de Ct do gene alvo ($\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene endógeno}$) sem considerar a correção da eficiência (Schmittgen & Livak, 2008). A partir dos valores de ΔCt dos grupos LAR e LBR, foi possível ainda subtrair a variação de ΔCt das amostras controles através da média do ΔCt (calibrador) delas, tal que ao final foi obtido o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{calibrador}$. Para as análises dos resultados finais foram considerados a quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ considerando as médias das duplicatas (Schmittgen & Livak, 2008; Bustin et al., 2009).

3.4 Análise dos dados

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para a análise estatística, a amostra foi testada quanto a sua normalidade por meio do teste D'Agostino-Pearson, padrão do *software* utilizado. Os dados obtidos foram descritos a partir de estatística descritiva, utilizando-se medianas (distribuição não normal) e percentuais que, quando pertinente, foram expressos em tabelas e figuras. Considerando o resultado do teste de distribuição da amostra que mostrou trabalharmos com dados não normais, os seguintes testes não paramétricos foram realizados:

1. Para a comparação da expressão imuno-histoquímica e expressão relativa dos genes entre os grupos controle e LB (total) foi utilizado o teste *U* de Mann-Whitney;
2. Para verificar associação entre transformação maligna e as diferentes variáveis clinicopatológicas, foram efetuados o teste Exato de Fisher.
3. O teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, foi utilizado para analisar comparativamente a expressão imuno-histoquímica, bem como a expressão relativa dos genes entre os grupos controle e os outros grupos de variáveis relacionadas as LB: LBR e LAR; lesões não homogêneas e homogêneas; lesões em diferentes localizações bucais; lesões maiores e menores que 200 mm²; lesões em pacientes de diferentes idades, lesões em pacientes do sexo feminino e masculino; lesões em pacientes com e sem história de câncer e transformação maligna.
4. O teste de Spearman foi utilizado nas análises de correlação entre dado quantitativo da expressão gênica e dado semiquantitativo da expressão dos produtos gênicos no grupo de LB.

4. Em todas as análises, utilizou-se o intervalo de confiança de 95%; foram considerados significativos os resultados com valor de $p < 0,05$.

Para a realização dos testes citados, as variáveis foram categorizadas como segue:

Idade: não idosos quando a idade era menor que 60 anos;	Sintomatologia: sim/não;
idosos, com idade igual ou maior que 60 anos;	Tamanho: $\leq 200\text{mm}^2$ / $\geq 200\text{mm}^2$;
Sexo: masculino e feminino;	Tipo de LB: homogênea / não homogênea;
Etilismo: sim/não;	Presença de displasia: Lesão de alto risco (LAR) / lesão de baixo risco (LBR);
Tabagismo: sim/não;	Transformação Maligna: sim/não.
História pessoal de câncer: sim/não;	

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Dados clinicopatológicos gerais

As principais informações clinicopatológicas dos 39 pacientes diagnosticados com LB e incluídos nos estudo estão descritos na Tabela 5. A maior parte dos pacientes pertencia ao gênero masculino (53,8%) e apresentava idade mediana de 56 anos, variando de 34 a 93 anos. No que diz respeito à exposição aos dois principais fatores de risco para o desenvolvimento da LB, a grande maioria dos pacientes era tabagista (76,9%), e a minoria etilista/ex-etilista (30,8%). Cinco pacientes (12,8%) apresentavam histórico pessoal de câncer extrabucal. Sintomatologia foi observada em aproximadamente 10% deles: dor e sensação de aspereza são as mais frequentemente relatadas (n=3, 8%), enquanto dormência foi relatada pelo outro paciente (n=1, 2,0%). Quanto à localização, a maioria dos pacientes apresentava lesão na mucosa de bochecha (33,3%), seguido pelos pacientes com acometimento de palato (17,9%) e múltiplos sítios (15,4%). Língua e gengiva foram acometidas em cinco e quatro pacientes de maneira isolada respectivamente (12,8% e 10,3%). Embora não tenha sido acometido de maneira isolada, o soalho bucal apresentava-se como epicentro de lesões em quatro pacientes (10,3%), como lesão única acometendo soalho bucal e língua simultaneamente. Para os casos de manifestação múltipla a combinação do acometimento gengival e de mucosa de bochecha foi a forma mais frequente. A maior parte das lesões apresentava tamanho maior que 200 mm² (56,5%) e manifestação clínica homogênea na primeira consultam (69,2%).

Quanto à classificação histológica, dos 39 casos avaliados inicialmente, 74,4% foram classificados como LBR e 25,6% como LAR. Durante o acompanhamento dos pacientes, seis lesões sofreram transformação maligna (15,4%) num tempo médio de acompanhamento de 52 meses, sendo quatro delas classificadas como de alto risco de transformação e duas delas de baixo risco. O tempo médio de acompanhamento para todas as lesões avaliadas foi de 56 meses, com mínimo de 12 meses e máximo de 156 meses.

Quanto ao tratamento empregado, apenas os seis pacientes diagnosticados com CCEB foram submetidos à excisão cirúrgica completa da lesão sob anestesia geral sem a realização de tratamento adjuvante (15,4%). Dentre os demais pacientes, 28 (71,7%) realizaram apenas biópsia incisional com finalidade de diagnóstico e cinco (12,8%) foram submetidos à biópsia excisional no momento do diagnóstico sob anestesia local.

Como protocolo de tratamento, todos os pacientes tabagistas foram orientados a interromper o consumo de tabaco na primeira consulta. Sendo assim, dentre os 39 pacientes acompanhados 41% pararam de fumar, sendo que em quatro deles as lesões desapareceram durante o acompanhamento e em um paciente a lesão apresentou crescimento mesmo após a interrupção do tabagismo.

Quanto à condição clínica dos pacientes ao final do estudo, apenas dois pacientes evoluíram para óbito após o diagnóstico de CCEB (5,1%) os demais ou se encontram vivos sem doença (48,7%) ou vivos com as lesões presentes e em acompanhamento (46,2%).

Em sete pacientes, foi realizada mais de uma biópsia ao longo do acompanhamento. Os dados clinicopatológicos e de seguimento de cada um deles estão descritos na tabela 6. Dentre eles, três pacientes que apresentavam LAR no momento do diagnóstico (#3,#5,#7), após a interrupção do consumo de tabaco apresentaram regressão clínica da lesão e uma evidente melhora no quadro de displasia epitelial sendo classificados como LBR na biópsia de acompanhamento. Em outros dois casos (#4 e #6), os pacientes apresentavam lesões homogêneas classificadas em LBR. No entanto mesmo após receber orientações sobre a progressão dessas lesões nos tabagistas, os pacientes não pararam de fumar, o que resultou numa mudança clínica para a forma não homogênea, progressão para LAR e transformação maligna da lesão (Figura 1).

Analisando estatisticamente, foi possível observar que apenas o tamanho ($>200\text{mm}^2$) foi associado significativamente à transformação maligna ($p = 0,0266$; RR: 1,353). Transformação maligna não foi associada a outras variáveis testadas, a saber: gênero ($p = 0,6786$), localização (língua/soalho e outras localizações, $p = 0,5928$), história pessoal de câncer ($p = 1,0$), tipo de leucoplasia ($p = 0,3607$) e displasia, baseado no risco para transformação maligna (LAR e LBR, $p = 0,3235$). Os dados clinicopatológicos de cada um dos pacientes que sofreram transformação maligna da lesão estão descritos na tabela 7.

Tabela 5 - Características clinicopatológicas dos 39 pacientes portadores de leucoplasias bucais.

Variáveis	Classificação	Nº de pacientes	Porcentagem (%)
Gênero	Feminino	18	46,2
	Masculino	21	53,8
Idade	< 60	25	64,1
	≥ 60	14	35,9
Tabagismo	SIM	30	76,9
	NÃO	9	23,1
Etilismo	SIM	12	30,8
	NÃO	27	69,2
Histórico de Câncer	SIM	5	12,8
	NÃO	34	87,2
Sintomatologia	SIM	4	10,3
	NÃO	35	89,7
Localização	Mucosa de bochecha	13	33,3
	Palato	7	17,9
	Gengiva	4	10,3
	Língua	5	12,8
	Soalho bucal	4	10,3
	Múltiplos	6	15,4
Tamanho	≤ 200 mm ²	17	43,5
	≥ 200 mm ²	22	56,5
Classificação Clínica	Homogênea	27	69,2
	Não homogênea	12	30,8
Classificação Histológica	Alto Risco	10	25,6
	Baixo Risco	29	74,4
Transformação Maligna	SIM	6	15,4
	NÃO	33	84,6
Estado Atual	Vivo sem doença	19	48,7
	Vivo com doença	18	46,2
	Obito	2*	5,1

* Casos que evoluíram para carcinoma de células escamosas.

Tabela 6 - Características clinicopatológicas dos sete pacientes portadores de LB com mais de uma biópsia ao longo do acompanhamento.

Caso	Gênero	Idade	Localização	Tamanho (cm)		Status de tabagismo		Etilista	Gradação Histológica			Transformação
				Inicial	Final	Diagnóstico	Acompanhamento		1° biópsia	2° biópsia	3° biópsia	
1	Masculino	38	Mucosa de bochecha	8	8	Sim	Sim	Não	LBR	LBR	-	Não
2	Masculino	53	Assoalho bucal	4	4	Sim	Sim	Não	LBR	LBR	-	Não
3	Masculino	62	Mucosa de bochecha	3	3	Sim	Não	Sim	LAR	LBR	-	Não
4	Masculino	43	Mucosa de bochecha retrocomissural	2	8	Sim	Sim	Sim	LBR	LAR	-	Sim
5	Masculino	47	Palato duro	5	2	Sim	Não	Sim	LAR	LBR	LBR	Não
6	Masculino	56	Mucosa de bochecha retrocomissural	3	6	Sim	Sim	Sim	LBR	LBR	LAR	Sim
7	Feminino	60	Mucosa de bochecha retrocomissural	3	0 ¹	Sim	Não	Não	LAR	LBR	-	Não

LBR: Leucoplasia de baixo risco, LAR: Leucoplasia de alto risco; 1. O valor 0 foi dado às lesões que desapareceram ao longo do tratamento.

Tabela 7 - Características clinicopatológicas dos seis pacientes portadores de LB que sofreram transformação maligna ao longo do acompanhamento.

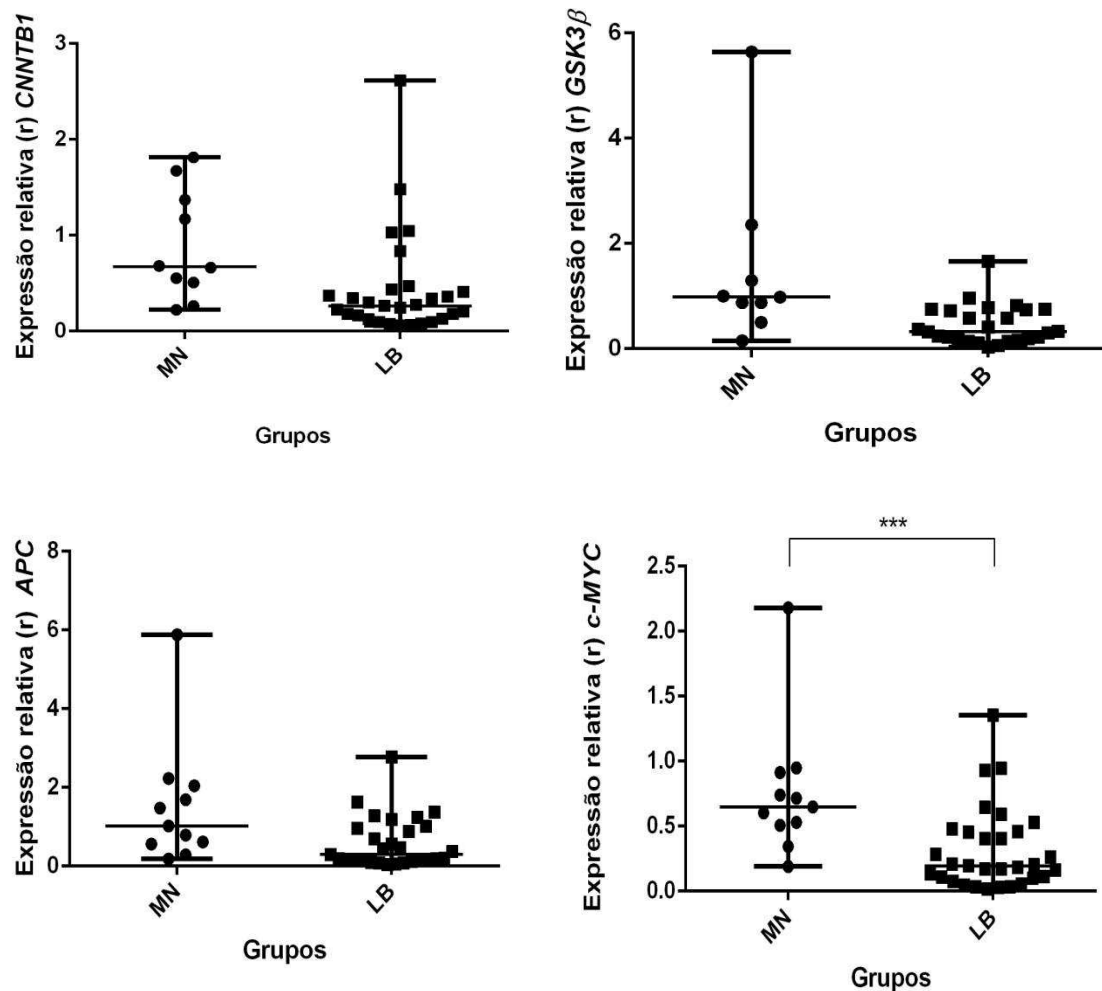
Caso	Gênero	Idade	Localização	Tamanho (cm)	Tabagismo		Etilista	Gradação Histológica			Follow-up	Estado atual
					Diagnóstico	Acompanhamento		1° biópsia	2° biópsia	3° biópsia		
1	Maculino	43	Mucosa jugal bilateral	6	Sim	Sim	Não	LAR	-	-	96 meses	VSD
2	Feminino	93	Palato duro, mole e orofaringe a direita	8	Sim	Sim	Não	LAR	-	-	6 meses	Óbito
3	Feminino	45	Mucosa jugla Direita	3	Sim	Sim	Sim	LAR	-	-	48 meses	VSD
4	Masculino	56	Retrocomissura direita	5	Sim	Sim	Sim	LBR	LAR	-	48 meses	VSD
5	Masculino	57	Dorso de língua	5	Sim	Sim	Sim	LAR	-	-	72 meses	Óbito
6	Masculino	58	Borda de língua esquerda	4	Sim	Sim	Sim	LBR	LBR	LAR	56 meses	VSD

LBR: Leucoplasia de baixo risco, LAR: Leucoplasia de alto risco; 1. Follow-up até o momento da transformação maligna; VSD: vivo sem doença.

4.2 Expressão gênica

4.2.1 Análise geral da expressão gênica nas Leucoplasias e grupo controle

Os dados referentes à avaliação quantitativa (expressão relativa) dos genes *CNNTB1*, *GSK3 β* , *APC*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* entre o grupo controle (MN) e o grupo de pacientes com LB podem ser observados na Figura 4. No geral, a expressão relativa de todos os genes, dadas por suas medianas, foi maior no grupo MN do que no grupo LB. Uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos foi encontrada para *CNNTB1* ($p=0,0037$); *GSK3 β* ($p=0,0020$); *APC* ($p=0,0078$); *c-MYC* ($p=0,0006$); *CCND1* ($p=0,041$).



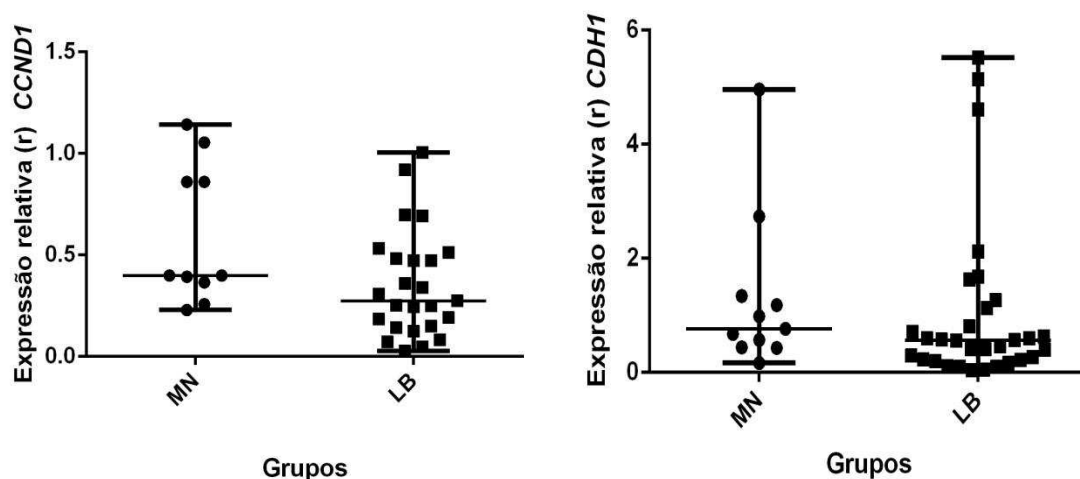


Figura 4 – Expressão relativa dos genes *CNNTB1*, *GSK3 β* , *APC*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* nos grupos MN e LB. Em todas as avaliações por alvo foi utilizado o teste *U* Mann-Whitney. Dados expressos como mediana e intervalo.

4.2.2 Expressão gênica entre os grupos LAR, LBR e grupo controle MN.

A análise comparativa da expressão relativa entre os grupos MN, LAR E LBR estão expressos na Figura 5. A expressão dos genes foi variável entre os grupos, no entanto, em todos os genes avaliados a expressão se mostrou maior no grupo controle (MN) que nos demais grupos avaliados, exceto na expressão de *CCND1*. Outro ponto a ser destacado é o fato de que a expressão de *c-MYC* apresentou mediana de 0,64 para o grupo MN, logo, importante diferença estatística para o grupo LBR com expressão relativa mediana de 0,18 ($p < 0,001$). Também foi possível notar diferença estatisticamente significativa na expressão de *CNNTB1*, *GSK3 β* , *APC* e *CCND1* entre os grupos MN e LBR. As medianas de expressão encontradas para *CNNTB1*(0,67), *GSK3 β* (0,98), *APC* (1,02) e *CCND1* (0,39) no grupo MN foram estatisticamente maiores que as encontradas para o grupo LBR (*CNNTB1*/0,26; *GSK3 β* /0,32; *APC*/0,24 e *CCND1*/0,25).

Não ficou evidente diferença estatística na expressão dos genes avaliados neste estudo entre os grupos LAR e LBR. Apenas na comparação da expressão relativa de *GSK3 β* nota-se diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0123$) entre o grupo MN, de maior expressão (0,98) e LAR com expressão menor (0,24). O grupo LAR apresentou maior expressão de *CCND1* (0,49) quando comparado com o grupo MN (0,39) e LBR (0,25), no entanto sem significância estatística.

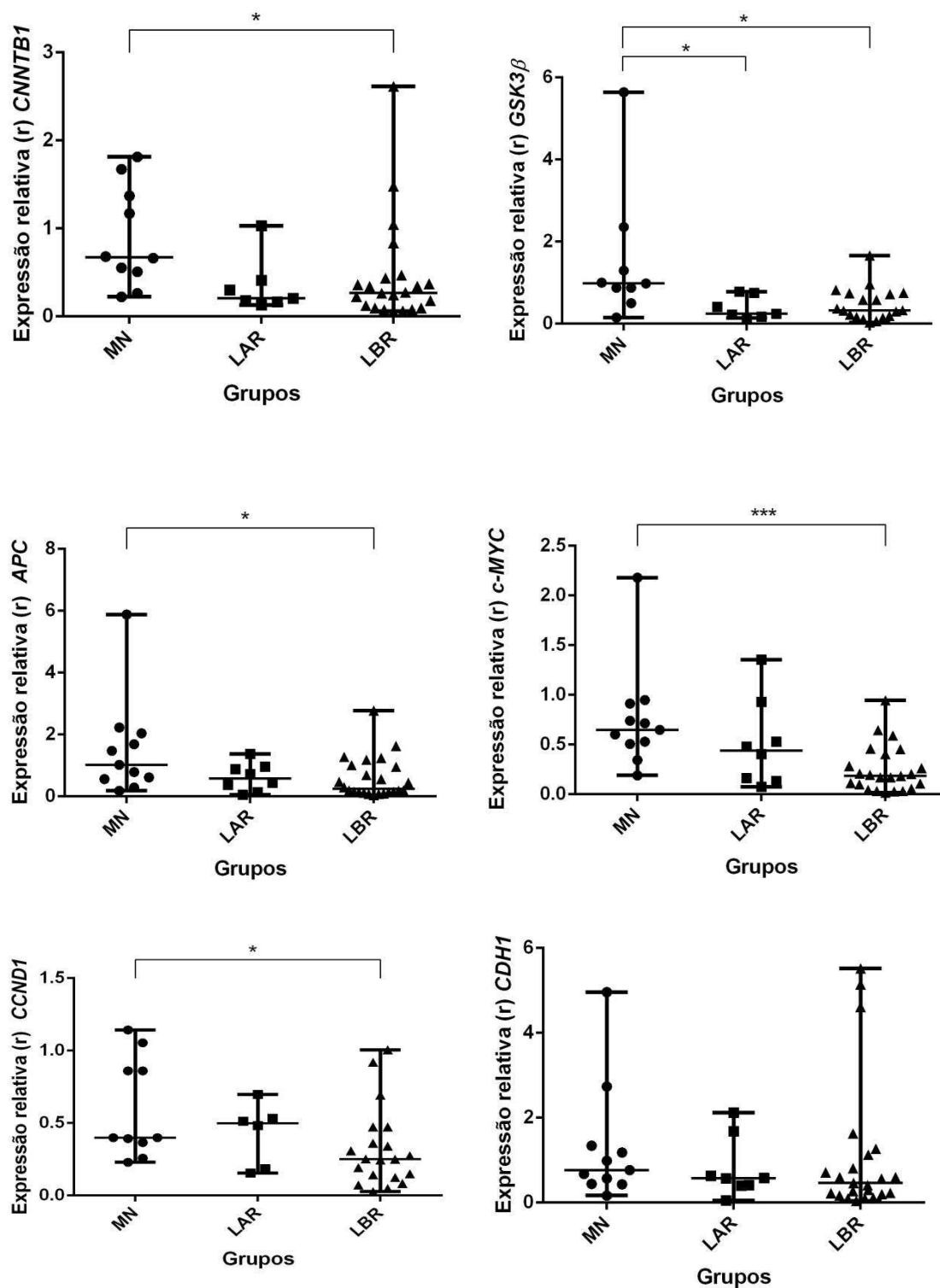


Figura 5 – Expressão relativa dos genes *CNNTB1*, *GSK3β*, *APC*, *c-MYC*, *CCND1* e *CDH1* nos grupos MN, LAR e LBR. Em todas as avaliações foi usado o teste de Kruskal-

Wallis. Dados expressos como mediana \pm intervalo. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4.3 Análise imuno-histoquímica

4.3.1 Análise geral da expressão das proteínas nas LB e grupo controle

No total, foram analisadas 41 lesões de LB, tendo em vista que dois dos 39 pacientes apresentaram duas lesões em localizações diversas.

No geral, a expressão imuno-histoquímica de todas as proteínas investigadas (Wnt-1, E-caderina, β -catenina, GSK3 β , APC, c-Myc e Ciclina D1) foi observada na membrana e/ou citoplasma e/ou núcleo, de maneira combinada ou isolada para os casos do grupo em estudo e controle. Quanto à intensidade de marcação, ela variou de negativo a forte para todas as proteínas estudadas, especialmente no grupo experimental.

Para as proteínas E-caderina e β -catenina, foi possível perceber uma expressão em membrana com variações de combinação com citoplasma e/ou núcleo.

As Figuras 6 e 7 mostram os aspectos de expressão nos controles e LB, respectivamente, referenciais para cada proteína estudada. Na Figura 8, estão os gráficos relativos à expressão imuno-histoquímica geral das proteínas estudadas nas LB, de forma comparativa ao grupo controle.

Para o grupo controle, a proteína Wnt-1, apresentou expressão em todos os casos, predominantemente membranas e citoplasmática, sendo que todas as camadas do epitélio foram marcadas. Entretanto, a camada basal e parabasal apresentaram maior intensidade de marcação. A MQ para esta proteína entre os casos controle foi de 5,96. Para os casos de LB, a expressão de Wnt-1 foi qualitativamente semelhante à encontrada para o grupo controle, no entanto, em dois casos não foi encontrado a expressão desta proteína e no restante a expressão (MQ= 2,0) foi menor que a encontrada para o grupo controle.

Para β -catenina, foram observadas variações na sua expressão: de modo geral todas as amostras exibiram expressão membranas de intensidade variada com MQ de 4,23 para os controles e de 2,33 para a LB. Em 15 casos foi possível notar expressão citoplasmática e em sete casos a expressão nuclear desta proteína, quase sempre restritos a camada basal e parabasal do epitélio. Também ficou evidente uma maior intensidade de expressão nas camadas mais inferiores do epitélio (basal e parabasal) tanto para os

controles quanto para LB. Em quatro controles e em duas LB não houve expressão de β -catenina.

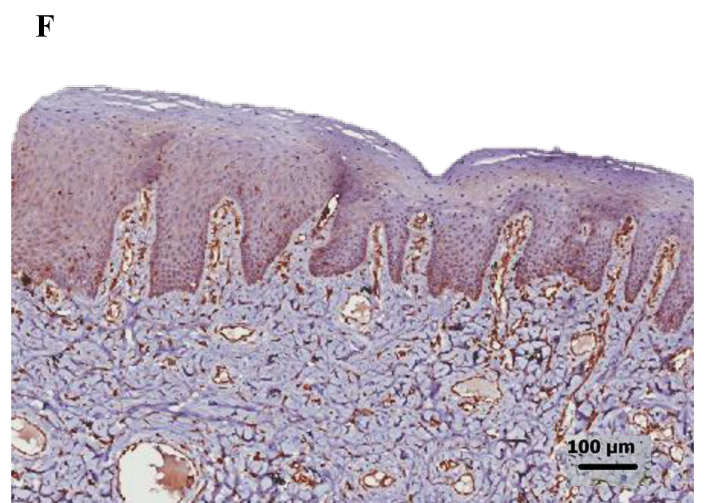
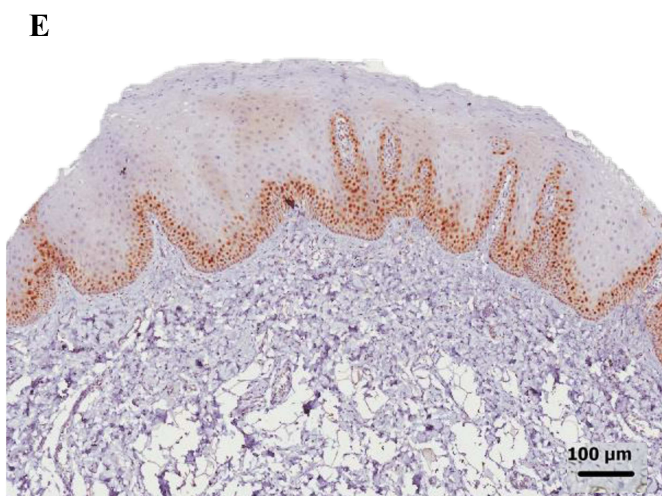
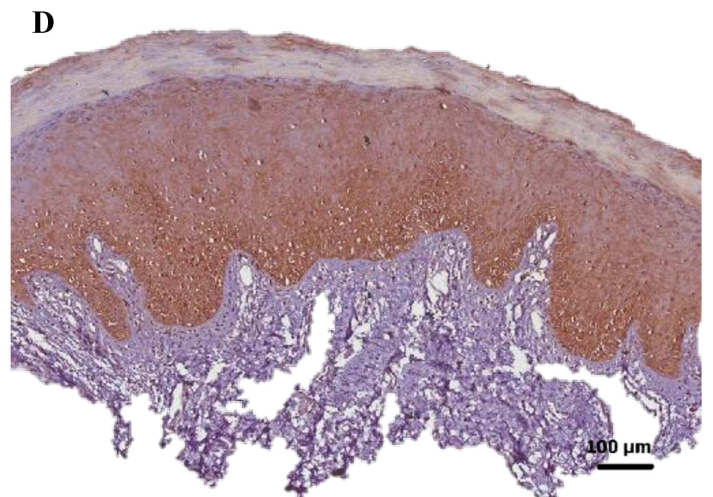
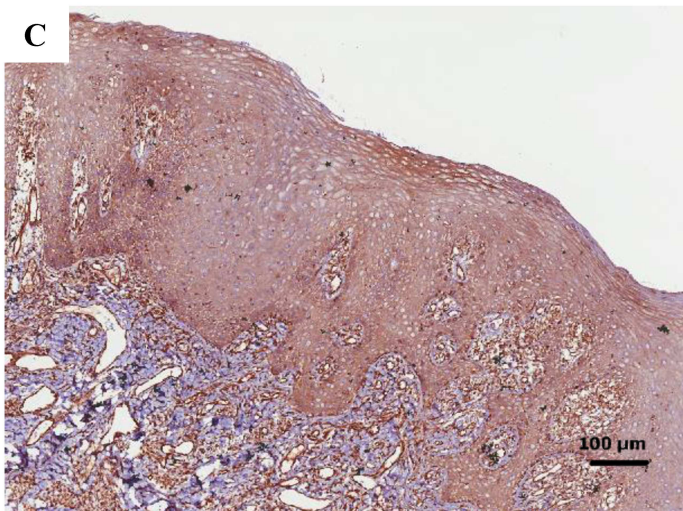
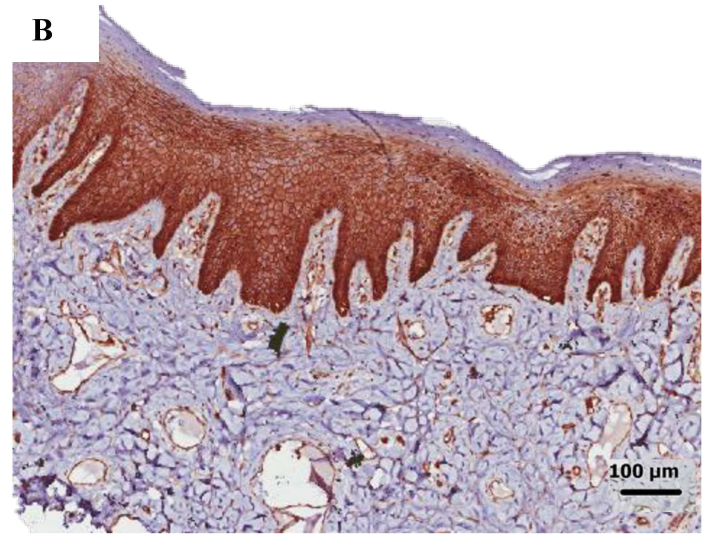
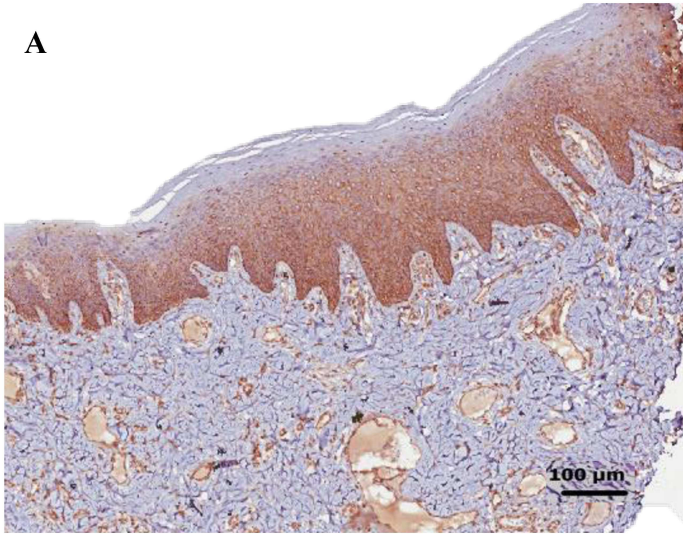
Um padrão de expressão exclusivamente citoplasmático foi encontrado para GSK3 β em todos os casos exceto um controle. A expressão foi mais intensa para as LB que para os casos controles, embora a porcentagem de células marcadas seja semelhante. Para esta proteína, a MQ foi de 5,15 para MN e 8,0 para LB.

APC apresentou expressão negativa em 10 casos controle e em oito casos de LB. Quando presente, a expressão era exclusivamente citoplasmática, distribuídas de maneira equivalente entre as camadas do epitélio e de intensidade moderada na maior parte dos casos. Foi encontrado MQ de 0 para o grupo MN e 2,0 para o grupo LB.

Um padrão peculiar de exclusividade nuclear e restrito à camada basal e parabasal do epitélio foi marcante na expressão de Ciclina D1. De modo geral a expressão apresentou intensidade fraca e porcentagem mediana de células marcadas para a maioria das amostras (40 a 60% de células marcadas). Não foi evidenciada expressão de CiclinaD1 em cinco casos controle e em 11 casos de LB. A MQ encontrada para esta proteína no grupo MN e LB foi de 3,0 e 0,66 respectivamente.

A proteína c-Myc apresentou expressão negativa em seis casos controle e em 18 casos de LB. A expressão foi predominantemente citoplasmática, de intensidade forte, distribuída por todas as camadas do epitélio com MQ de 1,71 para o grupo MN e de 0,33 para o grupo LB. Em 19 casos de LB foi possível notar a expressão nuclear de c-Myc de intensidade baixa e pequena proporção de células marcadas (0 a 20%).

Para E-caderina, foi observada expressão em todos os casos exclusivamente no compartimento membranar e com maior intensidade nas camadas inferiores do epitélio (basal e parabasal). Foram encontrados valores de MQ para os controles de 6,0 e para as LBs de 9,0.



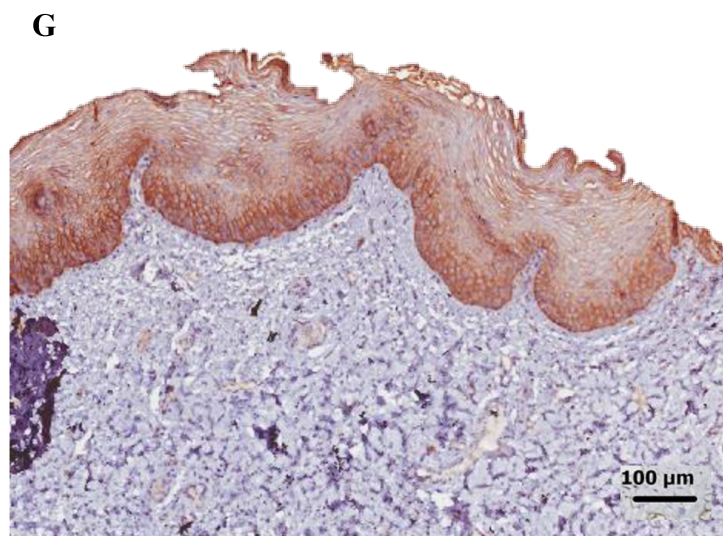
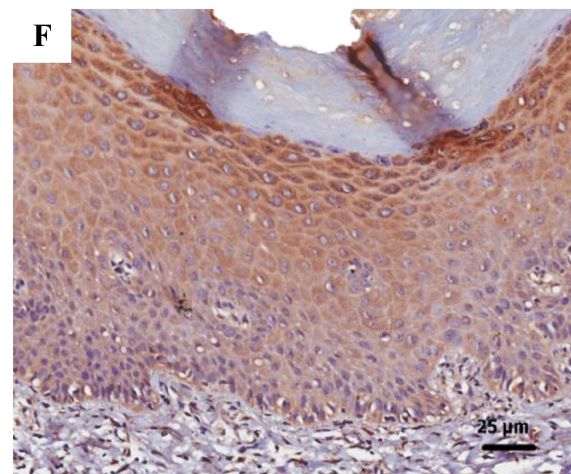
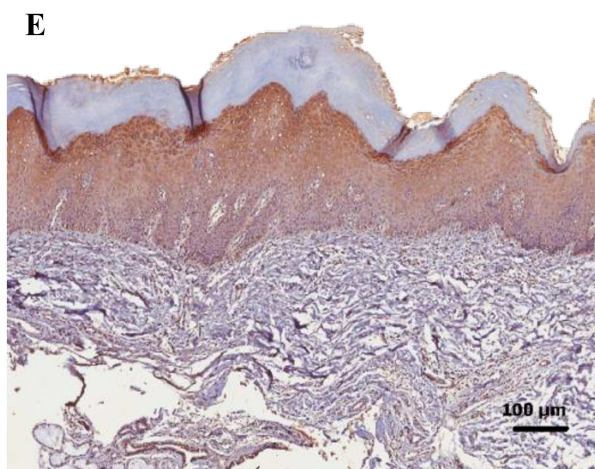
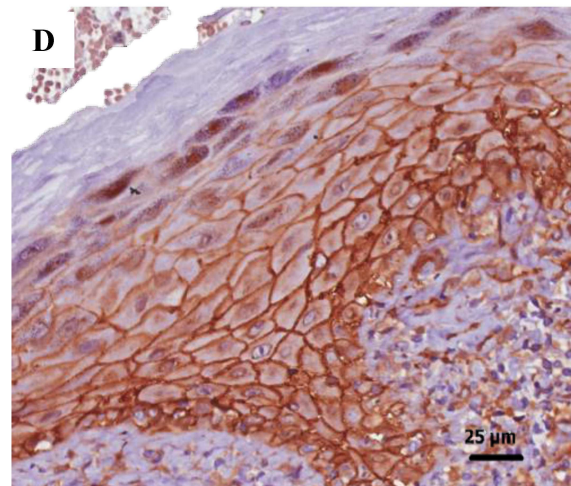
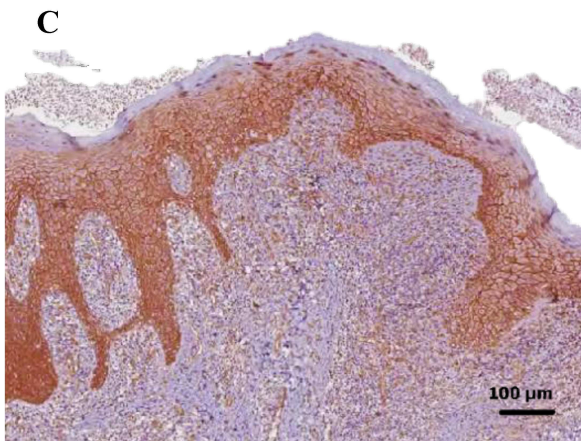
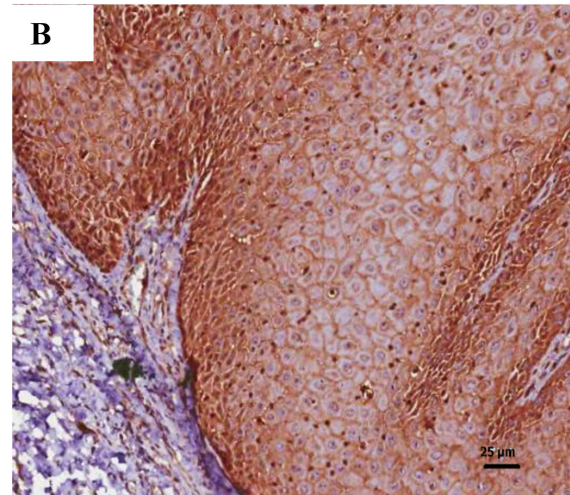
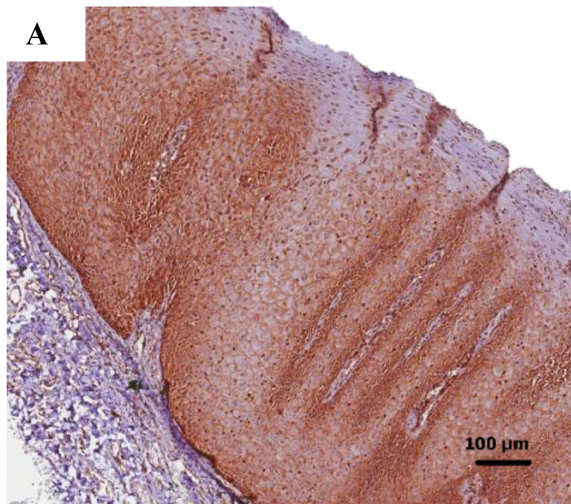
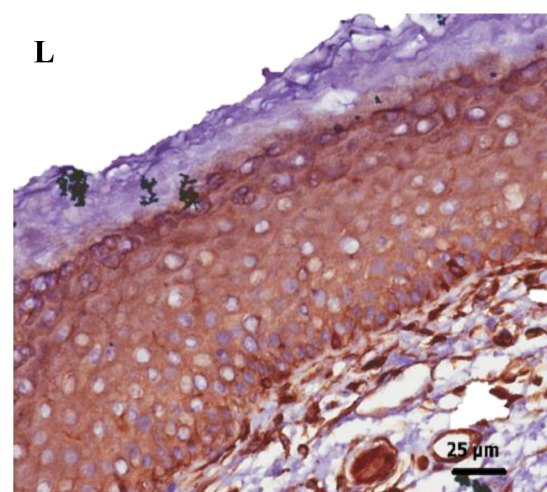
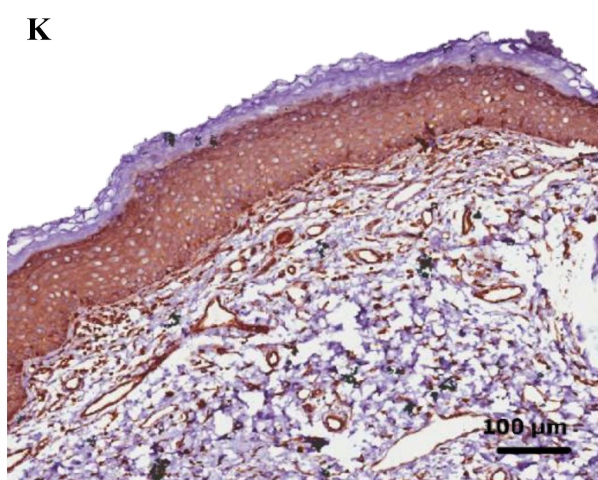
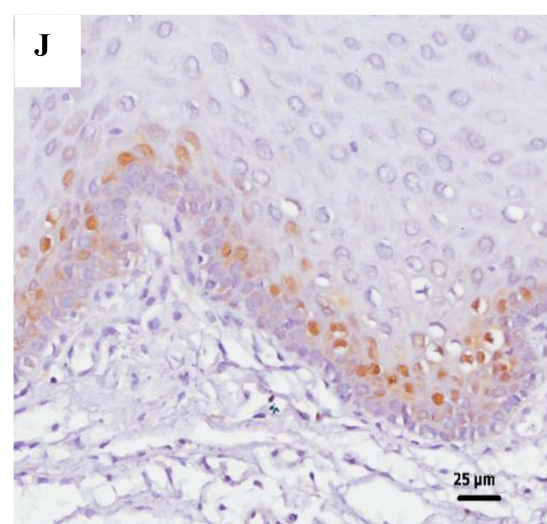
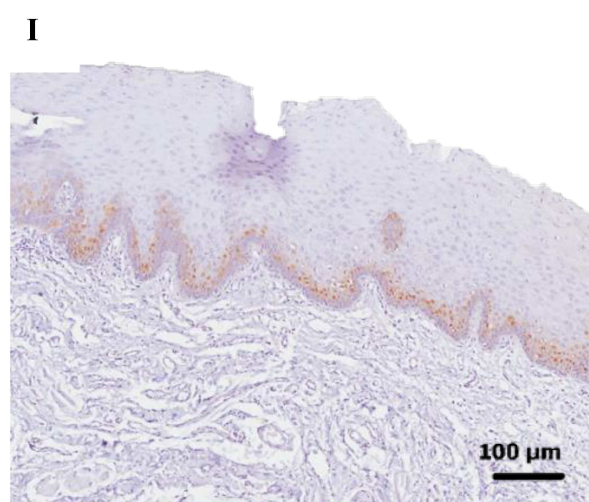
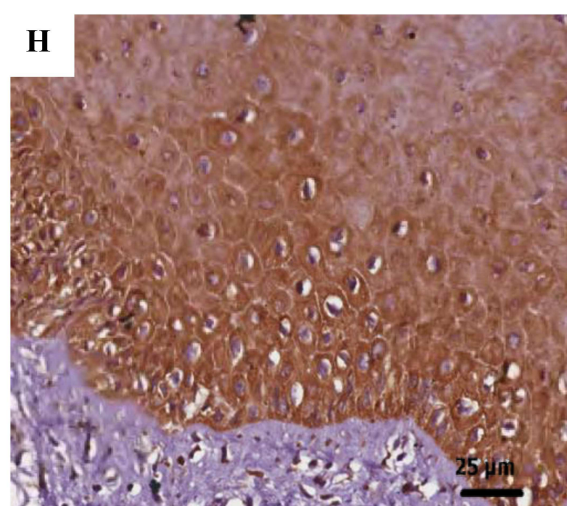


Figura 6 – Reações imuno-histoquímicas de todas as proteínas investigadas nos casos de leucoplasia bucal. Hematoxilina e Eosina (aumento original 100X). Em A, expressão membranar predominante de intensidade moderada de Wnt-1. Em B, expressão de β -catenina, um padrão membranar predominante de intensidade forte e mais intensa na camada basal do epitélio é encontrado. Em C e D fica evidente uma expressão citoplasmática de intensidade moderada em todas as camadas do epitélio de APC e GSK3 β respectivamente. Em E fica evidente a expressão de Ciclina D1 exclusivamente nuclear, restrita a camada basal e parabasal. Em F pode-se notar uma expressão de intensidade fraca no compartimento citoplasmático de c-Myc. Em G nota-se na expressão de E-caderina um padrão membranar predominante, de intensidade moderada em todas as camadas do epitélio. Uma maior intensidade pode ser notada nas camadas basal e parabasal do epitélio.





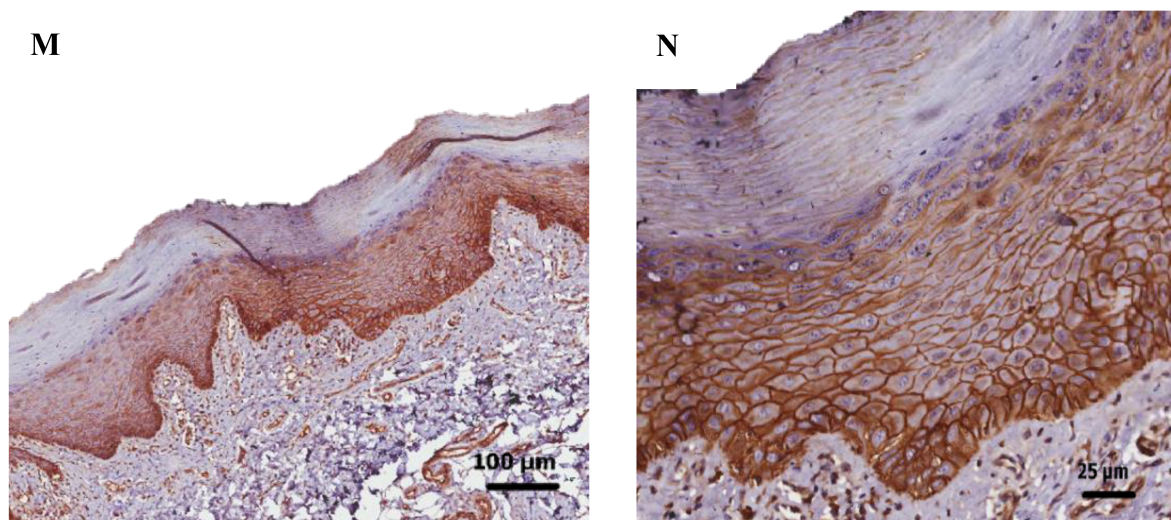
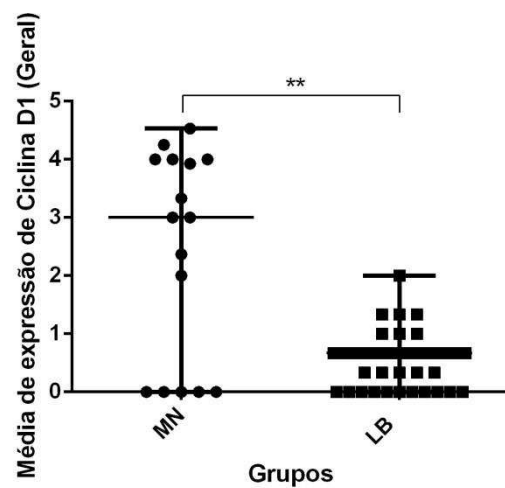
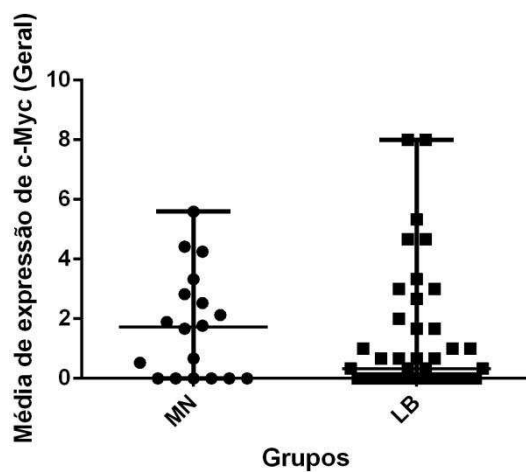
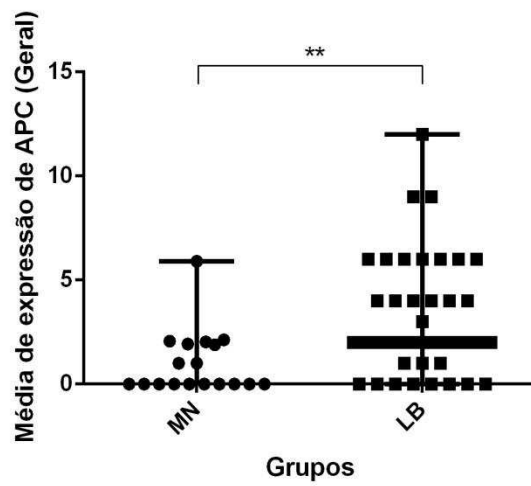
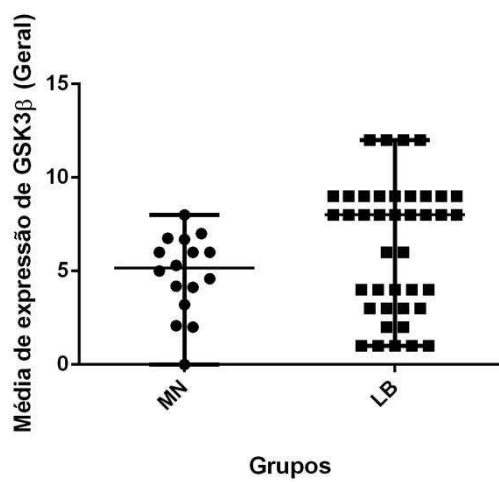
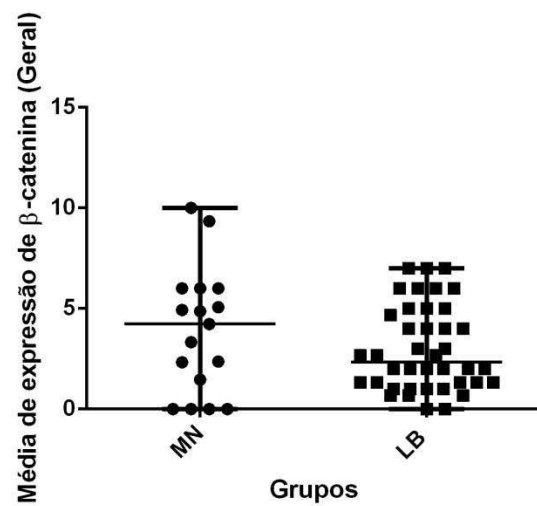
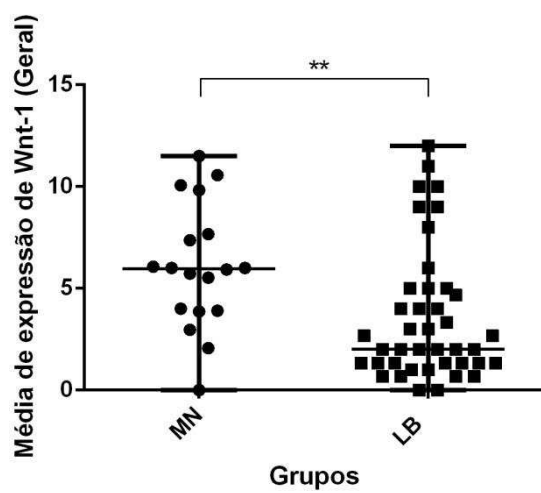


Figura 7 – Cortes histológicos de casos de leucoplasia e as respectivas reações imuno-histoquímicas para cada uma das proteínas (aumento original de 100X e 400X). Em A e B expressão membranar de intensidade moderada a forte de Wnt-1, em C e D expressão membranar de intensidade moderada a forte nas camadas basal e parabasal de β -catenina, em E e F expressão citoplasmática de intensidade fraca a moderada em todas as camadas do epitélio de APC, em G e H expressão citoplasmática de intensidade forte de GSK3 β , em I e J expressão nuclear de intensidade moderada restrita a camada basal e parabasal de CiclinaD1, em K e L expressão citoplasmática e nuclear de c-Myc e em M e N expressão membranar de intensidade moderada a forte e predominância em camada basal e parabasal de E-caderina.

Uma expressão inversa foi encontrada na avaliação de APC e E-caderina, onde se pode notar com forte poder estatístico maior expressão das proteínas no grupo LB que no grupo controle ($p=0,0015$ e $p=0,0004$) respectivamente. Para β -catenina e c-Myc, a MQ do grupo de LB foi menor que do grupo controle, entretanto, sem diferença estatística entre eles ($p=0,452$ e $p=0,314$, respectivamente). Para a proteína GSK3 β , a MQ dos pacientes com LB foi maior que no grupo controle, sendo $p=0,127$. No que diz respeito à expressão de Wnt-1 e CiclinaD1, foi encontrado uma diferença importante entre os grupos, sendo a expressão no grupo controle muito maior que no grupo LB ($p=0,001$ e $p=0,003$ respectivamente).



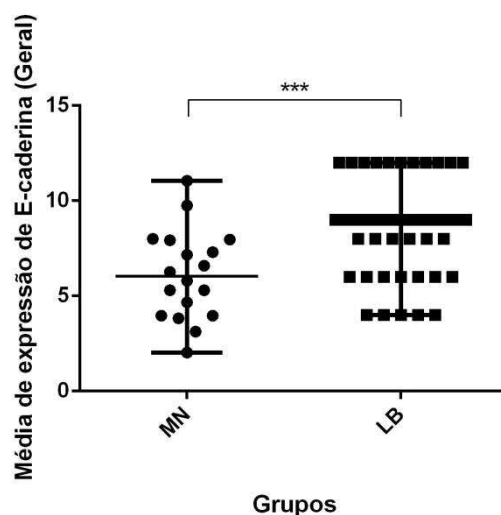


Figura 8– Expressão imuno-histoquímica de cada uma das proteínas avaliadas em relação aos grupos controle (MN) e o grupo de LB. Para todos os anticorpos estudados, empregou-se o teste não paramétrico não pareado bicaudal U Mann Whitney. Dados expressos como mediana e intervalo para todas as proteínas. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos (** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$).

4.3.2 Expressão das proteínas em relação às variáveis clínico-patológicas gerais.

Os parâmetros clinicopatológicos avaliados foram: gênero, idade, tabagismo, etilismo, localização, tamanho, gradação de displasia epitelial em alto e baixo risco e transformação maligna. Como pode ser observado na Tabela 8, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para as variáveis “localização da lesão” na proteína GSK3 β , uma vez que as lesões que acometeram a língua apresentaram maior expressão que as lesões localizadas em gengiva ($p = 0,047$) e para a variável “tamanho da lesão”, onde pode se notar uma maior expressão de Wnt-1 entre os casos menores que 200 mm² que nos casos maiores ($p = 0,0024$).

Para a variável “classificação clínica”, pode ser observada diferença importante na expressão de β -catenina, GSK3 β ; Wnt-1 e c-Myc entre o grupo de leucoplasia homogênea e leucoplasia não homogênea. Em todas as três proteínas foram encontradas uma expressão maior na forma homogênea que na forma não homogênea da doença com $p = 0,032$; $p = 0,013$; $p < 0,0001$; $p = 0,0012$ respectivamente.

No geral, a MQ das proteínas foi maior no grupo MN em comparação aos grupos LAR e LBR, exceto para a proteína GSK3 β , APC e E-caderina, cuja MQ foi maior no

grupo LBR que nos demais. Numa análise mais detalhada, a diferença na MQ entre o grupo controle (MN) e LBR foi estatisticamente significativa para as proteínas, APC e E-caderina, esta última também apresentou diferença entre os grupos MN e LAR (Figura 9). Em nenhuma das proteínas avaliadas foi encontrada diferença estatística nas MQ entre os grupos LBR e LAR.

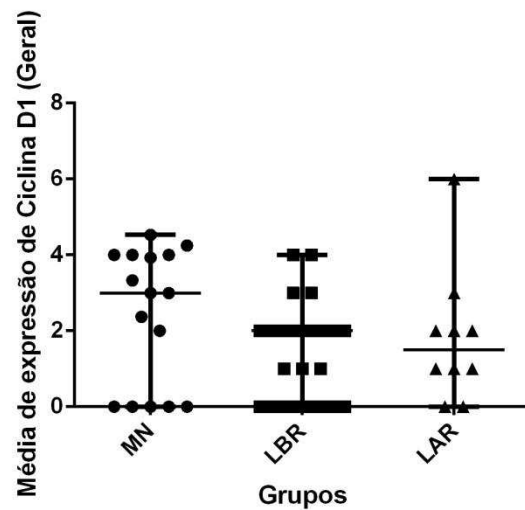
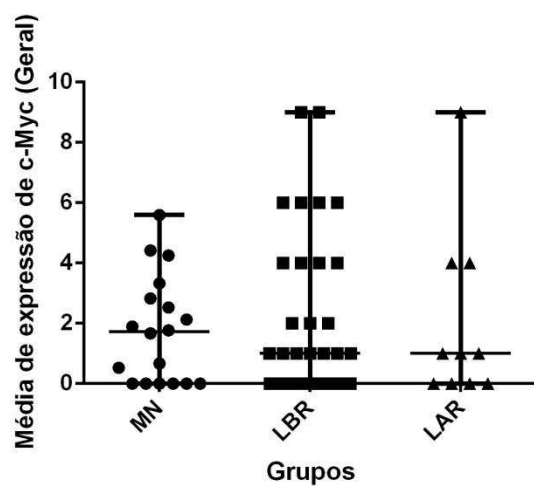
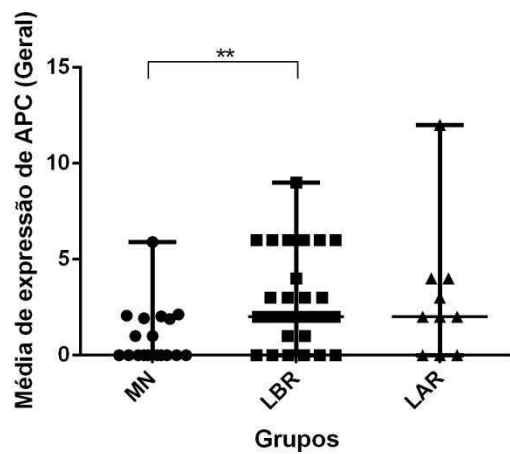
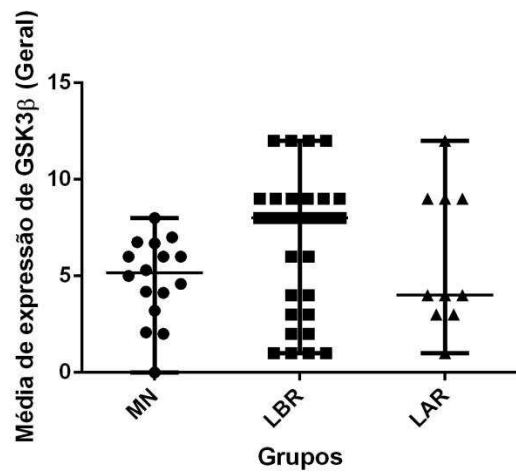
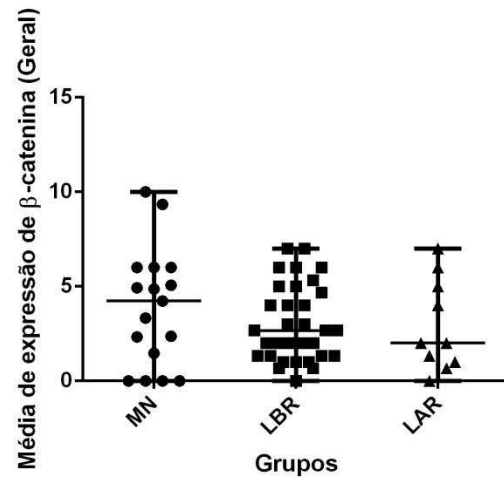
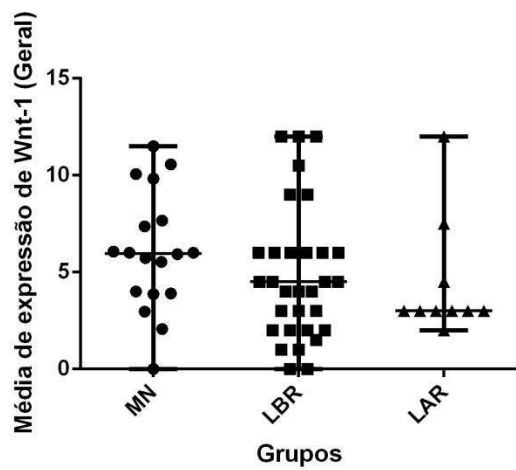
No que diz respeito aos achados qualitativos da avaliação imuno-histoquímica nos grupos LAR e LBR, não houve diferença aparente entre o compartimento, intensidade e camadas do epitélio marcadas na expressão das proteínas avaliadas.

Tabela 8 - Expressão das proteínas e a associação com as variáveis sócias demográficas e clinico-patológicas das 41 amostras de LB.

Variáveis	N ^{o1}	Proteínas													
		B-catenina MQ(I) ²	P	GSK3β MQ(I)	P	Wnt-1 MQ(I)	P	APC MQ(I)	P	Ciclina D1 MQ(I)	P	c-Myc MQ(I)	P	E-caderina MQ(I)	P
Controles	16	4,2 (0-10)	-	5,1 (0-8)	-	5,9 (0-11,5)	-	0 (0-5,9)	-	3 (0-4,5)	-	1,7 (0-5,6)	-	6 (2-11)	-
Sexo															
Masculino	23	6 (0-12)	NS	8 (1-12)	NS	6 (0-12)	NS	2 (0-9)	NS	2 (0-6)	NS	1 (0-6)	NS	9 (4-12)	NS
Feminino	18	8 (0-12)		8 (1-12)		6 (2-12)		3 (0-12)		1 (0-4)		1 (0-9)		9 (4-12)	
Idade															
< 60	26	8 (0-12)	NS	8 (1-12)	NS	4 (0-12)	NS	2 (0-9)	NS	2 (0-6)	NS	1 (0-6)	NS	9 (4-12)	NS
≥ 60	15	6 (2-12)		7 (1-12)		6 (2-12)		2 (0-12)		1 (0-3)		1 (0-9)		9 (4-12)	
Tabagismo															
Sim	32	8 (0-12)	NS	8 (1-12)	NS	6 (0-12)	NS	2 (0-12)	NS	2 (0-6)	NS	1 (0-9)	NS	9 (4-12)	NS
Não	9	6 (3-9)		8 (1-12)		4 (0-12)		3 (1-6)		0 (0-4)		0 (0-4)		9 (4-12)	
Etilismo															
Sim	13	6 (2-12)	NS	7 (1-12)	NS	6 (0-12)	NS	2 (0-9)	NS	2 (0-6)	NS	1 (0-9)	NS	9 (6-12)	NS
Não	28	8 (0-12)		8 (1-12)		6 (0-12)		2 (0-12)		1 (0-4)		1 (0-9)		8 (4-12)	
Localização															
Palato	7	9 (2-12)	NS	8 (2-12)	0,047	6 (2-12)	NS	4 (0-12)	NS	2 (0-3)	NS	1 (0-9)	NS	9 (4-12)	NS
Gengiva	5	12 (3-12)		8 (4-12)*		9 (4-12)		2 (0-3)		1 (0-2)		2 (0-9)		9 (4-12)	
Língua	5	4 (2-6)		2 (1-4)*		4 (4-6)		1 (0-4)		2 (0-2)		0 (0-1)		9 (4-9)	
Soalho Bucal	4	8,5 (0-9)		8 (3-9)		4 (4-9)		1,5 (0-2)		0,5 (0-6)		1 (0-4)		10,5 (6-12)	
Mucosa de bochecha	15	6 (0-12)		7 (1-12)		6 (0-12)		3 (0-9)		2 (0-4)		1 (0-6)		8 (6-12)	
Múltiplos	5	7,5 (3-12)		6 (1-9)		3 (0-12)		2 (0-9)		0,5 (0-6)		0 (0-4)		8,5 (4-12)	

Tamanho															
≤ 2 cm	18	8 (0-12)	NS	8 (1-12)	NS	8 (0-12)	0,0024	2 (0-9)	NS	2 (0-4)	NS	1 (0-9)	NS	9 (4-12)	NS
> 2 cm	23	6 (0-12)		4 (1-12)		4 (0-12)		2 (0-12)		1 (0-6)		1 (0-9)		9 (4-12)	
Classificação Clínica															
Homogênea	29	8 (0-12)	0,032	8 (1-12)	0,013	6 (0-12)	<0,0001	2 (0-12)	NS	2 (0-6)	NS	1 (0-9)	0,0012	9 (4-12)	NS
Não homogênea	12	6 (2-12)		4 (1-9)		3 (0-8)		2 (0-9)		0 (0-4)		0 (0-4)		9 (4-12)	
Transformação Maligna															
Sim	6	6 (2-12)	NS	3 (1-12)	NS	4 (0-12)	NS	2 (0-12)	NS	2 (0-3)	NS	1 (0-9)	NS	9 (6-12)	NS
Não	35	8 (0-12)		8 (1-12)		6 (0-12)		2 (0-9)		1 (0-6)		1 (0-9)		9 (4-12)	

1: N- número de pacientes com informações coletadas; 2: MQ(I) = mediana quickscore (Intervalo); 3: NS – não significativo. Em todas as avaliações foi utilizado o teste estatístico não paramétrico não pareado teste de Kruskal-Wallis.



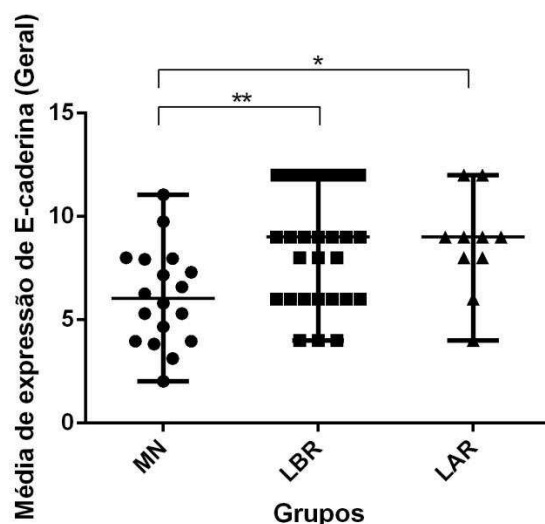


Figura 9 - Expressão imuno-histoquímica das proteínas em relação aos grupos controle, LBR e LAR. Em todas as avaliações utilizou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os dados são apresentados na forma de medianas e intervalo. Diferenças significativas estão realçadas em asteriscos (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Na avaliação da expressão proteica dos sete pacientes com mais de uma biópsia ao longo do acompanhamento não ficou evidente diferença significativa entre a amostra colhida no momento do diagnóstico e a amostra colhida em um segundo momento, durante o acompanhamento do paciente em nenhuma das proteínas avaliadas (Tabela 9).

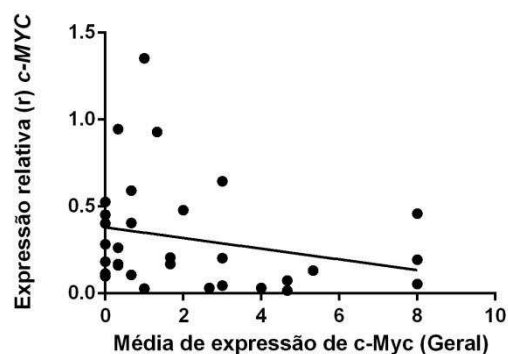
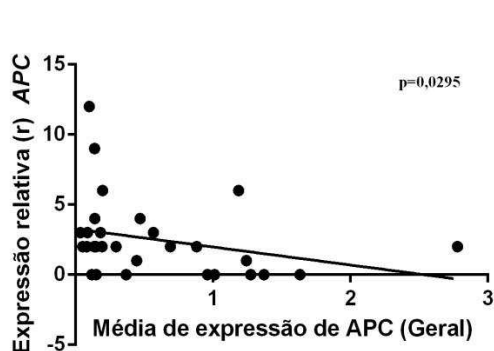
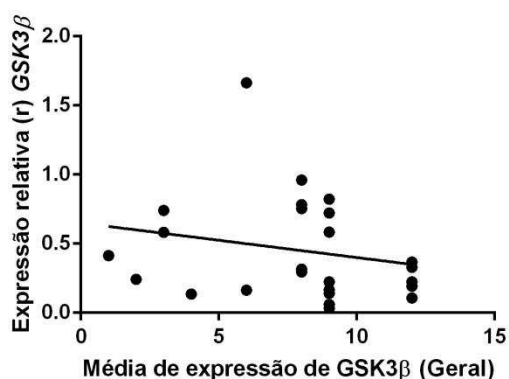
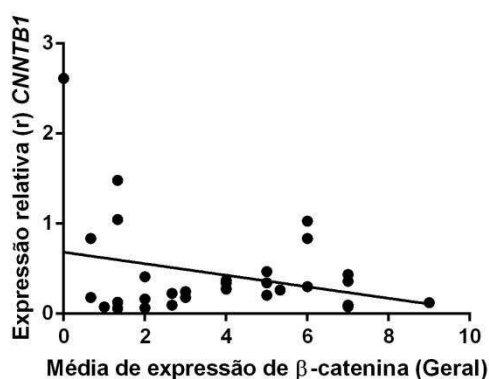
Tabela 9 – Comparativo da expressão proteica entre a primeira e segunda biópsia realizada em sete pacientes ao longo do acompanhamento clínico.

Variável	Proteína						
	Wnt-1	B-catenina	GSK3 β	APC	c-Myc	CiclinaD1	E-caderina
	MQ(I) ¹	MQ(I)	MQ(I)	MQ(I)	MQ(I)	MQ(I)	MQ(I)
1° biópsia	6 (0-12)	8 (0-12)	8 (3-12)	2 (0-9)	1 (0-6)	2 (0-3)	9 (6-12)
2° biópsia	6 (0-9)	8 (4-12)	6 (2-9)	2 (0-3)	1 (0-4)	0 (0-2)	9(6-12)
Valor de p	p=0,2636	p=0,7678	p=0,2589	p=0,2763	p=0,8427	p=0,1288	p=0,7611

*As informações constantes da Tabela são pertinentes ao momento da última biópsia: segunda biópsia para os pacientes que tiveram duas biopsias (Casos 1,2,3,4 e 7), e a terceira para aqueles que tiveram três biopsias (Casos 5 e 6)1: MQ(I) = mediana quickscore (Intervalo); Em todas as avaliações foi utilizado o teste estatístico não paramétrico não pareado bicaudal U Mann Whitney, com post-teste de Dunn.

4.4 Correlação geral entre expressão imuno-histoquímica e expressão gênica.

Em virtude da distribuição não normal da amostra estudada, foi utilizado teste de Spearman para avaliação da possível correlação entre as expressões. A Figura 10 mostra as análises de correlação entre a expressão gênica (qPCR) e expressão proteica (imuno-histoquímica) para os 30 casos avaliados. Como mostrado, uma correlação estatisticamente significativa entre as expressões gênica e proteica foi constatada apenas na avaliação de APC ($p=0,0295$). Para os demais casos avaliados, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada.



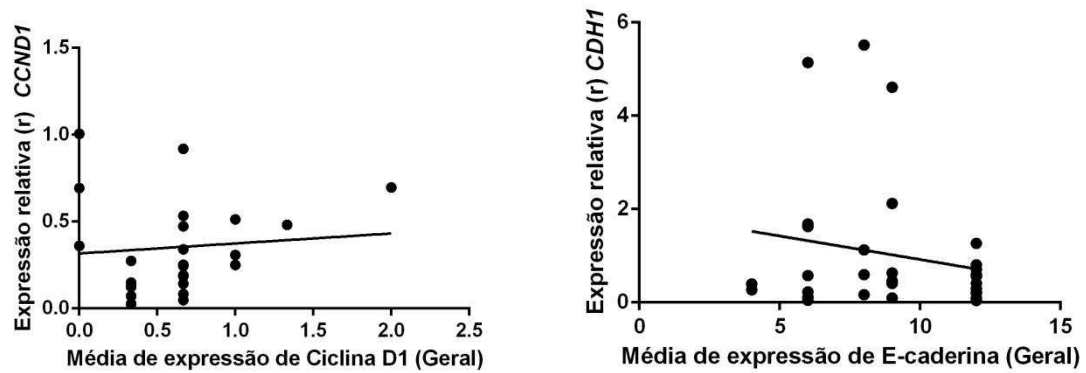


Figura 10 – Análise de correlação entre expressão gênica (qPCR) e expressão proteica (imuno-histoquímica) para todos os genes avaliados.

5. DISCUSSÃO

Por ser uma doença fortemente associada a fatores causais como o tabagismo e etilismo, existe uma grande variação na incidência encontrada, bem como no padrão de manifestação de cada lesão, uma vez que cada grupo populacional apresenta diferentes formas de consumo do tabaco, álcool e outros fatores predisponentes ou indutores análogos (Schepman et al., 1998; Holmstrup et al., 2006; Lee et al., 2006; Petti & Scully., 2006; Ariyawardana et al., 2007; Lapthanasupkul et al., 2007; Warnakulasuriya et al., 2011; Warnakulasuriya & Ariyawardana., 2016).

É possível notar na amostra avaliada neste estudo uma discreta predileção pelo gênero masculino e pico de incidência na quinta década de vida. Dados semelhantes são encontrados em estudos com grandes amostras populacionais (Lee et al., 2006; Petti & Scully., 2006; Ariyawardana et al., 2007; Lapthanasupkul et al., 2007; Ho et al., 2012). Entretanto, outros trabalhos relatam maior incidência no público feminino e apontam para o fato de que as lesões em mulheres apresentam um risco elevado de transformação maligna, sem, contudo, apresentar relevância prognóstica significativa (Schepman et al., 1998; Holmstrup et al., 2006; van der Wall., 2010; Warnakulasuriya & Ariyawardana., 2016). Dados conflitantes foram relatados por Pindborg et al., (1968) que apresentou taxas iguais de transformação maligna em homens e mulheres e Arduino et al., (2009) , que relataram maior taxa de transformação entre os homens. Apesar da preponderância do gênero masculino no presente estudo, não foi encontrada associação significativa entre gênero e transformação maligna.

Assim como neste estudo, vários outros trabalhos relatam uma predominância de pacientes usuários de tabaco, quer seja ele fumado ou mastigado (Schepman et al., 1998; Holmstrup et al., 2006; Ariyawardana et al., 2007; Lapthanasupkul et al., 2007; Roosaar et al., 2007). Apesar de o consumo de tabaco e álcool ser fator de risco conhecido para o desenvolvimento de CCEB e LB, Lee e colaboradores relataram em 2006 que, quando comparado com os pacientes não tabagistas, os que fumavam e/ou mastigavam o tabaco/nós de betel eram menos propensos a sofrer transformação maligna de suas lesões de LB. Outros pesquisadores também demonstraram que as LBs relacionadas ao tabagismo parecem ter menos potencial maligno do que aquelas não associadas ao tabaco, também chamadas de leucoplasias idiopáticas (Silverman et al., 1984; van der Wall., 2010). As razões para esses resultados paradoxais não são claras. No entanto, a

explicação mais provável é que do ponto de vista da carcinogênese em estágios, fatores que afetam o surgimento da LB podem ser diferentes daqueles responsáveis pela alta taxa de transformação maligna dessas lesões. Kaur et al., (1994) descobriram que o aumento na expressão da proteína p53 foi frequente nas LB de indivíduos que eram grandes consumidores de tabaco e betel na Índia. Dentre os 39 pacientes avaliados neste estudo, quatro interromperam o consumo de tabaco e apresentaram regressão total da lesão. Evento semelhante foi encontrado na amostra avaliada por Roosaar et al., 2007.

Evidências atuais sugerem que extensão clínica da lesão maior que 200 mm² representa risco elevado para transformação maligna como demonstrado no estudo de Holmstrup e colaboradores em 2006. Dado semelhante foi relatado por Napier e colaboradores em 2003 e por van der Wall em 2010. Neste trabalho, a maior parte das lesões apresentaram tamanhos iniciais >200 mm², e foi encontrada relação significativa entre o tamanho da lesão e transformação maligna (p = 0,0266; RR: 1,353). Ho et al., (2012) relataram que as lesões com mais de 200 mm² apresentam uma chance de transformação maligna três vezes maior que as lesões com menos de 200 mm². Todas as seis lesões que sofreram transformação maligna apresentaram tamanhos iniciais superiores a 200 mm², sugerindo que o tamanho inicial da lesão realmente apresente uma significância no prognóstico das LBs.

Embora existam evidências de alguns estudos de que o tipo clínico (Homogênea/Não homogênea) não influencia o prognóstico das LB (Chandran et al., 2013; Brouns et al., 2014), uma série de outros trabalhos referem-se a lesões brancas com um componente vermelho ou verrucoso (não homogênea) como mostrando um risco mais elevado de transformação maligna em comparação as LBs homogêneas que parecem seguir um curso benigno (Silverman et al., 1984; Schepman et al, 1998; Holmstrup et al, 2006; Liu et al, 2010; Ho et al., 2012; Warnakulasuriya S & Ariyawardana., 2016). Todos os pacientes que apresentaram remissão completa da lesão após interromper o tabagismo foram diagnosticados com LB do tipo homogênea ao passo que dentre os seis casos que sofreram transformação maligna, cinco apresentavam-se como tipo não homogêneo de lesão. Esta é uma característica importante a se considerar, tanto em termos de seleção do local de biópsia, como na proposição de tratamentos mais agressivos para as LBs não homogêneas. Caso a opção pelo acompanhamento destes pacientes sem intervenção cirúrgica curadora seja tomada, intervalos mais curtos entre as consultas são recomendados. No entanto a biópsia

continua sendo o mais importante procedimento no rastreamento e acompanhamento das displasias epiteliais (Van der Wall et al., 2009).

O sítio de acometimento predominante na presente amostra foi à mucosa de bochecha, tal como relatado pelo trabalho de Warnakulasuriya e Ariyawardana (2016) e Lapthanasupkul et al. (2007). É importante destacar que nosso achado, embora vinculado a uma amostra reduzida de casos, vai ao encontro daqueles encontrado por Bánóczy & Sugár (1972), estudando uma coorte de 520 pacientes acompanhados por 25 anos na Hungria. Este estudo é considerado um dos pilares na formulação dos conceitos clinicopatológicos da leucoplasia que hoje vigoram. Língua e assoalho da boca foram relatados como os locais mais comuns na população europeia e africana (Schepman et al., 1998; Chandran et al., 2013), o que pode ser explicado devido às diferenças geográficas e étnicas entre as populações estudadas. Alguns trabalhos também discutem a influencia que a localização topográfica da lesão tem em seu prognóstico, e relatam que os casos onde o soalho bucal é acometido, apresentam maiores índices de transformação maligna que as demais topografias (van der Waal et al., 1997; Roosaar et al., 2007; Liu et al., 2011). Esses fatores não foram relacionados com maiores taxas de transformação maligna da LB em nossa série, uma vez que 50% das lesões que sofreram transformação maligna estava localizadas em mucosa de bochecha. Contudo, deve ser salientado que a amostra avaliada por este estudo foi de conveniência e que inúmeros outros casos com localizações variadas foram excluídas como explicitado no tópico materiais e método.

A presença de displasia epitelial é geralmente aceita como um dos mais importantes e aceitos preditores de transformação maligna. Esta informação foi originalmente baseada em estudos de acompanhamento clínicos de lesões cervicais em útero (Richart & Barron, 1969), e mais tarde, em evidencias de que as LBs com displasia epitelial desenvolvem o CCEB mais frequentemente do que aqueles sem displasia (Banoczy & Siba, 1976; Silverman et al., 1984; Holmstrup et al., 2006; Ariyawardana et al., 2007; Lapthanasupkul et al., 2007). Além disso, displasia epitelial é comumente vista no epitélio adjacente aos CCEC (Katz et al., 1985). Logo, o grande desafio para o profissional é prever quais as lesões acabarão por evoluir para CCEB.

Para alguns autores, a praticidade e aplicabilidade da gradação de displasia epitelial são questionáveis (van der Waal et al., 1997; Roosaar et al., 2007; Liu et al.,

2011). Embora a LB com displasia epitelial moderada ou grave apresente uma maior disposição para a transformação maligna (Schepman et al., 1998; Liu et al., 2011; Ho et al., 2012), muitos dos casos de CCEB se originam a partir de LB sem evidencia de displasia epitelial (van der Waal., 2009; Holmstrup et al., 2006). Kujan et al. (2006) discutem as limitações encontradas na identificação de grupos objetivamente diferentes quanto ao grau de displasia, em especial na caracterização do que seria grau intermediário. Esta falta de objetividade na delimitação, acaba por gerar um olhar mais crítico na avaliação do significado desta gradação na previsão da transformação maligna das LB. Neste sentido, os autores sugerem outra abordagem. Como mencionado anteriormente no capítulo da “Introdução”, Kujan et al. (2006) identificaram parâmetros de alto e baixo risco de transformação, associando a eles determinadas características de arquitetura tecidual e de atipias. Baseados nestes dados, os autores identificaram dois grupos, um de baixo risco e outro de alto risco de transformação maligna, definindo os critérios de displasia para encaixar os casos. Desta forma, entendemos que haveria um espaço importante para testar esta proposta que, por princípio, poderia mitigar alguns inconvenientes associados ao clássico sistema de gradação ainda recomendado pela OMS (Barnes et al, 2005).

Assim, adotamos, neste trabalho, o sistema de gradação binária proposto por Kujan et al., em 2006, baseada nos critérios da OMS para diagnóstico das displasias epiteliais. Dos seis casos que sofreram transformação maligna, quatro apresentavam índices acentuados de displasia epitelial e, portanto foram classificados como sendo de alto risco de transformação (LAR). A grande maioria das lesões classificadas em LAR se localizava em mucosa de bochecha, contradizendo o que foi relatado por van der Wall et al., em 1997.

As taxas de transformação maligna são extremamente variáveis entre as diversas populações avaliadas por estudos epidemiológicos. Isso pode ser explicado pela grande variedade genética entre os povos e pelas variadas formas de contato com os fatores etiológicos. Os índices de transformação maligna podem variar de 1% e 36,4% segundo alguns estudos. (Silverman et al., 1984; Schepman et al., 1998; Neville & Day, 2002; van der Waal, 2009; Liu et al., 2011; Warnakulasuriya & Ariyawardana., 2016). No presente estudo, 15,4% dos pacientes reavaliados sofreram transformação maligna das lesões de LB, taxa considerada dentro dos padrões descritos pela literatura. Outra explicação possível para

a grande variedade de índices de transformação maligna é a variação nos critérios de diagnóstico utilizados para definição da leucoplasia bucal.

Assim como nesse estudo, Roosaar et al., (2007) encontraram que o tabagismo está presente em mais de 80% dos pacientes que apresentam transformação maligna das lesões leucoplásicas, Entretanto os estudos de Einhorn & Wersall (1967) e de Schepman et al (1998) relataram que a prevalência de transformação para CCEB entre os casos de LB foi consideravelmente menor entre os usuários do tabaco do que os outros. A média de tempo para a transformação maligna foi de 52 meses na presente amostra, valores semelhantes aos encontrados por Saito et al. (2001), Holmstrup et al. (2006) e Liu et al. (2010) e que contradizem o trabalho de Silverman et al. (1984) que relatou maiores índices de transformação maligna nos dois primeiros anos de acompanhamento e um risco diminuído depois disso. Vários estudos tentaram encontrar associação entre as variáveis clínicas e histológicas das leucoplasia com o fenômeno de transformação maligna. Dentre eles, tamanho da lesão, aspecto clínico (Homogêneo/Não homogêneo) e gradação de displasia epitelial são apontados como os mais fortes preditores de transformação maligna (Silverman et al., 1984; Schepman et al., 1998; Neville & Day, 2002; van der Waal, 2009; Liu et al., 2011; Warnakulasuriya & Ariyawardana., 2016). Neste estudo foi possível observar que apenas o tamanho ($>200\text{mm}^2$) foi associado significativamente à transformação maligna ($p = 0,0266$; RR: 1,353).

Em relação à expressão gênica geral, houve uma maior expressão relativa dos genes no grupo controle do que no grupo LB, com uma diferença estatisticamente significativa para todos os genes avaliados, exceto o gene da E-caderina (*CDH1*). Uma série de outros estudos também tem mostrado uma perda de expressão dos genes supressores de tumor E-caderina (*CDH1*) e β -catenina (*CCNTB1*) à medida que o grau de displasia aumenta e sugerem que este, possa ser um evento precoce na tumorigênese oral (Alvarado et al., 2011; Chaw et al., 2012; Kaur et al., 2013). Quando estratificamos o grupo LB em LAR e LBR, não fica evidente diferença estatística entre eles para a expressão de *CDH1*, assim como encontrado no estudo de Kyrodinou et al. em 2014. Priyadarsini et al.(2012) entretanto, em seu estudo com a indução de câncer em modelo animal, relataram uma maior expressão de *WNT-1*, *APC* e *CCNTB1* a medida que o grau de displasia epitelial aumenta. Em nosso estudo, apenas o aumento da expressão gênica de *APC*, *c-MYC* e *CCND1* foram encontradas no grupo LAR quando comparado ao grupo LBR, porém sem significância estatística.

Tsuchiya et al. (2004), de maneira oposta ao nosso estudo, encontraram uma maior expressão de *CNNTBI* e *APC* em amostras de Leucoplasia que na mucosa considerada normal, porém sem significância estatística. O mesmo estudo também encontrou maior expressão de *CNNTBI* em CCEB bem diferenciado que na leucoplasia bucal e na mucosa normal, neste caso com significância estatística. Deste modo, é amplamente divulgado em estudos com neoplasias epiteliais que ao induzir a degradação de β -catenina (*CNNTBI*) pela sua ligação com a APC, a via de sinalização Wnt é regulada negativamente. Uma vez que a atividade indutora de degradação de β -catenina foi perdida numa possível mutação ou perda de expressão do gene supressor de tumor *APC* nas neoplasias epiteliais, ocorre um acúmulo da proteína β -catenina no citoplasma celular. Com isto torna-se claro que a transcrição de genes chave na proliferação celular tais como *c-MYC* e *CCND1* foram ativadas pelo movimento de β -catenina para o núcleo celular (Largey et al., 1994; Uzawa et al., 1994; Kok et al., 2002). Embora no presente estudo tenha sido encontrada menor expressão de APC no grupo de LB que nas mucosas normais, a expressão de *c-MYC* e *CCND1* também foram maiores para o grupo de mucosa normal que nas LBs não quando deveriam ser.

O gene *GSK3 β* também apresenta papel fundamental na via, através da proteína GSK3 β que atua na degradação de β -catenina e previne seu acúmulo no citoplasma celular (Mendonça et al., 2012). Neste trabalho foi encontrada uma expressão gênica maior de *GSK3 β* nas mucosas normais que no grupo LB. Em desacordo, Andrade Filho et al. em 2011, evidenciaram maior expressão de *GSK3 β* em casos de CCEB que nas LBs. Por se tratar de um gene supressor de tumor, espera-se que sua expressão esteja possivelmente diminuída nos casos de LB, principalmente naquelas com alto risco de transformação. Quando separadas em LAR e LBR, as lesões leucoplásicas não apresentaram diferenças entre si, apenas quando comparadas com a mucosa normal apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

O proto-oncogene *CCND1*, é um importante regulador da progressão de fase G1 para da fase S em muitos tipos de células diferentes (Mishra et al., 2015). Juntamente com os seus parceiros de ligação ciclina quinase dependente 4 e 6 (CDK4 e CDK6), a CiclinaD1 forma complexos ativos que promovem a progressão do ciclo celular. A Ciclina D1 é importante para o desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer, incluindo o CCEB que ocorre pela transformação da mucosa bucal displásica (Mishra et al., 2009; Mishra et al., 2015). Em linhas gerais, a expressão de *CCND1* esta aumentada

para as displasias e CCEB (Mishra et al., 2009; Saawarn et al., 2012; Mishra et al., 2015). No presente estudo, quando fazemos uma comparação geral da expressão de *CCND1* entre os grupos MN e LB, fica evidente uma maior expressão nos tecidos normais. No entanto, quando realizamos a comparação entre MN, LAR e LBR, fica claro uma maior expressão de *CCND1* na LAR, sugerindo que um aumento na expressão deste gene pode estar envolvido com a progressão das leucoplasias bucais para o CCEB.

O gene *c-MYC* também têm sido apontado como possível proto-oncogene e um aumento de sua expressão tem sido observada frequentemente em lesões potencialmente malignas e em CCEB (Saawarn et al., 2012). De maneira contrária, este estudo encontrou uma expressão de *c-MYC* muito maior entre as mucosas normais que entre os casos de LB, com $p < 0,001$.

No que tange à expressão proteica, Wnt1, β -catenina, c-Myc e CiclinaD1 seguiram em linhas gerais, aquilo que foi descrito para a expressão gênica dos mesmos alvos. Foi encontrada maior expressão para o grupo MN que para o grupo LB, sendo que para Wnt1 e CiclinaD1 foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Para a proteína GSK3 β , APC e E-caderina ficou evidente uma maior expressão no grupo LB que no grupo MN com diferenças estatisticamente significantes para as duas última proteínas.

Em alguns estudos, a expressão imuno-histoquímica de β -catenina foi observada em displasias, de maneira semelhante ao epitélio normal. No entanto, uma redução na sua expressão tem sido encontrada nos casos onde a displasia epitelial apresenta maior gravidade (Williams et al., 1998; Lo Muzio et al., 2009; Kaur et al., 2013; Freitas Silva et al., 2014; Kyrodinou et al., 2014). De maneira semelhante, o presente trabalho também encontrou uma diminuição na expressão de β -catenina a medida que os níveis de displasia foram aumentando, sendo que a expressão em LAR foi menor que em LBR que por sua vez foi menor que nas mucosas normais. De maneira contrária ao que foi relatado neste e nos outros estudos, Bankfalvi et al. (2012) relataram que em poucos casos de sua amostra foi encontrada diminuição da expressão de β -catenina e Fujii et al. (2011) encontraram um padrão crescente de expressão deste a mucosa bucal normal, passando pela displásica até o carcinoma invasivo.

O mesmo é encontrado para a proteína E-caderina, que juntamente com β -catenina modulam o processo de adesão intercelular. Vários trabalhos também tem encontrado diminuição na expressão desta proteína em amostras de LB e CCEB (Chaw et al., 2012; Kaur et al., 2013; Freitas Silva et al., 2014; Kyrodinou et al., 2014; von Zeidler et al., 2014). A queda na expressão de E-caderina sinaliza para fenômenos de perda de adesão celular como evento precoce na progressão de lesões cancerizáveis para CCEB. Estes achados, tem sugerido que a ruptura do complexo E-caderina/ β -catenina constitui-se em evento tardio no processo de carcinogênese bucal (Willians et al., 1998). Em discordância com as informações descritas acima, este estudo evidenciou maior expressão de E-caderina entre as LB que no grupo MN ($p < 0,001$). Quando estratificamos a avaliação em LAR e LBR, nota-se menor expressão no grupo LAR, sugerindo um pior prognóstico para esse grupo de lesões.

Há ainda, uma série de estudos que relatam uma mudança na expressão de β -catenina e E-caderina do compartimento membranar para o citoplasma e núcleo, à medida que o grau de displasia se acentua (Ishida et al., 2007; Lo Muzio et al., 2009; Chaw et al., 2012; von Zeidler et al., 2014). Este fenômeno estaria diretamente envolvido com a perda de adesão celular e transcrição de genes como *c-MYC* e *CCND1*. Em nossa avaliação, não foi possível notar alterações qualitativas no padrão de expressão de β -catenina e E-caderina entre as LBR e LAR. Assim como Lo Muzio et al. (2009) não foi encontrada diferença de expressão para estas proteínas quanto comparadas suas expressões para os casos que transformaram e que não transformaram em CCEB.

Entre os componentes da via de sinalização Wnt, a proteína APC tem um papel surpreendente. Esta proteína funciona como um supressor de tumor e pode modular um grande número de funções, tais como a adesão celular, a transdução de sinal, e de ativação da transcrição de genes (Lo Muzio, 2001; Chaw et al., 2012; Sayans et al., 2012). Quando a via de sinalização Wnt não está ativada ou na ausência de uma mutação no gene de APC, a proteína APC juntamente com Axina, GSK3 β e muitas outras proteínas formam uma estrutura onde a β -catenina é prontamente fosforilada e subsequentemente degradada através de complexo ubiquitina-proteossomo (Gao et al., 2005). Em contraste, quando o gene APC está mutado ou a via de sinalização Wnt é desregulada, o complexo citoplasmático é degradado evitando assim a fosforilação de β -catenina e subsequente destruição. Como resultado, o acúmulo de β -catenina, é

transportado para o núcleo, onde a ativação da transcrição de genes alvo, tais como *c-MYC* e *CCND1*, é induzida, conduzindo a proliferação de células e inibindo a apoptose. Ao contrário do que é relatado por outros estudos (Lo Muzio, 2001; Chaw et al., 2012; Sayans et al., 2012), este trabalho encontrou uma expressão de APC maior na LBR que na LAR e MN, sugerindo que a diminuição da expressão desta proteína nem sempre é um evento marcante no processo de evolução das lesões leucoplasias.

De forma similar à proteína APC, a proteína quinase GSK3 β , também é responsável pela fosforilação de β -catenina, podendo atuar como supressora tumoral e ter sua ação diminuída durante a transformação maligna em alguns tipos de câncer (Ramljak et al., 2000; Lo Muzio, 2001; Goto et al., 2002; Mishra et al., 2015). Goto e colaboradores (2002) avaliaram a expressão de GSK3 β e ciclina D1 em 41 casos de CE de língua e encontram uma maior expressão de ciclina D1 em 66% dos casos e uma expressão reduzida de GSK3 β em 39% deles. Ademais, a redução dos níveis de GSK3 β esteve correlacionada com o aumento da expressão de ciclina D1 e menor sobrevida dos pacientes (Goto et al., 2002). Quando comparamos a expressão proteica de GSK3 β entre LBR, LAR e MN fica evidente uma redução no grupo de LAR. Isso corrobora com os demais estudos (Ramljak et al., 2000; Lo Muzio, 2001; Goto et al., 2002; Mishra et al., 2015) e aponta para um comportamento mais agressivo das leucoplasias com displasia epitelial mais acentuada.

A maioria dos estudos aponta para um aumento na expressão nuclear de c-Myc e CiclinaD1 em lesões displásicas da mucosa bucal e CCEB (Eversole & Sapp, 1993; Shintani et al., 1996; Nakahara et al., 2000; Lo Muzio, 2001; Turatti et al., 2005; Kövesi & Szende, 2006; - Papakosta et al., 2006., Santos-Garcia et al., 2006; Bascones-Martinez et al., 2012; Ramakrishna et al., 2013). As duas proteínas estão intimamente ligadas ao processo de proliferação e diferenciação celular e o aumento de sua expressão é citado como um dos principais fatores de transformação maligna de lesões displásicas (Nakahara et al., 2000; Lo Muzio, 2001; Turatti et al., 2005; Kövesi & Szende, 2006). Curiosamente em nossa avaliação foi encontrada maior expressão de c-Myc e CiclinaD1 nos tecidos normais que nas leucoplasias e quando estratificadas, a LBR apresentou expressão maior que a LAR, sugerindo que este evento não seja fator determinante na progressão das leucoplasias.

Foi também avaliada uma possível relação entre a expressão das proteínas pertencentes à via, com as variáveis clínico-patológicas da amostra estudada. Foi encontrada diferença significativa na expressão de GSK3 β entre as lesões que se localizavam gengiva e as localizadas na língua. Há uma forte discussão sobre o papel da topografia na evolução das LBs. Alguns trabalhos relatam maior índice de transformação maligna em lesões localizadas em soalho bucal e língua (van der Waal et al., 1997; Roosaar et al., 2007; Liu et al., 2011). Logo, neste mesmo raciocínio, a diminuição da expressão de GSK3 β nas lesões localizadas na língua sugere um pior prognóstico em virtude de um possível acúmulo de β -catenina que pode ocorrer.

Outro aspecto clínico que apresentou uma possível relação com a expressão proteica foi a classificação clínica da leucoplasia (Homogênea/ não Homogênea). Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na expressão de Wnt1, β -catenina, GSK3 β e c-Myc entre as duas formas clínicas. Em todos os casos houve uma maior expressão no grupo das leucoplasias homogêneas. Uma série de trabalhos relata maiores taxas de transformação maligna para as lesões não homogênea (Silverman et al., 1984; Schepman et al, 1998; Holmstrup et al, 2006; Liu et al, 2010; Ho et al., 2012; Warnakulasuriya S & Ariyawardana., 2016). Logo, levando em consideração que o aumento da expressão de Wnt1 e de c-Myc implicam em uma ativação maior da via, nossas evidências não corroboram para um melhor prognóstico das lesões homogêneas e pior para as lesões não homogênea como tem sido descrito na literatura. Por outro lado, expressão maior de β -catenina na membrana celular e de GSK3 β no citoplasma nos sugere lesões de melhor prognóstico.

Também não foi encontrada diferença significativa na expressão das proteínas aqui avaliadas entre a primeira e a última biópsia realizada pelos sete pacientes com biópsias múltiplas. Entretanto, avaliando cada um dos casos separadamente, fica evidente menor expressão de CiclinaD1 e maior expressão membranar de E-caderina e β -catenina na última biópsia dos pacientes onde houve uma regressão do tamanho da lesão, bem como do grau de displasia epitelial após a interrupção do tabagismo. Isto sugere que mudanças nos padrões comportamentais dos pacientes podem ter impacto na evolução e prognóstico das leucoplasias bucais.

Uma possível correlação entre expressão gênica e proteica de β -catenina (*CNNTB1*), GSK3 β , APC, E-caderina (*CDH1*), CiclinaD1 (*CCND1*) e c-Myc (*c-MYC*)

foi investigada. Fica evidente, de maneira estatisticamente significativa, uma correlação inversa na expressão gênica e proteica de APC, uma vez que a medida que aumenta a expressão gênica, diminui a expressão proteica. Considerando que a expressão do RNA mensageiro não está diretamente associada à presença da proteína na célula, pois mecanismos traducionais e pós-traducionais podem interferir com a produção da proteína, é provável que isso tenha acontecido na presente amostra.

Em resumo o presente trabalho mostrou evidências de que a via de sinalização WNT/ β -catenina realmente esteja ativa no processo de evolução e transformação das leucoplasias bucais, corroborando com trabalhos anteriores que buscaram identificar de maneira isolada a ativação da via. Além disso, reforçou o papel das proteínas da via na carcinogênese bucal e seu possível papel prognóstico, especialmente no que diz respeito à predição de transformação maligna.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

1. Os achados sócio-demográficos e clínico-patológicos observados na presente amostra foram similares aos publicados previamente por outros estudos. Foi também encontrado um maior risco de transformação maligna para as lesões $>200 \text{ mm}^2$.
2. A interrupção do tabagismo pode oferecer melhor prognóstico ao paciente, refletindo numa melhora clínica e histológica das LB.
3. A redução da expressão gênica de *CCNTB1*, *CDH1* e *APC* realmente parece ser um evento importante na progressão da displasia epitelial e transformação maligna de lesões leucoplásicas.
4. O aumento da expressão gênica de *CCND1* em LAR sugere maior potencial de proliferação celular e logo pior prognóstico para a doença.

REFERÊNCIAS

¹REFERÊNCIAS

- 1 - Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.: il. color. ISBN 978-85-7318-284-2 (versão impressa)
- 2 - Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med 2007; 36: 575–80.
- 3 - Laphanasupkul P, Poomsawat S, Punyasingh J. A clinic pathologic study of oral leukoplakia and erythroplakia in a Thai population. Quintessence International. 2007; 38: 448-55.
- 4 - Gale N, Pilch BZ, Sidransky D et al. Epithelial precursor lesions. In Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D eds. World Health Organization classification of tumours, pathology and genetics of head and neck tumour. Lyon: IARC Press, 2005; 177–179.
- 5 - World Health Organization Collaborating Centre for Oral Precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978; 46: 518–39.
- 6 - Axell T, Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. Community Dent Oral Epidemiol 1984; 12: 145–54.
- 7 - Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ, der van Waal I and an International Collaborative Group on Oral White Lesions. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18–21, 1994. J Oral Pathol Med 1996; 25: 49–54. 5.
- 8 - Dionne KR, Warnakulasuriya S, Zain RB, Cheong SC. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. Int J Cancer, 136: 503-515, 2014.

¹ De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

- 9 - van der Wall I. Potentially Malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol* 45: 317-323, 2009.
- 10 - Rodrigues TLC, Costa LJ, Sampaio MCC, Rodrigues FG, Costa ALL. Oral leukoplakias: clinical-histopathologic relation. *Pesqui Odontol Bras.* 2000; 14:357-3610.
- 11 - Ariyawardana A, Sitheequ MAM, Ranasinghe AW, Perera I, Tilakaratne WM, Amaratunga EAPD, et al. Prevalence of oral câncer and pre-cancer and associated risk factors among tea estate workers in the central Sri Lanka. *J oral Pathol Med.* 2007; 36: 581-7.
- 12 - Van der Wall I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010; 46:423-425.
- 13 - Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. *J Oral Sci.* 2010 Mar;52(1):13-21.
- 14 - Arduino PG, Bagan J, El-Naggar AK, Carrozzo M. Urban legends series: oral leukoplakia. *Oral Dis.* 2013 Oct;19(7):642-59. doi: 10.1111/odi.12065.
- 15 - Lee JJ, Hung HC, Cheng SJ, Chen YJ, Chiang CP, Liu BY, et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakia in Taiwan: Prevalence and risk factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 101:472-480.
- 16 - Petti S, Scully C. Association between different alcoholic beverages and leukoplakia among non- to moderate-drinking adults: a matched case-control study. *Eur J Cancer.* 2006 Mar;42(4):521-7.
- 17 - Banoczy JC, Siba A. Occurence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 42:766-774.
- 18 - Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol,* 42: 461-474, 2006.

- 19 - Warnakulasuriya S & Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol* 45: 155-166, 2016.
- 20 - Chattopadhyay A, Ray JG, Caplan DJ. AgNOR count as objective marker for dysplastic features in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2002 Oct;31(9):512-7.
- 21 – Ray JG, Chattopadhyay A, Caplan DJ. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2003 Feb;32(2):71-6.
- 22 - Fan GK, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol*. 2006 Feb;42(2):147-53.
- 23 - Chattopadhyay A, Ray JG. AgNOR cut-point to distinguish mild and moderate epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2008 Feb;37(2):78-82. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00585.x.
- 24 - Kuribayashi Y, Morita K, Tomioka H, Uekusa M, Ito D, Omura K. Gene expression analysis by oligonucleotide microarray in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2009 Apr;38(4):356-61. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00731.x.
- 25 - Scully C, Bagan JV. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. *Oral Oncol*. 2009 Jun;45(6):e25-30. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.12.011.
- 26 - Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch FX. Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med*. 2011 Sep;40(8):629-35. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01026.x.
- 27 - Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, Partridge M, Peterson DE, Woo SB. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis*. 2011 Apr;17 Suppl 1:7-22. doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01789.x.

- 28 - Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol.* 2009 Aug;45(8):647-53. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.02.006.
- 29 – Zhang L, Cheung KJ Jr, Lam WL, Cheng X, Poh C, Priddy R, Epstein J, Le ND, Rosin MP. Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. *Cancer.* 2001 Jun 1;91(11):2148-55.
- 30 - Zhang L, Rosin MP. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? *J Oral Pathol Med.* 2001 Oct;30(9):513-20.
- 31 - Islam MN, Kornberg L, Veenker E, Cohen DM, Bhattacharyya I. Anatomic site based ploidy analysis of oral premalignant lesions. *Head Neck Pathol.* 2010 Mar;4(1):10-4. doi: 10.1007/s12105-009-0151-0.
- 32 - Castagnola P, Malacarne D, Scaruffi P, Maffei M, Donadini A, Di Nallo E, Coco S, Tonini GP, Pentenero M, Gandolfo S, Giaretti W. Chromosomal aberrations and aneuploidy in oral potentially malignant lesions: distinctive features for tongue. *BMC Cancer.* 2011 Oct 13;11:445. doi: 10.1186/1471-2407-11-445.
- 33 - Zhang L, Poh CF, Williams M, Laronde DM, Berean K, Gardner PJ, Jiang H, Wu L, Lee JJ, Rosin MP. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012 Sep;5(9):1081-9. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0173.
- 34 - Bremmer JF, Brakenhoff RH, Broeckaert MA, Beliën JA, Leemans CR, Bloemena E, van der Waal I, Braakhuis BJ. Prognostic value of DNA ploidy status in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2011 Oct;47(10):956-60. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.07.025.
- 35 - Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med.* 2008 Mar;37(3):127-33. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00584.x.
- 36 - Mehanna H, Paleri V, West CM, Nutting C. Head and neck cancer--Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ.* 2010 Sep 20;341:c4684. doi: 10.1136/bmj.c4684.

- 37 - Warnakulasuriya S, Kovacevic T, Madden P, Coupland VH, Sperandio M, Odell E, Møller H. Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. *J Oral Pathol Med.* 2011 Oct;40(9):677-83. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01054.x.
- 38 - Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* 2007 Mar;13(2):126-33.
- 39 - Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998 Jul;34(4):270-5.
- 40 - Liu W, Shi LJ, Wu L, Feng JQ, Yang X, Li J, Zhou ZT, Zhang CP. Oral cancer development in patients with leukoplakia--clinicopathological factors affecting outcome. *PLoS One.* 2012;7(4):e34773. doi: 10.1371/journal.pone.0034773.
- 41 - Ho MW, Risk JM, Woolgar JA, Field EA, Field JK, Steele JC, Rajlawat BP, Triantafyllou A, Rogers SN, Lowe D, Shaw RJ. The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2012 Oct;48(10):969-76. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.04.002.
- 42 - Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006; 42: 987–93.
- 43 - Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, Van der Waal I. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Histological typing of câncer and precancer of the oral mucosa. Berlin: Springer, 1997.
- 44 - Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 2001; 194: 294–7. 8.
- 45 - Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol.* 2007 Mar;43(3):224-31.

- 46 – Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 (4).
- 47 - Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 63–9.
- 48 - Montebugnoli L, Frini F, Gissi DB, Gabusi A, Cervellati F, Foschini MP, Marchetti C. Histological and immunohistochemical evaluation of new epithelium after removal of oral leukoplakia with Nd:YAG laser treatment. *Lasers Med Sci*. 2012 Jan;27(1):205-10. doi: 10.1007/s10103-011-0941-y.
- 49 - Napier SS, Cowan CG, Gregg TA, Stevenson M, Lamey P-J, Toner PG. Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: Size (extent) matters. *Oral Oncol* 2003; 9: 129–37.
- 50 - Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):387-98. doi: 10.1038/nrc2389.
- 51 - Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jun 5;1653(1):1-24.
- 52 - MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009 Jul;17(1):9-26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- 53 - Lustig B, Behrens J. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2003 Apr;129(4):199-221.
- 54 - Dihlmann S, Doeberitz M.K. Wnt/ β -catenin pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. *International Journal of Cancer*. 2005; 113: 515-524.
- 55 - Dakeng S, Duangmano S, Jiratchariyakul W, Praty Y, Bo O, Gler P. Inhibition of WNT Signaling by Cucurbitacin B in Breast Cancer Cells: Reduction of WNT Associated Proteins and Reduced Translocation of Galectin-3-Mediated β -Catenin to the Nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2012; 113: 49–60.
- 56 - Amit S, Hatzubai A, Birman Y, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the WNT pathway. *Genes and Development*. 2002; 16: 1066-1076.

- 57 - Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. *Cancer Research*. 2004;64: 6363–6367.
- 58 - Qiang, Y.W.; Walsh, K.; Yao, L.; Kedei, N.; Blumberg, P.M.; Rubin, J.S.; Shaughnessy, J.; Rudikoff, S. WNT induce migration and invasion of myeloma plasma cells. *Blood :The American Society of Hematology*. 2005; 106: 1786-1793.
- 59 – Ye, X.; Zerlanko, B.; Kennedy, A.; Banumathy, G.; Zhang, R.; Adams, P. Downregulation of WNT signaling is an early signal for formation of facultative heterochromatin and onset of cell senescence in primary human cells. *Molecular Cell*. 2007; 20: 183-196.
- 60 – Ramachandran, I.; Thavathiru, E.; Ramalingam, S.; Natarajan, G.; Mills, W.K.; Benbrook, D.M.; Zuna, R.; Lighlfoot, S.; Reis, A.; Anant, S.; Queimado, L. WNT inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis. *Oncogene*. 2011;31: 2725-2737.
- 61 – Anastas, J.N.; Moon, R.T. WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews*. 2013; 13:11-24.
- 62 – Nusse, R.; Varmus, H. E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 1982;31: 99–109.
- 63 – Oda, H.; Yasuo, I.; Nakatsuru, Y.; Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas. *Cancer Research*. 1996; 56: 3320-3323.
- 64 – Lee, J.H.; Abraham, S.C.; Kim, H.S.; Nam, J.H.; Choi, C.; Lee, M.C.; Park, C.S.; Juhng, S.W.; Rashid, A.; Hamiton, S.R.; Wu, T.T. Inverse relationship between APC gene mutation in gastric adenomas and development of adenocarcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2002; 161:611-618.
- 65 – Miaki, M.; Lijima, T.; Kimura. Frequent mutation of β -catenin and APC gene in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Research*. 1999;59:4506-4509.

- 66 – Gerstein, A.V.; Almeida, T.A.; Zhao, G.; Chess, E.; Shih, L.M.; Buhler, K.; Pienta, K.; Rubin, M.A.; Vessela, R.; Papadopoulos, N. APC/CTNNB1 (β -catenin) pathway alterations in human prostate cancers. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 34:9-16.
- 67 – Saegusa, M.; Hashimura, M.; Yoshida, T.; Okayasu, I. β -catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. 2001; 84: 209-217.
- 68 – Takayasu, H.; Horie, H.; Hiyama, E. et al. Frequent deletions and mutations of the β -catenin gene are associated with overexpression of cyclin D1 and fibronectin and poorly differentiated histology in childhood hepatoblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2001; 7: 901-908.
- 69 – Abraham, S.C.; Klimstra, D.S.; Wilentz, R.E.; Yeo, C.J.; Conlon, K.; Brennan, M.; Cameron, J.L.; Wu, T.T.; Hruban, R.H. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor β -catenin mutations. *American Journal of Pathology*. 2002; 160: 1361- 1369.
- 70 – Clements, W. M.; Wang, J.; Sarnaik, A. β -catenin mutation is a frequent cause of WNT activation in gastric cancer. *Cancer Research*. 2002; 62: 3503-3506.
- 71 – Breuhahn, K.; Longerich, T.; Schirmacher, P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2006; 25: 3787-3800.
- 72 – Aquilera, O.; Fraga, M.F.; Ballestar, E.; Paz, M.F.; Espada, J.; Garcia, J.M.; Munoz, A.; Esteller, M.; Gonzalez-Sancho, J.M. Epigenetic inactivation of the WNT antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2006; 29: 4116-4121.
- 73 – Chan, S.L.; Cui, Y.; Van Hasselt, A.; Srivastava, G.; Jin, H.; Ng, K.M.; Wang, Y.; Lee, K.T.; Tsao, G.S.; Zhong, S.; Robertson, K.D.; Rha, S.Y.; Chan, A.T.; Tao, Q. The tumor suppressor WNT inhibitory factor 1 is frequently methylated in nasopharyngeal and esophageal carcinomas. *Laboratory Investigation*. 2007; 87: 344-650.
- 74 - Sato, H.; Suzuki, H.; Toyota, M.; Nojima, M.; Maruyama, R.; Sasaki, S.; Takagi, H.; Sogabe, Y.; Sasaki, Y.; Idogawa, M.; Sonoda, T.; Mori, M.; Imai, K.; Tokino, T.; Shinomura, Y. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF family genes in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis*. 2007; 12: 2459-2466.

- 75 - Veeck, J.; Wild, P.; Fuchs, T.; Schuffler, P.J.; Hartmann, A.; Ruth, K. Prognostic relevance of WNT-inhibitory factor-1 (WIF1) and Dickkopf-3 (Dkk3) promoter methylation in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2009; 9: 217.
- 76 - Liu SC, Kein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol*. 2000; 36: 145-151.
- 77 – Lo Muzio L. A possible role for the Wnt-1 pathway in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001; 12: 151-165.
- 78 – AbdulMajeed AA & Farah CS. Can immunohistochemistry serve as an alternative to subjective histopathological diagnosis of oral epithelial dysplasia? *Biomarker Cancer* 2013; 5:49-60.
- 79 – Varelas X, Bouchie MP, Kukuruzinska MA. Protein N-glycosylation in oral cancer: dysregulated cellular networks among DPAGT1, E-cadherin adhesion and canonical Wnt signaling. *Glycobiology*. 2014; 24: 579-591.
- 80 – Sridevi U, Jain A, Nagalaxmi V, Kumar UV, Goyal S. Expression of E-cadherin in normal oral mucosa, in oral precancerous lesions and in oral carcinomas. *Eur J Dent*. 2015; 9: 364-372.
- 81 – Willians HK, Sanders DAS, Jankowski JAZ, Landini G, Brown MAS. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27: 308-317.
- 82 – Nakahara Y, Shintani S, Minihara M, Kiyota A, Yeyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16 INK4A and cyclin d1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2000; 160: 3-8.
- 83 – Bánkfalvi A, Krabort M, Végh, A, Feszeghy E, Piffko J. Deranged expression. Of the E-cadherin/ β -catenin complex and the epidermal growth factor receptor in the clinical evolution and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2002; 31: 450-457.
- 84 – Sikdar N, Paulo RR, Panda CK, Banerjee SK, Roy B. Loss of heterozygosity at APC and MCC genes of oral cancer and leukoplakia tissues from Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32: 450-454.

- 85 – Kövesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27 and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35: 274-277.
- 86 – Warnakulasuriya KAAS, McDonald DG. Epithelial kinetics in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 1995; 24: 163-169.
- 87 – Turatti E, Neves AC, Magalhães MHCG, Sousa SOM. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci.* 2005; 447: 71-76.
- 88 – Santos-Garcia A, Abad-Hernandez MM, Fonseca-Sanchez E, Julian-Gonzalez R, Villardon-Garlindo P, Curz-Hernandez JJ, Bullon-Sopelana A. E-cadherin, laminin and collagen IV expression. In the evolution from dysplasia to oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Oral.* 2006; 11: E100-105.
- 89 – Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, Nohno T. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer.* 2007 Oct 9;6:62.
- 90 – Lo Muzio L, Lo Russo L, Falaschini S, Ciavarella D, Pentenero M, Arduino P, Favia G, Maiorano E, Rubini C, Pieramici T, Gandolfo S. β - and γ -catenin expression in oral dysplasia. *Oral Oncol.* 2009; 45: 501-504.
- 91 – Fujii M, Katase N, Lefeuvre M, Gunduz M, Buery RR, Tamamura R, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. Dickkopf (Dkk)-3 and β -catenin expressions increased in the transition from normal oral mucosal to oral squamous cell carcinoma. *J Mol Hist.* 2011; 42: 499-504.
- 92 – Bascones-Martinez A, Lopes-Duran M, Cano-Sanchez J, Sanchez-Verde L, Diez-Rodriguez A, Aguirre-Echebarria P, Alvarez-Fernandez E, Gonzales-Molez MA, Bascones-Ilundain J, Lo Muzio L, Campo-Trapero J. Differences in the expression. Of five senescence markers in oral cancer, oral leukoplakia and control samples in humans. *Oncol Lett.* 2012; 3: 1319-1325.
- 93 – Lo J, McNaughtan J, Rani V, Maric D, Smith A, McCullough M, Candu A. An immunohistochemical analysis of cell cycle markers in oral mucosal dysplastic lesions treated by laser therapy. A pilot study. *J Maxillofac Oral Surg.* 10: 190-194.

- 94 – Mishra R, Das B. Cyclin D1 expression and its possible regulation in chewing tobacco mediated oral squamous cell carcinoma progression. *Arch Oral Biol.* 2009; 54:917-923.
- 95 – Ramasubramanian A, Ramani P, Sherlin HJ, Premkumar P, Natesan A, Thiruvengadam C. Immunohistochemical evaluation of oral epithelial dysplasia using cyclin-D1, p27 and p63 expression as predictors of malignant transformation. *J Nat Sc Biol Med.* 2012.
- 96 – Yogesh TL, Narayan TV, Shreedhar B, Shashidara R, Leekymohanty. The expression of E-cadherin and cathepsin-D in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: a comparative analysis between immunohistochemistry and routine histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011; 15: 288-294.
- 97 – Ramakrishna A, Shreedhar B, Narayan TV, Mohanty L, Shenoy S, Jamadar S. Cyclin D1 and early biomarker in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2013; 17: 351-357.
- 98 – Kaur J, Sawhney M, DattaGupta S, Shukla NK, Srivastava A, Walfish PG, Ralhan R. Clinical significance of altered expression of β -catenin and E-cadherin in oral dysplasia and cancer: potential link with ALCAM expression. *PLoS One.* 2013 Jun 28;8(6):e67361. doi: 10.1371/journal.pone.0067361.
- 99 – Kyrodimou M, Andreadis D, Drougou A, Amanatiadou EP, Angelis L, Barbatis C, Epivatianos A, Vizirianakis IS. Desmoglein-3/ γ -catenin and E-cadherin/ β -catenin differential expression. In oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest.* 2014; 18: 199-210.
- 100 - Freitas Silva BS, Yamamoto-Silva FP, Pontes HAR, Santos Pinto Jr D. E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 43: 125-131.
- 101 – von Zeidler SV, Botelho TS, Mendonça EF, Batista AC. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer.* 2014; 14: 972-978.

- 102 – Freitas Silva BS, Castro ca, Von Zeidler SLV, Sousa COM, Batista AC, Yamamoto-Silva FP. Altered β -catenin expression. in oral mucosal dysplasia: a comparative study. J Appl Oral Sci. 2015; 23: 472-478.
- 103 – Largey JS, Meltzer SJ, Sauk JJ, Hebert CA, Archibald DW. Loss of heterozygosity involving the APC gene in oral squamous cell carcinomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994 Mar;77(3):260-3
- 104 – Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu CJ, Sørensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and beta-Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med. 2005 Feb;34(2):116-9.
- 105 – Goto H, Kawano K, Kobayashi I, Sakai H, Yanagisawa S. Expression of cyclin D1 and GSK-3 β and their predictive value of prognosis in squamous cell carcinomas of the tongue. Oral Oncol. 2002 Sep;38(6):549-56.
- 106 – Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. Oral Oncol. 1998 Jul;34(4):270-5.
- 107 – Pindborg JJ, Renstrup G, Jolst O, Roed-Peterson B. Studies in oral leukoplakia: A preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based in a follow-up study of 248 patients. J Am Dent Assoc 1968; 76: 767–71.
- 108 – van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. Oral Oncol. 2010 Jun;46(6):423-5. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.02.016. Epub 2010 Mar 21.
- 109 - Arduino PG, Surace A, Carbone M, et al. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. J Oral Pathol Med 2009; 38: 540–4.
- 110 – Roosaar A, Yin L, Johansson AL, Sandborgh-Englund G, Nyrén O, Axéll T. A long-term follow-up study on the natural course of oral leukoplakia in a Swedish population-based sample. J Oral Pathol Med. 2007 Feb;36(2):78-82.

- 111 - Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;53:563-8.
- 112 – Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Overexpression of p53 protein in betel- and tobacco-related human oral dysplasia and squamous-cell carcinoma in India. *Int J Cancer* 1994;58: 340-5.
- 113 – Chandran R, Meer S, Feller L. Oral leukoplakia in a South African sample: a clinicopathological study. *Oral Dis.* 2013 Sep;19(6):592-7. doi: 10.1111/odi.12040
- 114 - Brouns E, Baart J, Karagozoglu Kh, Aartman I, Bloemena E, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. *Oral Dis.* 2014 Apr;20(3):e19-24. doi: 10.1111/odi.12095.
- 115 – Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer.* 2010 Dec 16;10:685. doi: 10.1186/1471-2407-10-685.
- 116 - van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997 Sep;33(5):291-301.
- 117 – Richart RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol.* 1969 Oct 1;105(3):386-93.
- 118 – Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.
- 119 – Einhorn J, Wersall J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. *Cancer.* 1967 Dec;20(12):2189-93.
- 120 – Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notani K, Totsuka Y, Shindoh M, Fukuda H. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: with respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Feb;30(1):49-53.
- 121 – Alvarado CG, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Kobayashi T, Yamazaki M, Takagi R, Saku T. Nuclear translocation of β -catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. *Histopathology.* 2011 Aug;59(2):283-91. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03929.x.

- 122 - Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers--E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin--in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol.* 2012 Oct;48(10):997-1006. doi: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.011.
- 123 – Vidya Priyadarsini R, Senthil Murugan R, Nagini S. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway contributes to the sequential progression of DMBA-induced HBP carcinomas. *Oral Oncol.* 2012 Jan;48(1):33-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.08.008. Epub 2011 Sep 15.
- 124 – Tsuchiya R, Yamamoto G, Nagoshi Y, Aida T, Irie T, Tachikawa T. Expression of adenomatous polyposis coli (APC) in tumorigenesis of human oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004 Oct;40(9):932-40.
- 125 – Uzawa K, Yoshida H, Suzuki H, Tanzawa H, Shimazaki J, Seino S et al. Abnormalities of the adenomatous polyposis coli gene in human oral squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1994;58:814–7.
- 126 - Kok SH, Lee JJ, Hsu HC, Chiang CP, Kuo YS, Kuo MY. Mutations of the adenomatous polyposis coli gene in areca quid and tobacco-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2002;31:395–401.
- 127 – Mendonça DF, Chammas R, Liu FT, Nonogaki S, Cardoso SV, Loyola AM, de Faria PR. The inactive form of glycogen synthase kinase-3 β is associated with the development of carcinomas in galectin-3 wild-type mice, but not in galectin-3-deficient mice. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(6):547-54.
- 128 - Andrade Filho PA, Letra A, Cramer A, Prasad JL, Garlet GP, Vieira AR, Ferris RL, Menezes R. Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer. *J Dent Res.* 2011 Jun;90(6):740-6. doi: 10.1177/0022034511401622.
- 129 - Saawarn S, Astekar M, Saawarn N, Dhakar N, Gomateshwar Sagari S. Cyclin D1 expression and its correlation with histopathological differentiation in oral squamous cell carcinoma. *Sci World J.* 2012.
- 130 - Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 α / β and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in

oral squamous cell carcinoma progression. *Mol Cancer*. 2015 Feb 3;14:20. doi: 10.1186/s12943-015-0300-x.

131 - Ramljak D, Calvert RJ, Wiesenfeld PW, Diwan BA, Catipovic B, Marasas WFO, et al. A potential mechanism for fumonisin B1-mediated hepatocarcinogenesis: cyclin D1 stabilization associated with activation of Akt and inhibition of GSK-3 β activity. *Carcinogenesis* 2000;21:1537–46.

132 - Eversole LR, Sapp JP. c-myc oncoprotein expression in oral precancerous and early cancerous lesions. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1993 Apr;29B(2):131-5.

133 - Shintani S, Matsumura T, Alcalde R, Yoshihama Y. Sequential expression of myc-, ras-, oncogene products and EGF receptor during DMBA-induced tongue carcinogenesis. *Int J Oncol*. 1996 Apr;8(4):821-6.

134 - Papakosta V, Vairaktaris E, Vylliotis A, Derka S, Nkenke E, Vassiliou S, Lazaris A, Mourouzis C, Rallis G, Spyridonidou S, Anagnostopoulou S, Perrea D, Donta I, Yapijakis C, Patsouris E. The co-expression of c-myc and p53 increases and reaches a plateau early in oral oncogenesis. *Anticancer Res*. 2006 Jul-Aug;26(4B):2957-62.

135 - Bánóczy J, Sugár L. Longitudinal studies in oral leukoplakia. *J Oral Pathol*. 1972; 1: 265-272.

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA EXPRESSÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/ β -CATENINA EM AMOSTRAS DE LEUCOPLASIA ORAL E SUA RELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS COM ÊNFASE NA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA

Pesquisador: ADRIANO MOTA LOYOLA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 04461813.1.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 680.597

Data da Relatoria: 25/04/2014

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo:

As leucoplasias são as lesões mais cancerizáveis, sendo 1% das lesões bucais e 4 a 10% se transformam em câncer. Não é possível identificar um marcador que denuncie, precisamente, esta evolução. A via WNT tem sido identificada com uma via de sinalização extremamente importante na modulação de processos de crescimento e diferenciação que ocorrem na embriogênese e formação dos tecidos e órgãos do nosso organismo. O presente estudo, pretende avaliar a expressão proteica de diferentes mediadores desta via, níveis de transcrição gênica de fatores de transcrição associados, bem como possíveis alterações epigenéticas envolvidas na modulação desta transcrição.

Serão utilizadas amostras frescas e/ou fixadas em formol e incluídas em parafina da qual dissecaremos o epitélio da lesão. As amostras coletadas retrospectivamente serão provenientes dos arquivos dos laboratórios de Patologia vinculados ao Hospital de Clínicas e do Hospital Odontológico. As amostras frescas serão divididas em duas alíquotas: uma será fixada em formol e incluída em parafina; a outra será incluída em tissuetek, previamente tratada com um preservador

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4395 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 030.597

de RNA. Nestas amostras realizaremos os seguintes experimentos: Ensaio imunohistoquímico e avaliação da expressão das proteínas da via Wnt.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar a expressão gênica e seus produtos relacionadas à via da ativação do gene Wnt em leucoplasia oral e verificar sua associação com o comportamento biológico e o prognóstico dos pacientes acometidos.

Objetivos secundários:

1. Identificar e quantificar a expressão das proteínas Wnt1, Wnt3, Wnt5, GSK3- β , β -catenina, ciclina D1, c-myc e APC da via canônica de sinalização Wnt nos casos com diagnóstico de leucoplasia;
2. Analisar a presença de associação entre a expressão dos diferentes produtos gênicos da via canônica Wnt mencionados acima com fatores clinicopatológicos das leucoplasias;
3. Avaliar a transcrição dos genes C-myc e ciclina D1 em leucoplasias bucais;
4. Avaliar o padrão de metilação dos genes c-myc e ciclina D1 em leucoplasias bucais;
5. Analisar possível associação entre níveis de metilação e expressão gênica, e níveis de expressão gênica e de produtos proteicos dos genes C-MYC e CICLINA D1.
6. Analisar possíveis associações entre níveis de transcritos e de proteínas da via WNT com o grau de displasia e prognóstico das leucoplasias, com ênfase na transformação maligna.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, os riscos serão os decorrentes do contato com os pacientes e os referentes a realização da biópsia(sangramentos, infecções), porém esses serão minimizados.

Benefícios: diagnóstico e prognóstico das leucoplasias e conduta aos pacientes, além de avaliar o comportamento histológico das leucoplasias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem detalhado.

Estudo prospectivo.

Numero de participantes: 60.

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3236-4151 Fax: (34)3236-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 000.597

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Havia a pendência de adequação do cronograma no word e na plataforma.

Foi modificado o cronograma, embora no word tenha sido colocado no ano de 2014, os prazos de 1°, 2°, 3° e 4° períodos, porém adequados.

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Final ao CEP/UFU: julho de 2015.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 466/12, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 Fax: (34)3239-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

Resolução CNS 466/12, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma via original do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente a ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também a mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, Item III.2.e).

UBERLÂNDIA, 09 de Junho de 2014

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Neves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica CEP: 38.408-144
UF: MG Município: UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3236-4131 Fax: (34)3236-4335 E-mail: cep@propp.ufu.br

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar da pesquisa ***“ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT/ β -CATENINA EM AMOSTRAS DE LEUCOPLASIA ORAL E SUA RELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS COM ÊNFASE NA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA.”***, sob a responsabilidade dos pesquisadores: Luiz Fernando Barbosa de Paulo e Prof. Dr. Adriano Mota Loyola.

Nesta pesquisa nós tentaremos entender melhor a evolução de uma doença chamada leucoplasia, que é uma mancha branca que surge na boca e pode virar câncer. Para isso, faremos um estudo dos pacientes que apareceram com estas manchas na boca entre os anos de 1997 e 2012 na Faculdade de Odontologia - UFU. Os responsáveis pelo estudo entregarão e explicarão a cada paciente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para decidirem se querem ou não participar do estudo. Os participantes responderão a perguntas sobre a doença e, após serem examinados, serão submetidos a retirada de um pequeno pedaço da mancha branca para estudo.

Caso você concorde em participar, esclarecemos que você não receberá pagamento em dinheiro ou qualquer outro tipo de vantagens por participar do projeto. Esclarecemos que os gastos com seu deslocamento (transporte coletivo, ônibus), caso necessário, serão pagos pelos responsáveis pelo estudo.

Esclarecemos que os procedimentos para remoção da mancha oferecem baixo risco à sua saúde, sendo semelhantes aos que existem em pequenas cirurgias, que incluem: pequenos sangramentos e infecção. Todos os procedimentos clínicos e cirúrgicos que serão realizados neste estudo estão dentro do que é recomendado para o diagnóstico e tratamento das manchas brancas.

O benefício direto deste estudo para o paciente será descobrir alguma informação que ajude a identificar qual mancha branca poderá virar câncer e qual paciente precisará de cuidados médicos por mais tempo.

Da mesma forma, as informações sobre sua doença serão registradas e guardadas em local seguro para que nenhuma outra pessoa que não esteja envolvida no estudo possa saber.

Em nenhum momento desse estudo você será identificado, seus dados pessoais ou mesmo os de sua doença serão expostos publicamente. Para isto, todos os seus dados serão identificados por um número de registro criado pela equipe responsável, garantindo segredo absoluto. Os resultados deste estudo serão mostrados ou registrados apenas em revistas científicas

A sua participação ou não neste projeto não influenciará de nenhuma forma no tipo e na qualidade do atendimento odontológico que você está recebendo ou poderá receber no futuro. Você poderá comunicar, a qualquer momento, aos responsáveis pelo estudo, a sua desistência e o apagamento do registro de seus dados. Também, em qualquer momento, você poderá pedir para saber sobre os resultados do estudo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você. Caso queira se informar de mais detalhes desta pesquisa agora ou no futuro, poderá entrar em contato com a equipe responsável: Luiz Fernando Barbosa de Paulo e Prof. Dr. Adriano Mota Loyola. Universidade Federal de Uberlândia – Área de Patologia Bucal, Av. Pará, 1720, bloco HC, 38405-900 Uberlândia- MG, Brasil., de segunda à sexta feira das 08:00 às 16:00, ou ainda pelos telefones: (34) 32182703/ (34) 91502909. O senhor(a) poderá também se quiser entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, na Universidade Federal de Uberlândia CEP/UFU, Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco 1A, sala 224, Campus Santa Mônica, Uberlândia – MG, CEP 38408-100; telefone: (34)3239-4131;

Uberlândia, ____ de ____ de 2013.

Assinatura do pesquisador que coletará o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

Assinatura do participante da pesquisa ou representante legal