UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Quantificação de LEKTI, Caliceína 5 e Caliceína 7 em lesões epiteliais
pré-malignas e malignas da cavidade oral**

MÁRCIA GAIÃO ALVES

RIBEIRÃO PRETO- SP

2020

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Quantificação de LEKTI, Caliceína 5 e Caliceína 7 em lesões epiteliais
pré-malignas e malignas da cavidade oral**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof^a Dr^a Katiuchia Uzzun Sales

**Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da
Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da
USP (BDTD).**

RIBEIRÃO PRETO -SP
2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

ALVES, MÁRCIA GAIÃO

Quantificação de LEKTI, Calicreína 5 e Calicreína 7 em lesões epiteliais pré-malignas e malignas da cavidade oral. Ribeirão Preto, 2020

81 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Sales, Katiuchia Uzzun

1.Carcinomas oral. 2.Calicreína 5. 3.Calicreína 7. 4.LEKTI. 5.Biomarcadores

Aluno: Márcia Gaião Alves

Título: Quantificação de LEKTI, Calicreína 5 e Calicreína 7 em lesões epiteliais pré-malignas e malignas da cavidade oral.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Prof^a Katiuchia Uzzun Sales.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof (a). Dr (a): _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender. ”

Marie Curie

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai **Valtersom Alves** (*in memoriam*),
Que me mostrou a beleza da vida e deixou seu legado de retidão e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus**, aquele que acredito ser a fonte da vida, sem ele nada existiria. Não me desamparaste nos momentos mais difíceis, ao Senhor, toda honra e toda glória para sempre.

Agradeço à minha família:

Minha mãe **Edna Gaião Alves** e vó **Helena Silvério Gaião**, que são os alicerces da minha educação, nunca pouparam esforços e incentivos para que eu me tornasse uma pessoa de bom caráter. Muitas vezes reivindicaram de benefícios próprios para garantir meu bem-estar. Muito obrigada por toda dedicação, e por serem estes exemplos de amor, resiliência, fé e honestidade. Se a humanidade tiver alguma colaboração benéfica por minha parte, estas grandes mulheres serão as responsáveis.

Ao meu amado **Felipe Carvalho Pellison**, por me proporcionar tanto amor, em sua forma mais genuína e incondicional. Este amor me faz enxergar as cores da vida, quando tudo parece cinza, e acredita em mim mais que eu mesma. Compartilhar a vida com este admirável homem faz-me sentir a mais afortunada, dentre todas as mulheres.

Aos meus irmãos **Mirian Alves Simplício**, **Valterson Alves Junior** e cunhado **Sérgio Carlos Simplício**, pelo exemplo, pela parceria na jornada da vida, e me presentear com tesouros tão valiosos: **meus sobrinhos**.

Aos meus tios **Esmair Gaião** e **Saulo Alves**, que representaram as figuras paternas na falta de meu pai. Obrigada por garantirem que eu nunca estivesse desamparada.

As minhas tias **Maria Madalena Silvério**, **Joana Darque Silvério de Lima** e **Leonilda Silvério Teodoro**, grandes mulheres, que tanto torcem por mim. Muito obrigada pela preocupação, e carinho.

Agradeço aos meus sogros **Eliana Carvalho Pellison**, **Wilson Pellison** e cunhada **Natália Carvalho Pellison**, por me receberem com tanto carinho em vossa família. Obrigada por serem estes exemplos de corações tão belos.

Agradeço aos meus queridos avós **Elidio Gaião**, **José Alves** e **Hilda Maria Alves**, já não estão mais entre nós, mas fizeram parte da fase mais doce de minha vida, a infância. Sem eles minha existência não seria possível.

Agradecimentos especiais:

À minha orientadora **Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**, por toda confiança, e empenho ao longo destes quase 6 anos. Sempre estive em prontidão em ajudar e me guiar nesta jornada. Muito obrigada por sempre querer o melhor para mim e este trabalho, por todos os ensinamentos, e conselhos. Acompanhou meu amadurecimento profissional e teve grande relevância neste processo. Tenho orgulho de ser uma de suas primeiras alunas, e fazer parte de sua carreira, que é e será de grande sucesso.

Agradeço aos docentes que se disponibilizaram a fazer parte da **banca examinadora**. Obrigada pelo tempo, e atenção dedicados na avaliação deste trabalho.

Agradecimento aos amigos do Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer:

Agradeço minha estimada amiga **Dra. Elaine Zayas Marcelino da Silva**. Com toda sua experiência, sempre foi uma fonte de sabedoria e conselhos científicos. Muito obrigada por toda ajuda, que foi de grande relevância neste trabalho. Além do mais, uma amizade que sempre estará guardada em meu coração.

À minha grande amiga **Marina Cândido**, companheira de bancada e de “gordices”, seu inesgotável bom humor e sorriso deixou meu dia-a-dia mais alegre.

À nossa querida técnica **Carol Kobori**, pelo socorro imediato nas horas de desespero e com carinho, similar ao de mãe, nunca me deixou desistir frente aos desafios.

À minha mentora **Dra. Lara Maria Alencar Innocentini**, colaborou de forma direta com meu aprendizado, sempre me inspirando profissionalmente e como mulher.

Aos meus companheiros de bancada e amigos, **Bruno Martinelli Gomes, Gabriel Viliod Vieira, Marcio Hideki Kodama e Rodrigo Alberto Alves da Silva**, carinhosamente apelidados por “clube do bolinha”, homens portadores de uma imensa gentileza. Muito obrigada por sempre compartilhar seus conhecimentos, e nunca medir esforços em ajudar.

Agradeço também aos demais alunos que passaram pelo laboratório, cada um colaborou de alguma forma com meu crescimento e amadurecimento científico, muito obrigada pela parceria e apoio.

À Universidade de São Paulo:

Aos docentes da **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, em especial do **Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes patogênicos**, que são fonte de admiração e incentivo. Muito obrigada por compartilhar comigo tanto conhecimento.

Aos técnicos do departamento, em especial, **Mara Costa, Vani Alves, Roberta Rosales**, e **José Augusto Maulin** pelo suporte acadêmico e científico. Sempre me guiaram e mostraram estradas menos tortuosas na caminhada científica.

As secretárias **Gabriela Bunhotto Zamoner, Lúcia Helena Picinato Raphael e Camila Fabris**, muito obrigado pelo ótimo serviço prestado e pela atenção dispensada a nós, alunos.

Aos demais **funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** que colaboraram de forma direta e indireta com este trabalho. Todos são engrenagens essenciais para o bom funcionamento desta universidade.

Agradeço a Também:

À **Dra. Ana Carolina Santana**, uma grande amiga, que tive o privilégio de conhecer através da pós-graduação, muito obrigada por todo carinho e socorro em diversas horas, seu exemplo como cientista sempre me inspirou. Além do mais, obrigada pela ótima companhia em momentos de lazer, quando nossa trilha sonora: *“Girls just wanna have fun”* vinha à nossa mente.

Aos meus amigos do **laboratório Hemac**, pela cumplicidade, e por me proporcionar um ambiente de trabalho leve e feliz. Nos meus momentos de cansaço extremo e desânimo não economizaram em palavras de incentivo.

Aos estimados **Porf. Dr. José Carlos Alves Filho**, pela oportunidade de colaborar com um de seus impecáveis trabalhos.

Ao meu colaborador **Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva**, por me receber com tanta hospitalidade em seu laboratório e me conceder total liberdade em escolher as melhores amostras para este trabalho.

Agradeço, por fim, mas de maneira não menos importante, à **CAPES, FAPESP e FAEPA**, pelo apoio financeiro à realização deste trabalho.

RESUMO

RESUMO

Alves, Márcia Gaião. Quantificação de LEKTI, Calicreína 5 e Calicreína 7 em lesões epiteliais pré-malignas e malignas da cavidade oral. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2020

O câncer oral acomete em média 300.000 novos pacientes a cada ano, sendo o 16º tipo de câncer mais comum, no mundo. A sobrevida média de 5 anos, para esta patologia, é em torno de 50%. O tratamento usual para é a remoção cirúrgica da lesão, que é mutilante e compromete o bem-estar e a qualidade de vida do paciente, já que compromete áreas nobres da região craniofacial. Desta forma, a melhor compreensão da doença e a descoberta de novos biomarcadores são de relevância para o diagnóstico precoce e melhor predição do prognóstico. Neste sentido, o Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor (LEKTI) atua como inibidor cognato das serino-proteases Calicreínas (KLKs), como a KLK5 e a KLK7, proteases que atuam, primariamente, no processo de descamação epitelial. As KLKs 5 e 7, entretanto, estão relacionadas a diversos processos neoplásicos. Contudo, a ação destas enzimas, seja como oncoproteínas ou supressoras tumorais, ainda é contraditória na literatura. Resultados preliminares do laboratório mostravam que LEKTI está expresso nas células bem diferenciadas, em carcinoma experimental murino, e ausente na região indiferenciada do tumor. Como (i) LEKTI parece estar modulado no tumor, de acordo com a diferenciação celular; e (ii) KLK5 e KLK7 estão associadas à transformação tumoral; hipotetizamos que o equilíbrio enzima/inibidor, entre LEKTI e KLKs, é importante no contexto dos carcinomas orais. Um total de 50 amostras de mucosa oral (biópsias de hiperplasia inflamatória), 50 amostras de lesão pré-maligna oral (hiperqueratose com atipia), e 201 carcinomas orais foram marcados com a utilização da técnica de imuno-histoquímica anti-LEKTI, anti-KLK5 e anti-KLK7. Nossos resultados mostraram que LEKTI é abundantemente expresso, de forma absoluta, na mucosa oral e muito pouco expresso nas lesões malignas. Especialmente, sua expressão nos carcinomas orais indiferenciados é quase nula. Da mesma forma, a expressão absoluta de KLK5 e KLK7 é intensa na mucosa oral e pouco menor, quando consideramos os carcinomas orais. Interessantemente, nos carcinomas com maior expressão de LEKTI, existe uma modulação negativa na expressão de KLK5 quando comparados à mucosa oral e à lesão pré-maligna. Em conclusão, argumentamos que a expressão relativa, entre KLK5 e LEKTI, mostra grande potencial para o desenvolvimento futuro de novos biomarcadores. quando comparado à marcação absoluta das mesmas proteínas.

Palavras-chave: 1. Carcinoma oral; 2. Calicreínas 5 e 7; 3. LEKTI; 4. Biomarcadores.

ABSTRACT

Alves, Márcia Gaião. Quantification of LEKTI, KALLIKREINS-5 and 7 in premalignant and malignant epithelial lesions of the oral cavity. [Dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School; 2020.

Oral cancer affects approximately 300,000 new patients a year and it is the 16th most common type of cancer in the world. The average 5-year survival for this pathology is around 50%. The usual treatment for this pathology is the surgical removal of the lesion, which is mutilating and compromises patient's well-being and quality of life, since it compromises noble areas of the craniofacial region. Consequently, a better understanding of the disease and the discovery of new biomarkers are of utmost importance for early diagnosis and better prognosis. The Kazal-type lympho-epithelial inhibitor (LEKTI) is a cognate inhibitor of kallikrein serine proteases (KLKs) such as KLK5 and KLK7, which are proteases primarily involved in the epithelial desquamation process. Moreover, KLKs 5 and 7 have also been associated with several neoplastic processes. However, the action of these enzymes, whether as oncoproteins or tumor suppressors, is still contradictory in the literature. Preliminary results from our laboratory showed that LEKTI is expressed in well-differentiated cells in experimental murine carcinoma but absent in the undifferentiated region of the tumor. As (i) LEKTI appears to be modulated in the tumor according to cell differentiation; and (ii) KLK5 and KLK7 have been associated with tumor transformation; we hypothesized that the enzyme / inhibitor balance between LEKTI and KLKs would be important in the context of oral carcinomas. A total of 50 samples of oral mucosa (biopsies of inflammatory hyperplasia), 50 of premalignant oral lesion (hyperkeratosis with atypia), and 201 oral carcinomas were scored using the anti-LEKTI, anti-KLK5 and anti-KLK7 immunohistochemistry technique. Our results showed that LEKTI is abundantly expressed in the oral mucosa and very little expressed in malignant lesions. Especially, its expression in undifferentiated oral carcinomas is almost nonexistent. Likewise, KLK5 and KLK7 is highly expressed in oral mucosa and slightly less when considering oral carcinomas. Interestingly, in carcinomas with higher LEKTI expression, there is a negative modulation of KLK5 expression when compared to normal mucosa and premalignant lesions. In conclusion, we argue that the relative expression, between KLK5 and LEKTI, shows greater potential for the future development of new biomarkers, when compared to the absolute independent expressions of the same proteins. Key Words: 1. Oral carcinoma; 2. Kallikreins 5 and 7; 3. LEKTI; 4. Biomarkers

Sumário

INTRODUÇÃO.....	20
1. Introdução ao Câncer	20
2. Câncer de Boca.....	23
3. Calicreínas 5, Calicreína 7 e LEKTI no Contexto dos Carcinomas	32
OBJETIVOS	42
1. Objetivo Geral	42
2. Objetivos Específicos	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
1. Desenho de estudo.....	44
2. Tecidos humanos.....	44
3. Técnica de Imuno-histoquímica (IHC).....	45
4. Quantificação da Marcação.....	46
5. Correlação Demográfica	46
6. Análise Estatística	47
RESULTADOS	49
1. Imagens histopatológicas representativas das amostras incluídas neste estudo	49
2. Padronização e otimização da marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7.....	51
3. A expressão absoluta de LEKTI diminui nos carcinomas orais.....	52
4. Expressão absoluta de KLK5 e KLK7 nos carcinomas orais.....	55
5. A Expressão de KLK5 diminui em amostras de carcinoma oral que apresentam maior quantidade de LEKTI.....	57
6. Correlação da expressão de LEKTI com as características demográficas	58
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hierarquia de células normais e cancerosas e fatores que propiciam o câncer	21
Figura 2: The Hallmarks of Cancer	23
Figura 3: Incidência e Mortalidade do câncer de boca (lábio e cavidade oral)	25
Figura 4: Etapas para o desenvolvimento dos OSCCs	27
Figura 5: Representação gráfica do locus gênico das KLKs e dos estágios de maturação	34
Figura 6: Diagrama da cascata de ativação das KLKs na epiderme	35
Figura 7: Representação da ação inibitória de LEKTI	36
Figura 8: LEKTI está expresso em células bem diferenciadas e em tumores bem diferenciados	40
Figura 9: Características histopatológicas dos grupos experimentais	50
Figura 10: Padrinização da marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7 através de IHC em pele humana e mucosa oral	52
Figura 11: Expressão absoluta de LEKTI diminui nos carcinomas orais	54
Figura 12: Quantificação da expressão de KLK5 e KLK7	57
Figura 13: Expressão das KLK5 e KLK7 em amostras que apresentam maiores e menores taxas de LEKTI	58

TABELA

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes	59
Tabela 2. Diferenciação dos carcinomas na região mandibular	60

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA - *Bovine Seric Albumine*

C.B.D. - Carcinomas Bem Diferenciados

CCE - Carcinoma de Células Escamosas

CCP - Câncer de Cabeça e Pescoço

CEC - Carcinoma Espino Celular

C.P.D. - Carcinoma Pouco Diferenciado

DAB - *3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride*

DMBA - *7,12-Dimethylbenz[a]anthracene*

H&E - Hematoxilina e eosina

HRP - Enzima *Horseradish peroxidase*

HPV - *Human papillomavirus*

IARC - Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IHC - Imuno-histoquímica

INCA - Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

kDa - killoDalton

KLKs - Calicreínas

KLK5 - Calicreína 5

KLK7 - Calicreína 7

LEKTI - *Lymphoepithelial Kazal-Type Inhibitor*

LOPM - Lesões Orais Potencialmente Malignas

L.P.M. - Lesão Pré-maligna

MEC - Matriz Extracelular

M.O. - Mucosa Oral

OMS - Organização Mundial da Saúde

OSCC - Tumor oral de células escamosas

PBS - Tampão Salina Fosfato

tKLK - Calicreínas teciduais

UICC - União Internacional de Combate ao Câncer

uPAR - *Urinary Plaminogen-Activator Receptor*

µm - micrômetro

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Introdução ao Câncer

O corpo humano é gerado a partir de células germinativas que passam por ciclos de divisão, crescimento e diferenciação celulares. Tais ciclos geram diferentes linhagens celulares (células somáticas) que, em comunidade, formam unidades especializadas do organismo, os tecidos. Estes, se reúnem e formam os órgãos e sistemas que constituem o organismo humano (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; MORGAN *et al.*, 2010).

Divisão, proliferação, diferenciação e migração celulares são eventos envolvidos na dinâmica do organismo, e garantem o correto desenvolvimento e a adequada manutenção do mesmo. Estes eventos devem ser controlados por vários mecanismos, garantindo assim a homeostasia. Caso aconteça falhas nestes controles, consequências patológicas podem acontecer, e uma delas é o câncer (WEINBERG, 2016).

De acordo com Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), o câncer é um conjunto de doenças que têm como características comuns a divisão e a proliferação anormal das células do corpo. As células acometidas com a doença são denominadas tumorais, elas sofrem transformação maligna, se proliferam e geram massas celulares (tumores) que danificam o funcionamento dos tecidos e órgãos (INCA).

A transformação maligna das células normais, em células tumorais, inicia-se geneticamente. Em outras palavras, acontecem mutações no DNA e instruções genéticas “erradas” são armazenadas (VOGELSTEIN; KINZLER, 2015). São necessárias várias mutações para a transformação das células. Ainda, outros fatores somados, como por exemplo, mudanças epigenéticas e fatores ambientais podem corroborar para a transformação celular (HERCEG, 2007; KANWAL; GUPTA; GUPTA, 2015). A somatória dos fatores contribui também para o estabelecimento, progressão e gravidade da doença (IMREH, 1999).

A Figura 1 apresenta esquemas propostos por BAJAJ; DIAZ e REYA (2020) (adaptado) de como é a dinâmica celular do organismo em situação de homeostasia e de malignização. Os autores discutem que, uma célula tronco (que está no topo da hierarquia) se prolifera, se diferencia e gera células progenitoras iniciais. As células progenitoras iniciais, por sua vez, se

proliferam, se diferenciam e, então, geram as células progenitoras tardias. Estas se especializam e formam os tecidos (Figura 1A). Semelhantemente à dinâmica normal do organismo, é pensado que as células cancerosas possuem organização hierárquica, ou seja, uma célula que sofreu mutações em seu DNA, e acumulou eventos favoráveis à malignização, poderia ser uma progenitora, que então daria origem a uma população de células malignas (Figura 1C) (BAJAJ; DIAZ; REYA, 2020). No mesmo esquema podemos observar um exemplo de fatores que induzem a malignização das células (Figura 1B).

Figura 1. Hierarquia de células normais e cancerosas e fatores que propiciam o câncer. Células tronco e progenitoras se diferenciam, se proliferam, e formam as unidades especializadas do organismo (tecidos) (A). Exemplos de fatores genéticos que propiciam a malignização das células (B). As células progenitoras que sofrem transformação maligna, se proliferam e transferem as características tumorais às células filhas, que igualmente se proliferam. Estas células, em comunidade, podem iniciar a carcinogênese. Ilustração das fases do processo de carcinogênese: lesões pré-malignas, estágios iniciais do câncer até estabelecimento da doença (C). Imagens retiradas e modificadas de: BAJAJ; DIAZ e REYA (2020). P.2 e 4

Vários fatores podem acarretar as alterações genéticas que levam à malignização das células. Os chamados fatores extrínsecos, como tabagismo, etilismo, exposição à radiação ultravioleta e agentes mutagênicos estão comumente associados à esta doença. Fatores biológicos como infecção por patógenos como, por exemplo, o *Human Papiloma Virus* (HPV) e o vírus da hepatite C são outras possíveis causas associadas (HAMDANE; BAUMERT;

ZEISEL, 2018; HÜBBERS; AKGÜL, 2015). Todos estes fatores externos podem intervir na integridade do DNA, causando as mutações no genoma e corroborando, assim, para o início da carcinogênese.

As alterações genômicas, por outro lado, são considerados fatores intrínsecos quando acontece de forma interna ao indivíduo, podendo ser aleatórias ou herdadas (GARBER; OFFIT, 2005; GRAHAM; SOTTORIVA, 2017).

Não é possível apontar um único fator ou agente causador do câncer, visto que se trata de um vasto conjunto de doenças, e as etapas envolvidas no processo de carcinogênese são inúmeras, necessitando estar acumuladas e interligadas para o estabelecimento da doença (ALEXANDROV; NIK-ZAINAL; WEDGE; APARICIO *et al.*, 2013; HANAHAN; WEINBERG, 2000; ORTMANN; KENT; NANGALIA; SILBER *et al.*, 2015).

Como mencionado no início deste tópico, a transformação maligna culmina na produção das células tumorais que, entre suas características, incluem-se: (i) divisão celular rápida e descontrolada; (ii) potencial de invasão e disseminação da doença para outras partes do corpo, gerando metástases; (iii) imortalidade; (iv) habilidade para burlar os mecanismos do sistema imune, (v) indução da angiogênese para nutrição própria do tumor (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2: The Hallmarks of Cancer. Esta representação gráfica apresenta as principais características apresentadas pelas células tumorais. Imagem retirada e modificada de: HANAHAN e WEINBERG (2011). P. 668

2. Câncer de Boca

O câncer de boca faz parte do grupo dos cânceres de cabeça e pescoço (CCP), ou seja, neoplasias que acometem a orofaringe, cavidade oral, lábio, cavidade nasal, faringe e laringe (PEARSON; JACKSON; NÖR, 2016). O CCP é mundialmente responsável por aproximadamente 600.000 novos casos anuais, e mais de 200.000 mortes (JEMAL; BRAY; CENTER; FERLAY *et al.*, 2011; JOU; HESS, 2017; REID; WILSON; LI; MARCU *et al.*, 2017; SOLOMON; YOUNG; RISCHIN, 2018). Por definição, o câncer de boca é a neoplasia que acomete os lábios e estruturas da cavidade oral (INCA, 2020; WHO-IARC, 2020).

2.1 Epidemiologia, Etiologia e Tratamento do Câncer de Boca

A incidência global do câncer de boca é de aproximadamente 300.000 novos casos a cada ano, sendo o 16º tipo de câncer mais frequente (Figura 3 A). Sobre a mortalidade, a estimativa é de aproximadamente 170.000 mortes anuais (Figura 3 B), de acordo com os dados

publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS; do inglês, *World Health Organization*, WHO) e a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (IARC, G.-. 2018).

O continente asiático apresenta a maior incidência. Apenas no ano de 2018, a Ásia diagnosticou 64% dos casos mundiais, totalizando 227.906 casos (Figura 3 C). O câncer de boca é também mais frequente entre os homens (notar a incidência no gráfico da Figura 3 D), correspondendo a 5,8 indivíduos afetados a cada 100.000 homens, enquanto a incidência no sexo feminino é de 2,3 indivíduos afetados a cada 100.000 mulheres (IARC, G.-. 2018).

No Brasil, segundo o INCA a estimativa de novos casos de câncer de boca, para 2020, é de 15.190. Dentre esses, 11.180 são em homens, com 4.974 óbitos, representa o quinto tipo de câncer mais comum neste grupo. Entre as mulheres, o câncer de boca é o sétimo tipo de câncer, com (4.010 novos casos estimados e 1.481 mortes, em 2020) (INCA, 2020). Por fim, o câncer de boca representa uma ameaça significativa à saúde, visto que a taxa de mortalidade permanece a mesma há décadas. A sobrevida média em 5 anos corresponde a 50% dos indivíduos afetados pela doença (LEMOS JUNIOR; ALVES; PEREIRA; BIAZEVIC, 2013; WÜNSCH-FILHO, 2002).

Figura 3: Incidência e Mortalidade do câncer de boca (lábio e cavidade oral). Os dados registram a incidência dos principais tipos de câncer, o câncer oral ocupa a 16ª posição com 354.864 casos registrados em 2018 (últimos divulgados pelo OMS), observar no gráfico em (A). A mortalidade para este mesmo período foi de 177.384 mortes, ocupando o 14º lugar dos cânceres que mais mataram no mundo (B). O gráfico em C mostra a incidência deste tipo de câncer em cada continente, sendo a Ásia o país que mais registrou casos em 2018, representando 64% de todos os diagnósticos mundiais. A América latina e Caribe ocupam a quarta posição neste ranque, com 3.8% e 19.898 dos casos diagnosticados (C). A incidência do câncer oral é maior entre os homens em todos os continentes (D). Figura elaborada a partir de dados extraídos do site GCO-IARC (2018).

Dentre os fatores associados ao câncer de boca o tabagismo associado ou não ao etilismo, o consumo regular de bebidas alcoólicas, imunossupressão, obesidade, exposição ao sol sem proteção nos lábios, são alguns dos fatores etiológicos que favorecem o surgimento do câncer de boca (INCA). No hemisfério oeste, o fator etiológico mais citado na literatura é o tabagismo. Segundo a OMS, cerca de 90% dos pacientes diagnosticados com câncer de boca eram tabagistas. Em todas as suas formas este hábito representa o principal risco (cigarro,

cachimbo, charutos, rapé e fumo mascado) e o risco aumenta de acordo com a frequência do consumo (JIANG; WU; WANG; HUANG, 2019). Outro fator associado à alta incidência desta doença no continente asiático está relacionada à utilização de noz de betel (ou denominada noz de areca) (HERNANDEZ; ZHU; GOODMAN; GATEWOOD *et al.*, 2017; LI; CHANG; CHIU; LU *et al.*, 2016).

A detecção da lesão é feita primeiramente por médico ou cirurgião-dentista capacitado e vigilante em relação aos sinais e sintomas que desviem dos padrões de normalidade da mucosa, principalmente encontradas em pacientes com exposição aos fatores de risco. O padrão ouro para o diagnóstico do câncer boca é a biópsia das lesões e avaliação histopatológica destas amostras. Infelizmente, biomarcadores que possam diagnosticar e prognosticar a evolução clínica desta alteração patológica ainda são escassos (WADE; SMITH; HANKINS; LLEWELLYN, 2010).

O Carcinoma de Células Escamosas orais (CCE, carcinoma espinocelular, CEC e, abreviado do inglês, *Oral Squamous Cells Carcinoma, OSCC*) corresponde ao tipo histológico mais comum dos cânceres de boca (representa mais de 95% dos diagnósticos). (WHO-IARC) (DEWAN; DABAS; PRADHAN; MEHTA *et al.*, 2014;).

O tratamento consiste em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo a cirurgia o tratamento de primeira escolha na maioria dos casos e a radioterapia e/ou quimioterapia tratamentos adjuvantes.

2.2 Desenvolvimento do carcinoma oral

Esta dissertação refere-se aos CCE orais, como supracitado, o tipo histológico mais comum dos cânceres de boca. No decorrer do texto será atribuída a nomenclatura “carcinoma oral” para facilitar o entendimento.

O carcinoma oral é iniciado com a transformação maligna de células da mucosa oral, os queratinócitos (RIVERA, 2015). Mais especificamente, acontece a transformação das células tronco da camada basal do epitélio, que pode ser causada por: (i) estímulos externos (ex. tabaco e álcool); (ii) eventos internos (mutações aleatórias ou herdadas no genoma); ou (iii) a somatória dos eventos internos e externos (RIVERA, 2015).

Histopatologicamente, as células transformadas no epitélio exibem atipias em suas morfologias, sendo denominadas displásicas. Estas alterações são: (i) núcleos aumentados; (ii) nucléolos grandes e predominantes; (iii) hipercromatismo (coloração escura excessiva dos núcleos); (iv) pleomorfismo celular e citoplasmático; (v) aumento de na atividade mitótica; (vi) figuras de mitoses anormais (mitoses tripolares ou em forma de estrela, ou figuras de mitoses acima da camada basal); (vii) perda de coesão típica das células epiteliais (desorganização do epitélio) (NEVILLE, 2011).

O estabelecimento desta neoplasia maligna pode ser acompanhado, previamente, pela incidência de uma lesão potencialmente maligna. A lesão potencialmente maligna é classificada de acordo com o grau de displasia de suas células: (i) leve (queratinócitos displásicos estão presentes no terço inferior do epitélio da mucosa oral); (ii) moderada ou média (queratinócitos displásicos estão presentes nos 2/3 terços inferiores do epitélio); e (iii) grave (queratinócitos displásicos estão presentes em toda a espessura epitelial). Com o passar do tempo, se persistirem os estímulos de transformação, as células poderão adquirir mais características malignas (ex. habilidade de proliferação anormal invasão, metástase; indução da angiogênese e inflamação), e o carcinoma oral será consolidado como esquematizado na Figura 4 (RIVERA, 2015).

Figura 4: Etapas para o desenvolvimento dos OSCCs. O desenvolvimento dos OSCC é considerado um processo complexo e de várias etapas. A etapa inicial acontece quando os queratinócitos normais do epitélio oral são cronicamente expostos aos fatores de risco que podem gerar alterações genômicas (como a aneuploidia). Com o passar do tempo e com a persistências dos estímulos internos e externos que geram mutações, características tumorais e vantagens adaptativas estão agora presentes nas células transformadas: proliferação e invasão aos tecidos adjacentes. Em fases mais avançadas do câncer oral (carcinomas invasivos), as células tumorais atingem os vasos linfáticos e sanguíneos gerando metástases, induzindo inflamação e necrose. Retirado e adaptado de: RIVERA (2015). P.11886.

2.3 Lesões Orais Potencialmente Malignas

Na literatura está descrito há mais de um século que os cânceres orais podem estar associados ou precedidos por patologias pré-existentes na mucosa. Estas patologias são referidas como Lesões Orais Potencialmente Malignas (LOPM) ou lesões pré-malignas (abreviadas por LOPM) (BEN SLAMA, 2010; MÜLLER, 2018; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018).

O espectro de LOPM proposto pela OMS inclui leucoplasia oral, eritroplasia, eritroleucoplasia, fibrose submucosa oral, lesões palatais em fumantes, líquen plano, reações liquenóides orais, lúpus eritematosos e algumas doenças hereditárias, como disceratose congênita (WARNAKULASURIYA, 2018). Todas as LOPM apontadas apresentam características clínicas, celulares e histopatológicas que estão associadas à malignidade, porém merecem destaque duas delas: a Leucoplasia, e a Eritroplasia, por serem a LOPM mais comum e a mais grave, respectivamente (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018). Parâmetros clínicos, somados à histopatologia, podem ser utilizados para predizer o potencial de malignidade destas lesões (MELROSE, 2001; SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018; WOO, 2019). Cabe aqui esclarecer que esta predição, por histopatologia, por vezes se torna incipiente já que apenas de 2 a 3 % das leucoplasias, por exemplo, transformam em lesões malignas anualmente (VAN DER WAAL, 2014).

É bem compreendido na literatura a associação entre displasia e progressão ao câncer, como por exemplo um trabalho de SILVERMAN; GORSKY e LOZADA (1984), onde descobriram que 36% das 274 lesões displásicas estudadas progrediram para câncer de boca. Na revisão de literatura de SPEIGHT; KHURRAM e KUJAN (2018) é discutido os mais importantes fatores de risco que favorecem a progressão maligna das LOPM, os autores citam a displasia epitelial como um dos mais importantes destes fatores. Citam ainda, que quanto maior grau de displasia apresentado pelas lesões, mais susceptíveis estão à malignização. Displasias leves também não podem ser subestimadas, já que em torno de 4,1% das lesões com este perfil sofrem transformação maligna, é preconizado então que todas as lesões que apresentam qualquer grau de displasia sejam removidas cirurgicamente (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018).

Outro aspecto histopatológico importante que deve ser observado em LOPM é o aumento na queratinização ou ceratinização nas camadas superficiais do epitélio (Hiperqueratose). O conceito de hiperqueratose porém deve estar associado à algum grau de displasia do epitélio para que a lesão tenha a característica de uma LOPM (WOO, 2019).

Os fatores etiológicos destas lesões nem sempre são elucidados e variam de alterações genéticas a mecanismos relacionados com a autoimunidade, sendo difícil prever o risco de progressão em qualquer paciente individualmente, já que este risco varia de acordo com muitas características relacionadas ao paciente e à lesão. A maioria destas condições podem ser assintomáticas em estágios iniciais, e sua evolução pode ser detectada pelos médicos e dentistas em exame oral de rotina. Portanto, a detecção precoce melhora o prognóstico da doença. O diagnóstico dessas lesões acontece através do exame histopatológico dos fragmentos removidos em biópsias.

Quanto ao tratamento, várias abordagens terapêuticas podem ser tomadas nas LOPM. Uma delas consiste na remoção cirúrgica, deve ocorrer sempre que a extensão e envolvimento anatômico da lesão permitir (WARNAKULASURIYA, 2018). Pode ser realizada com lâmina fria (criocirurgia), bisturi elétrico, laser de alta potência (por exemplo laser de dióxido de carbono) e quimioterapia (AWADALLAH; IDLE; PATEL; KADEMANI, 2018).

Alguns autores defendem também a quimioprevenção em lesões extensas (SANKARANARAYANAN; MATHEW; VARGHESE; SUDHAKARAN *et al.*, 1997; WARNER; CASTO; KNOBLOCH; ACCURSO *et al.*, 2014; XIE; LIU, 2017). A quimioprevenção é definida como o uso de compostos naturais, sintéticos ou biológicos, como o β -caroteno, vitaminas, ervas, celecoxibe, dentre outros, utilizados para interromper, reverter ou prevenir as fases iniciais de carcinogênese em LOPM (MAIA; SOUSA; MOTA; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

2.4 Classificação Histopatológica dos Carcinomas Orais

Igualmente às LOPMs, detalhadas anteriormente, os carcinomas orais originam-se a partir de clones oriundos dos queratinócitos da mucosa oral, que exibem perfil displásico. Proliferam-se de forma descontrolada, perdem a adesão celular, expressam um perfil gênico diferenciado e possuem maior capacidade migratória, quando comparados aos queratinócitos

normais (RIVERA, 2015; WISNIEWSKI; MA; SCHNEIDER, 2018). Em estágios mais avançados, estes clones celulares invadem o tecido conjuntivo subjacente, através da membrana basal, e proliferam-se formando cordões ou ilhotas descontínuos com o epitélio de origem. Estas células displásicas, geralmente, mostram abundante citoplasma eosinofílico, núcleos volumosos e hipercromáticos. Finalmente, clones mais “malignos” invadem os vasos sanguíneos e linfáticos disseminando metástase (NEVILLE, 2011).

No epitélio pavimentoso estratificado queratinizado normal, as células da camada córnea são, em realidade, filamentos de queratina. Assim, no interior das ilhotas de células neoplásicas, encontram-se estruturas características do processo de diferenciação com consequente queratinização: as pérolas de queratina. Importante salientar que células isoladas também podem sofrer queratinização individual (NEVILLE, 2011).

O perfil histopatológico de cada tumor pode, de forma geral, relacionar-se com o grau de malignidade por ele apresentado. As classificações histopatológicas surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico dos tumores e associá-los às características clínicas, sendo então possível estimar o prognóstico da doença, e propor a terapia mais adequada aos pacientes afetados (LOURENÇO; SCHUELER; CAMISASCA; LINDENBLATT *et al.*, 2007). São vários os sistemas de classificação, e a associação destes com o estadiamento clínico TMN (classificação de tumores malignos proposta pela União Internacional contra o Câncer, UICC), por exemplo, suplementa e otimiza a caracterização dos carcinomas orais (ALMANGUSH; MÄKITIE; TRIANTAFYLLOU; DE BREE *et al.*, 2020; LOURENÇO; SCHUELER; CAMISASCA; LINDENBLATT *et al.*, 2007).

Como é bem conhecido, as células tronco progenitoras, que estão na camada basal do epitélio, se proliferam e originam queratinócitos comprometidos com a diferenciação celular (CALENIC; GREABU; CARUNTU; TANASE *et al.*, 2015). São várias as etapas de diferenciação. Concomitantemente com a diferenciação celular, os queratinócitos migram para camadas mais superficiais do epitélio. Na camada mais externa (camada córnea), estas células atingem o grau máximo de diferenciação celular que é acompanhado da morte celular e formação dos filamentos de queratina (ALBERTS; JOHNSON; LEWIS; MORGAN *et al.*, 2010; KIERSZENBAUM, 2004). Na camada córnea, também, ocorre a descamação epitelial. De forma sucinta, consideramos esta, a homeostasia do epitélio. É pensado que, no contexto do

carcinoma oral, as células que realizam os processos de diferenciação terminal mantêm parcialmente os perfis genético e proteico inerentes às células epiteliais normais e, portanto, traduzem em uma doença mais indolente. Por outro lado, as células que apresentam perfis genético e proteico distantes (muito distintos) das células epiteliais normais, perdem a capacidade de diferenciação, e mostram uma arquitetura tecidual muito distinta daquela apresentada pelo tecido epitelial normal, com a apresentação clínica da doença mais agressiva. Partindo destas primícias, BRODERS (1941), propôs uma gradação histopatológica para os carcinomas orais, baseada no grau de diferenciação celular.

A classificação histopatológica dos carcinomas orais, proposta pela OMS em 2005 (BARNES; EVESON; SIDRANSKY; REICHART, 2005), fundamentou-se na classificação de BRODERS (1941), e atualmente está em sua 4ª e última edição (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017). Basicamente tal classificação agrupa o carcinoma oral em três categorias: (i) pouco; (ii) moderadamente; e (iii) bem diferenciados.

Os carcinomas orais pouco diferenciados ou indiferenciados caracterizaram-se pela mínima ou nenhuma produção de queratina e predomínio de células indiferenciadas. Estas células, morfológicamente, são tão diferentes quando comparadas ao tecido normal que se torna difícil a identificação do tecido de origem. Nestes casos, estudos imuno-histoquímicos para orientar a identificação do tecido de origem se faz necessário (ex. citoqueratinas). Além do mais, exibem numerosas mitoses típicas e atípicas, pleomorfismo nuclear, crescimento rápido com presença de sítios de necrose celular, apresentam metástases locoregionais e à distância, invasão perineural e inflamação (NEVILLE, 2011; THOMPSON, 2006).

Os carcinomas orais moderadamente diferenciados apresentam graus menores de pleomorfismo nuclear e citoplasmático, atividade mitótica e queratinização. São, portanto, características intermediárias entre o carcinoma pouco diferenciado e o carcinoma bem diferenciado (THOMPSON, 2006).

Finalmente, nos carcinomas orais bem diferenciados estão presentes as pérolas de queratina em abundância, já que estas células completam o ciclo de diferenciação epitelial. Ainda, existe um menor grau de pleomorfismo citoplasmático e nuclear, a velocidade de crescimento é menor com poucas áreas necróticas, as metástases locoregionais e à distância, além invasão perineural, podem estar ausentes, e existe uma menor inflamação associada ao

tumor. Desta maneira, no carcinoma oral bem diferenciado, as células neoplásicas remetem o observador ao tecido epitelial normal e guardam muita similaridade com os queratinócitos normais (NEVILLE, 2011; THOMPSON, 2006).

Não é surpreendente que os carcinomas orais bem diferenciados exibam um comportamento mais “benigno” e, de forma geral, apresentam um curso menos agressivo da doença. Os carcinomas orais pouco diferenciados, por outro lado, exibem menores taxas de sobrevida, com maior índice de recorrência (COSTA ADE; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005).

3. Calicreínas 5, Calicreína 7 e LEKTI no Contexto dos Carcinomas

As proteases são enzimas capazes de realizar proteólise, ou seja, desfazer ligações entre peptídeos. Assim, as proteínas-alvo são degradadas em aminoácidos. Estas enzimas são fisiologicamente importantes no organismo humano e suas funções são distribuídas por todos os tecidos (LÓPEZ-OTÍN; OVERALL, 2002). Além de realizar proteólise, participam de diversas vias celulares importantes, refletindo em processos biológicos mais complexos (EHRMANN; CLAUSEN, 2004; LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; OIKONOMOPOULOU; HANSEN; SAIFEDDINE; VERGNOLLE *et al.*, 2006; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007; SIEGEL, 2006). Não surpreendentemente, um desequilíbrio das vias proteolíticas pode resultar em patologias. Existem proteases que são ancoradas na membrana plasmática das células, proteases que exercem sua atividade no citoplasma e/ou núcleo celular e proteases que são secretadas para a matriz extra-celular (SZABO; BUGGE, 2011; TRAPANI; SMYTH; APOSTOLIDIS; DAWSON *et al.*, 1994; ZHANG; POTHAKOS; TSIRKA, 2005).

A classificação das proteases se dá de acordo com o tipo de aminoácidos no seu sítio ativo de clivagem, ou seja, o grupo reativo que está envolvido na proteólise. Neste estudo, o interesse se volta às serino-proteases (mais especificamente, as calicreínas), elas têm seu sítio ativo composto por serina, aspartato e histidina, sendo a Serina o aminoácido reativo (DI CERA, 2009).

3.1 Caliceína 5 e Caliceína 7

As caliceínas (kallikrein-related peptidases, KLKs) são serino-proteases que compõem uma vasta categoria de proteases secretadas. São expressas em diversos tecidos e fluídos biológicos, e as caliceínas 5 e 7 fazem parte do grupo das caliceínas teciduais humanas (tKLKs)(EISSA; DIAMANDIS, 2008).

As tKLKs humanas formam uma família de 15 membros (KLK1-KLK15) e são codificadas por um *cluster* de genes que estão agrupados em uma única região gênica, no cromossomo 19q13.4 (YOUSEF; DIAMANDIS, 2001). Estão predominantemente expressas na camada córnea da epiderme (KISHIBE, 2019; KOMATSU; TAKATA; OTSUKI; TOYAMA *et al.*, 2003). São sintetizadas como zimógenos (pré-pró-KLKs), ou seja, a forma inativa da protease, e então secretadas via transporte lamelar (ISHIDA-YAMAMOTO; SIMON; KISHIBE; MIYAUCHI *et al.*, 2004). As pré-pró-KLKs são enzimaticamente processadas em pró-KLKs, que são inativas do ponto de vista catalítico. As pró-KLKs são secretadas e, extracelularmente, processadas para a ativação. A remoção do peptídeo sinal da região amino-terminal (pré-pró-KLK5) inicia o processo de ativação, tornando-as em pró-KLK. Em seguida as pró-KLKs sofrem outra clivagem de sua porção amino-terminal, tornando-se assim KLKs ativas. Este processo está esquematizado na Figura 5 (EISSA; DIAMANDIS, 2008; PAVLOPOULOU; PAMPALAKIS; MICHALOPOULOS; SOTIROPOULOU, 2010).

A sinalização, elencada pela KLK5 e pela KLK7, é iniciada por outras proteases, como a matriptase e a mesotripsina, que clivam, inicialmente, a pro-KLK5 que, por sua vez, cliva e ativa as KLKs 7, 8, 14, em cascata (KISHIBE, 2019; SALES; MASEDUNSKAS; BEY; RASMUSSEN *et al.*, 2010). Importante lembrar que, *in vitro*, a matriptase é capaz de ativar a pró-KLK5 e a pró-KLK7(SALES; MASEDUNSKAS; BEY; RASMUSSEN *et al.*, 2010). Esse sistema de ativação e feedback positivo está ilustrado na Figura 5.

Figura 5: Representação gráfica do locus gênico das KLKs e dos estágios de maturação. As KLKs estão localizadas em uma mesma região do cromossomo 19, a região 19q13.4. Ao serem sintetizadas, as proteínas estão na sua forma inativa (zimógeno, pré-pró-KLKs), que são clivadas em pró-KLKs e então secretadas, sofrendo novamente clivagem enzimática e atingem suas formas maduras, ou ativas. Fonte: adaptado de: PRASSAS; EISSA; PODA e DIAMANDIS (2015). P.4

As KLK5 e KLK7 são expressas pelos queratinócitos diferenciados na camada córnea do epitélio, e estão fisiologicamente envolvidas no processo de descamação epitelial (CAUBET; JONCA; BRATTSAND; GUERRIN *et al.*, 2004). Este processo ocorre quando a KLK5 ativada, cliva e ativa a KLK7. As KLK5 e KLK7, juntas, clivam proteínas constitutivas dos corneodesmosomos (ex. desmogleína 1 e desmocolina) (BRATTSAND; EGELRUD, 1999; EGELRUD; BRATTSAND; KREUTZMANN; WALDEN *et al.*, 2005; EISSA; DIAMANDIS, 2008). A regulação da atividade proteolítica das KLK5 e da KLK7 é mediada pelo seu inibidor cognato LEKTI.

Figura 6: Diagrama da cascata de ativação das KLKs na epiderme. KLK5 atua como um iniciador, ativando por outras proteases como mesotripsina e matriptase, bem como ela própria, e então ativa outras KLKs. As KLKs 5, 7 e 14 desempenham papéis essenciais principalmente em degradar proteínas dos corneodesmosomos
Fonte: KISHIBE (2019), P.51

3.2 LEKTI

O Lympho-Epithelial Kazal-Type Inhibitor (LEKTI) é uma proteína inibidora de serino-proteases de 120 kDa (estrutura proteica composta por 1064 aminoácidos) (SCHECHTER; CHOI; WANG; HANAKAWA *et al.*, 2005). É um polímero de quinze domínios, dos quais dois são do tipo Kazal clássico (KREUTZMANN; SCHULZ; STÄNDKER; FORSSMANN *et al.*, 2004). Todos os domínios de LEKTI possuem atividade inibitória individual, porém, estudos mostraram que uma região (entre os domínios 6 e 9) desempenha uma atividade inibitória mais forte contra a KLK5 (FORTUGNO; FURIO; TESON; BERRETTI *et al.*, 2012). LEKTI é codificada pelo gene SPINK5 que está localizado no cromossomo 5, na região 5q33.1 (GALLIANO; ROCCASECCA; DESCARGUES; MICHELONI *et al.*, 2005). Assim, LEKTI é sintetizado como uma poliproteína e clivado em fragmentos menores pela protease furina, no complexo de golgi, antes de ser secretado para a matriz extra-celular (MEC) (FURIO; HOVNANIAN, 2011; MEYER-HOFFERT, 2009).

A expressão de LEKTI foi detectada no timo, epitélio vaginal, glândulas de Bartholin, mucosa oral, amígdalas, glândula paratireóide e epiderme (MÄGERT; STÄNDKER; KREUTZMANN; ZUCHT *et al.*, 1999). LEKTI está relacionado com a regulação da descamação epitelial, visto que inibe as KLKs 5 e 7 (Figura 7), processo controlado pelo pH. Conforme o pH se torna mais ácido nas camadas superiores do epitélio escamoso, LEKTI desacopla das calicreínas, permitindo assim que estas atuem favoravelmente ao processo de descamação (DERAISON; BONNART; LOPEZ; BESSON *et al.*, 2007). A ausência de LEKTI leva ao desenvolvimento da síndrome de Netherton, cujos sinais incluem a descamação exacerbada do epitélio (BITOUN; MICHELONI; LAMANT; BONNART *et al.*, 2003; SALES; MASEDUNSKAS; BEY; RASMUSSEN *et al.*, 2010). Além de desenvolver um importante papel na diferenciação epitelial, LEKTI ainda atua na morfogênese da pele e cabelo e na adequada ação antimicrobiana e anti-inflamatória do epitélio (CHAVANAS; BODEMER; ROCHAT; HAMEL-TEILLAC *et al.*, 2000; KISHIBE, 2019).

Figura 7: Representação da ação inibitória de LEKTI. LEKTI atua tanto inibindo a ativação de KLK7 pela KLK5, quanto a ação que estas exercem nas proteínas dos corneodesmosomos, esta modulação é controlada pelo pH. Fonte: adaptado de EISSA e DIAMANDIS (2008). p.673.

3.3 Correlação entre KLK 5, KLK 7 e LEKTI, no Processo da Carcinogênese

Como bem-visto, as serino-proteases desempenham um importante papel em vários processos biológicos. Assim, para o bom funcionamento desses processos, a interação

balanceada entre estas enzimas e seus inibidores deve ocorrer. Distúrbios neste balanço podem acarretar o desenvolvimento de inúmeras patologias, entre elas, o carcinoma. As transformações malignas, do ponto de vista de biologia celular, podem levar a expressão alterada dessas serino-proteases e seus inibidores. É possível observar na literatura que várias serino-proteases e inibidores têm sido associadas a neoplasias malignas nos últimos anos (BORGOÑO, CARLA A.; DIAMANDIS, ELEFTHERIOS P., 2004; GÓRA; LATAJKA, 2015; KATAOKA; KAWAGUCHI; FUKUSHIMA; SHIMOMURA, 2018; VAN DER WAAL, 2014; VERBOVŠEK; VAN NOORDEN; LAH, 2015; YANG; LI; LI, 2015).

Dentre estas proteases, um exemplo, é a matriptase (uma serino-protease transmembrana do tipo II). Como supracitado, a matriptase ativa a KLK5, na descamação epitelial. É de grande importância citá-la, devido ao fato de que sua desregulação é associada a vários tipos de carcinomas (CHENG; HUANG; LIN; LIN *et al.*, 2014; KANEMARU; YAMAMOTO; KAWAGUCHI; FUKUSHIMA *et al.*, 2017; OBERST; ANDERS; XIE; SINGH *et al.*, 2001; SALES; FRIIS; KONKEL; GODIKSEN *et al.*, 2015; VOGEL; SAEBØ; SKJELBRED; ABELL *et al.*, 2006). Sendo matriptase a ativadora das KLKs, a desregulação da mesma na neoplasia maligna pode indicar uma provável modulação das KLKs nesta patologia, já que compartilham da mesma via proteolítica.

Com relação às KLKs, anteriormente à 2009, já havia dados na literatura relacionando suas expressões alteradas com a incidência de vários tumores malignos. Os primeiros achados, entretanto, foram em tumores epiteliais humanos sensíveis à hormônios, como o carcinoma de próstata, mama e ovário (BORGOÑO, C. A.; DIAMANDIS, E. P., 2004; CLEMENTS; WILLEMSSEN; MYERS; DONG, 2004; PAMPALAKIS; SOTIROPOULOU, 2007). Outras referências mostraram que estas proteases estão superexpressas em linhagens tumorais e células de cultura primária de carcinoma de colo do útero (SANTIN; CANE; BELLONE; BIGNOTTI *et al.*, 2004; SHAW; DIAMANDIS, 2008).

O primeiro estudo a relacionar KLKs com carcinoma de boca foi há aproximadamente de dez anos (PETTUS; JOHNSON; SHI; DAVIS *et al.*, 2009). Segundo os autores, as KLKs 5,7,8 e 10 estão aumentadas em carcinomas orais. Células tumorais da linhagem SCC25 foram induzidas a superexpressar uPAR/R (*urinary plasminogen-activator*, o que levou a maior agressividade das células), e então foram injetadas em língua de camundongos, formando tumores xenotransplantados. Apesar da não descrição de mecanismos específico pelo qual isso

ocorra, houve aumento da expressão de KLK5 e KLK7, nas neoplasias xenotransplantadas, que superexpressavam uPAR/R, quando comparadas àquelas nas quais o uPAR/R fora silenciado e à mucosa normal (PETTUS; JOHNSON; SHI; DAVIS *et al.*, 2009).

O envolvimento das KLKs, mais precisamente KLK5, com o processo de carcinogênese também foi avaliado no trabalho de JIANG; SHI; JOHNSON; LIU *et al.* (2011). Os resultados mostraram que há aumento na atividade de degradação de desmogleína-1 (Dsg1) em linhagem de células malignas orais (SCC25), levando a perda de adesão célula-célula, o que é prevalente na metástase tumoral. A degradação da Dsg1 foi bloqueada por tratamento com inibidor de serino-protease, bem como por silenciamento da expressão de KLK5 (por siRNA). Além do mais a super-expressão de KLK5 em linhagem de células orais normais (OKF6) levou o aumento da dispersão celular nos ensaios de agregação célula-célula. Os autores discutem que KLK5 pode promover a disseminação metastática dos carcinomas orais por meio da clivagem de Dsg1 (JIANG; SHI; JOHNSON; LIU *et al.*, 2011).

Outro estudo, sobre o envolvimento das KLKs com o carcinoma oral a ser destacado é o de LEUSINK; VAN DIEST; FRANK; BROEKHUIZEN *et al.* (2015). Os autores mostraram que a menor expressão de KLK5 e KLK7 em carcinomas orais humanos está relacionada com a maior taxa de sobrevida global após a retirada cirúrgica dos tumores.

Todos estes estudos sugerem uma ação de oncoproteína das KLK5 e KLK7 no processo de carcinogênese, porém há dados na literatura conflitantes com estes achados, como por exemplo, o trabalho mostrando que a KLK5 foi encontrada em menores quantidades em tumores como o de próstata e testículo, e valores mais altos nos tecidos adjacentes, provenientes do mesmo paciente, avaliados como normais (YOUSEF; OBIEZU; JUNG; STEPHAN *et al.*, 2002).

Interessantemente, é possível notar na plataforma que correlaciona expressão gênica a vários contextos de carcinogênese (ONCOMINE) que, de forma geral, a expressão de LEKTI está aumentada nos cânceres de cabeça e pescoço. Além do mais, estudos têm demonstrado que a superexpressão de LEKTI em células de câncer de cabeça e pescoço levou a uma diminuição da migração e invasão de linhagens imortalizadas para esta doença (JAYAKUMAR; WU; BRIGGS; RADJENDIRANE *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram a diminuição da expressão de LEKTI em tumores malignos de cabeça e pescoço, como por exemplo o de GONZALEZ; GUJRATI; FREDERICK;

HENDERSON *et al.* (2003). Através de análises de *micro-array* em tumores de orofaringe, os autores observaram a diminuição da expressão de 9 genes, dentre eles, o gene SPINK5 que codifica LEKTI. A expressão destes foi regulada negativamente nos tumores quando comparada a expressão de linhagens celulares da mucosa oral normal (GONZALEZ; GUJRATI; FREDERICK; HENDERSON *et al.*, 2003).

Outro estudo que observou a diminuição da expressão de LEKTI em carcinomas de cabeça e pescoço foi o de YE; YU; TEMAM; ZIOBER *et al.* (2008). As análises de transcriptoma realizadas no estudo mostraram a diminuição da expressão de SPINK5 entre outros genes em 53 tumores de língua, tal expressão foi comparada com a de 22 tecidos normais correspondentes (YE; YU; TEMAM; ZIOBER *et al.*, 2008).

Por fim, resultados preliminares obtidos em nosso laboratório, mostraram que a expressão de LEKTI acontece nas células bem diferenciadas de carcinoma experimental em murinos (Figura 8 B e C, asteriscos). Além do mais está aumentada em epitélio pré-neoplásico, adjacente à região dos tumores (Figura 8 A, cabeças de seta). Estes resultados foram obtidos experimentalmente em murinos, através da indução da carcinogênese com DMBA (Traduzido do inglês-O 7,12-dimetilbenz [a] antraceno). Posteriormente, esses tumores foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica para análise da expressão de LEKTI. Ainda, preliminarmente, foi realizado análise de imuno-histoquímica em 3 amostras de mucosa oral normal, 4 amostras de lesão pré-maligna e 26 carcinomas orais (sendo 9 bem diferenciados e 17 pouco diferenciados). Os resultados de imuno-histoquímica mostraram que, em carcinomas orais humanos, a expressão de LEKTI é presente em 33% dos carcinomas orais bem diferenciados e ausente em carcinomas pouco diferenciados (Figura 8 D).

Figura 8: LEKTI está expresso em células bem diferenciadas e em tumores bem diferenciados. (A) Expressão abundante de LEKTI em epitélio pré-neoplásico de murinos (cabecinhas de seta: imuno-histoquímica de LEKTI). (B) Expressão de LEKTI em tumores induzidos por DMBA nos murinos (asteriscos: marcação de LEKTI). (C) Tumor em murino que expressa LEKTI, a pérola de queratina é um elemento que indica a diferenciação do tumor (asterisco: marcação para LEKTI em torno da pérola de queratina). (D) Expressão de LEKTI em carcinoma oral humano bem diferenciado (setas: células bem diferenciadas; cabecinhas de seta: limites do tumor). (E) Detalhe em maior aumento das células bem diferenciadas do tumor expressando LEKTI (seta: marcação específica de LEKTI). (F) Gráfico Positividade para a marcação imuno-histoquímica de LEKTI de acordo com o diagnóstico histopatológico (%). Mucosa Oral Normais: 66,67%; Lesões pré-malignas: 75%; Carcinoma Bem diferenciado: 33%; Carcinomas pouco diferenciados: 0%. Barras= (D)50 µm; (E)12,5 µm.

Considerando que: (i) a histopatologia, de forma geral, mostra-se um excelente método para diagnosticar LOPMs e carcinoma oral; (ii) existe a associação entre a KLK5, a KLK7 e LEKTI com o desenvolvimento de neoplasias malignas; e (iii) o conhecimento sobre a expressão de KLK5, KLK7 e LEKTI, em LOPMs, ainda é escasso; nesta dissertação testa-se a hipótese de a expressão da KLK5, KLK7 e/ou LEKTI é alterada/modulada entre mucosa oral > lesão pré-maligna (LOPMs) > carcinoma bem-diferenciado > carcinoma pouco diferenciado.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão imuno-histoquímica de KLK5, KLK7 e LEKTI em lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral.

2. Objetivos Específicos

Avaliar a expressão de KLK5, KLK7 e LEKTI, em biópsias humanas de: (i) mucosa oral (diagnóstico histopatológico: hiperplasia fibrosa - controle); (ii) lesão pré-maligna oral (diagnóstico histopatológico: hiperqueratose com atipia); (iii) carcinoma oral bem diferenciado; e (iv) carcinoma oral pouco diferenciado.

- Otimizar os anticorpos para a reação de imuno-histoquímica, considerando cada uma das proteínas-alvo: KLK5, KLK7 e LEKTI;
- Padronizar a técnica de imuno-histoquímica para os tecidos utilizados (mucosa oral);
- Avaliar, quantitativamente, se há mudança no padrão de expressão das serino-proteases, e seu inibidor, a depender do diagnóstico histopatológico: (i) mucosa oral (diagnóstico histopatológico: hiperplasia fibrosa - controle); (ii) lesão pré-maligna oral (diagnóstico histopatológico: hiperqueratose com atipia); (iii) carcinoma oral bem diferenciado; e (iv) carcinoma oral pouco diferenciado.
 - Estabelecer método de quantificação de expressão proteica, nos tecidos acima especificados, a partir das marcações oriundas da imuno-histoquímica;
 - Correlacionar a expressão de LEKTI, KLK5 e KLK7 com o diagnóstico histopatológico das lesões;
 - Correlacionar a expressão de KLK5, KLK7 e LEKTI com as características demográficas dos pacientes: gênero, idade, tabagismo, etnia e sítio de lesão.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Desenho de estudo

A abordagem metodológica utilizada para responder as questões deste trabalho foi uma observação transversal. Obtivemos quatro grupos de estudo, e comparamos entre eles a expressão das proteínas, e correlacionamos tal expressão com a classificação histopatológica e dados demográficos os participantes.

2. Tecidos humanos

As amostras da pesquisa foram obtidas através do banco de amostras do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), em colaboração com Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva. Essas amostras são oriundas de biópsias humanas de mucosa oral, coletadas e diagnosticadas previamente pelo serviço de patologia do Departamento acima referido.

Em relação aos aspectos éticos, a pesquisa foi submetida e aprovada junto ao Comitê de ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) (Anexo 1). Este projeto estava vinculado ao projeto “ESTUDO GENÉTICO DA VIA PROTEOLÍTICA DA MATRIPTASE EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO”.

Os grupos experimentais foram selecionados conforme o diagnóstico histopatológico das biópsias, são eles:

- 50 amostras de mucosa oral (diagnóstico histopatológico: hiperplasia fibrosa - controle);
- 50 amostras de lesões pré-malignas (diagnóstico histopatológico: hiperqueratose com atipia das células basais);
- 201 amostras de carcinoma de células escamosas, sendo 114 amostras oriundas de carcinoma bem diferenciados e 87 amostras oriundas de carcinoma pouco diferenciados.

3. Técnica de Imuno-histoquímica (IHC)

Os tecidos, previamente processados e incluídos em blocos de parafina, foram seccionados em lâminas silanizadas, com 6 µm de espessura, e hidratados em uma série decrescente de etanóis (100% EtOH, 95% EtOH, 70% EtOH e, finalmente, água destilada). A recuperação antigênica (exposição dos epítomos das proteínas), foi realizada com tampões pH 6.0 em forno micro-ondas comum (aquecimento das amostras por 20 minutos à potência de 10%). Os tampões utilizados foram:

- Tampão Citrato de Sódio (0,01M; pH:6,0): Utilizado para KLK7, e LEKTI;
- Tampão Ácido Cítrico (0,01M; pH:6,0): Utilizado para KLK5.

Posteriormente, foi realizado a etapa de bloqueio da peroxidase endógena, que consiste em um pré-tratamento do tecido de forma a evitar a marcação inespecífica (background) resultante da reação entre anticorpos conjugados com HRP (horseradish peroxidase) e a peroxidase endógena. Para tanto, foi realizado uma incubação com H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) diluído em álcool metílico em uma concentração final de 3%.

Os anticorpos primários específicos para cada proteína foram diluídos em PBS contendo 1% de BSA e incubados à 4°C “*overnight*”, são eles:

- Anti-SPINK5 (concentração utilizada: 3µg/ml – Clone HPA009067, produzido em coelho, Sigma-Aldrich)
- Anti-KLK5 (concentração utilizada: 3µg/ml – Catálogo: ab28565, produzido em coelho, Abcam Plc, Cambridge, UK);
- Anti-KLK7 (concentração utilizada: 2µg/ml – Catálogo: AF2624, produzido em caprinos, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Em seguida, as amostras foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente com os anticorpos biotinilados: *Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L)* BA-1000 (Vector laboratories, California – EUA) para KLK5 e LEKTI; e *Biotinylated anti-goat IgG (H+L)* BA-9500 (Vector laboratories, California – EUA) para KLK7. As amostras foram, então, incubadas com o reagente *Vectastain ABC Elite* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), que consiste em complexos proteicos de avidina e biotina com a finalidade amplificar o sinal químico da reação, por 30 minutos em temperatura ambiente. Os controles negativos foram realizados usando IgG

anti-cabra (2 µg/ ml, Catálogo: 005-000-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, EUA), para KLK7; IgG anti-coelho (3 µg / ml, Catálogo: 011-000-003, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, EUA) para LEKTI e KLK5.

O substrato 3,3Diamino Benzidina (DAB) 0,03 %+ H₂O₂ 0,009% foi utilizado por 30 minutos para revelar a reação. As lâminas foram, então, desidratadas em série crescente de etanóis (água destilada, EtOH 70%, EtOH 95% e EtOH 100%), contrastadas com hematoxilina e montadas com *Permount* (Thermo Fisher Scientific) para a análise sob microscópio óptico de luz.

Após a análise e seleção das lâminas, as mesmas foram escaneadas no equipamento Virtual Slide System (VS120/BX61VS - Olympus, Latin America, Inc.) em objetiva de 40X.

4. Quantificação da Marcação

A análise e quantificação da marcação de imuno-histoquímica (IHC) de LEKTI, KLK5 e KLK7 foi realizada com o auxílio do software de processamento de imagens científicas *FIJI ImageJ*. Foram delimitadas, manualmente, e quantificadas as áreas epiteliais totais das amostras (µm²). Igualmente, a área marcada, pelos anticorpos, foi delimitada e calculada. Obteve-se, então, a porcentagem de marcação através de razão entre área epitelial marcada e área epitelial total; que foi multiplicada por 100, conforme a fórmula abaixo:

$$Expressão(\%) = \frac{\text{área epitelial marcada}}{\text{área epitelial total}} \times 100$$

A quantificação foi feita em triplicata técnica, e foram extraídas as médias desta triplicata. Os dados gerados, como descrito acima, foram plotados em gráficos, com a utilização do software *GraphPad Prism*.

5. Correlação Demográfica

As informações demográficas das amostras participantes foram acessadas no banco de prontuários do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade

de São Paulo (FOUSP). Todas as informações pessoais dos participantes foram preservadas. As informações clínicas obtidas foram: gênero, idade, tabagismo, etnia e sítio de lesão.

6. Análise Estatística

A quantificação da marcação imuno-histoquímica foi feita em triplicata técnica, e a média final das três quantificações foi correlacionada, estatisticamente, com o diagnóstico histopatológico das amostras.

Os testes estatísticos utilizados foram: (i) teste de Kruskal-Wallis que corresponde ao teste não paramétrico, utilizado para comparar os grupos os experimentais deste trabalho, que se tratam grupos amostrais independentes; (ii) teste de múltiplas comparações de Dunn, utilizado para estender o teste Kruskal-Wallis dos diferentes diagnósticos histopatológicos: mucosa oral, lesão pré-maligna, carcinoma bem diferenciado e carcinoma pouco diferenciado, comparando-os dois a dois; (iii) a análise dos dados demográficos foi feita através do teste qui-quadrado de Pearson. As diferenças entre os grupos foram determinadas com a utilização dos valores de $p < 0.05$. As análises foram geradas com o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Imagens histopatológicas representativas das amostras incluídas neste estudo

Com o objetivo de avaliar a expressão proteica das serino-proteases e de seu inibidor em (i) mucosa oral, diagnosticada por hiperplasia fibrosa, uma injúria sem relatos de transformação maligna, que foi definida como o grupo controle; (ii) mucosa oral com displasia e, portanto, lesão pré-maligna; e (iii) carcinoma oral; foram selecionadas amostras que apresentavam os seguintes diagnósticos histopatológicos: hiperplasia fibrosa (controle, mucosa oral ausente de transformação maligna, n=50), hiperqueratose com atipia das células basais (lesão pré-maligna, n=50) e carcinomas orais bem diferenciados (n=114) e pouco diferenciados (n=87).

Na Figura 9 aprecia-se as diferenças histopatológicas das amostras utilizadas neste estudo. A Figura 9 A mostra o epitélio representativo da mucosa oral, utilizada como controle, que é o epitélio pavimentoso estratificado e, neste caso, não queratinizado. A Figura 9 B, por outro lado, apresenta espessa queratinização na camada córnea do epitélio (asterisco), padrão desorganizado das células basais que abrange de 1/3 a 2/3 da espessura epitelial, queratinócitos displásicos (cabeça de seta preta), pleomorfismo nuclear e citoplasmático (cabeça de seta amarela) e presença de mitoses atípicas (cabeça de setas azul), características morfológicas de lesão pré-maligna. A Figura 9 C apresenta uma imagem representativa de carcinoma bem diferenciado, com células tumorais que se assemelham, morfológicamente, às células escamosas do epitélio oral, e inclui as seguintes características: citoplasma de padrão poligonal e abundante, presença de queratinização (cabeças de seta pretas) e formação de ilhotas de células tumorais no tecido conjuntivo subjacente (setas verdes). No centro destas ilhotas há estruturas características do processo de diferenciação dos queratinócitos, a queratinização que, neste caso, são denominadas pérolas de queratina (asteriscos). A Figura 9 D apresenta um inserto com detalhes em maior aumento das características dos queratinócitos no carcinoma bem diferenciado (citoplasma de padrão poligonal e abundante).

A Figura 9 E representa os carcinomas pouco diferenciados, com predomínio de células fusiformes e intenso pleomorfismo nuclear/citoplasmático (cabeças de seta amarelas), numerosas mitoses atípicas (cabeças de seta azuis), bem como quantidade muito pequena de

queratinização (cabeça de seta preta), além do mais as setas verdes apontam o tecido conjuntivo e muscular subjacente. A Figura 9 F é um inserto em maior aumento mostrando em detalhe uma mitose atípica (cabeça de seta azul), e alguns exemplos de pleomorfismo nuclear (cabeças de seta amarelas).

Figura 9: Características histopatológicas dos grupos experimentais. H.es representativos das características morfológicas de cada grupo experimental: **A**, Grupo controle, amostras de hiperplasia fibrosa. **B**, Lesão pré-maligna diagnosticada com hiperqueratose com atipia das células da camada basal. Asterisco= camada espessa de queratina; cabeça de seta preta= padrão desorganizado dos queratinócitos displásicos da camada basal; cabeça de seta azul= mitoses atípicas; cabeça de seta amarela= pleomorfismos nuclear e citoplasmático). **C**, Carcinoma oral bem diferenciado. Cabeça de seta preta= queratinização no tumor; asterisco= pérola de queratina; setas verdes= tecido conjuntivo subjacente. **D**, detalhe em maior aumento do padrão poligonal citoplasmático das células escamosas. **E**, Carcinoma oral pouco diferenciado. Cabeça de seta preta= queratinização mínima no tumor; cabeças de setas azuis= figuras de mitoses atípicas; cabeças de seta amarelas= pleomorfismo nuclear; seta verde= tecido conjuntivo e muscular adjacente ao tumor. **F**, inserto com maior aumento mostrando uma mitose atípica (cabeça de seta azul) e exemplos de pleomorfismo nuclear (cabeças de seta amarela). Barras em **A**, **B**, **C** e **E** = 25 μ m. Barras em **D** e **F** = 7 μ m.

2. Padronização e otimização da marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7

O primeiro passo para tornar possível testar a hipótese, neste estudo, foi padronizar e otimizar a marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7 através da técnica de imuno-histoquímica.

Como observado na Figura 10, utilizou-se amostras de pele, onde a expressão destas proteínas é abundante e conhecida, previamente citada na literatura (*The Human Protein Atlas*, 2019) - e de mucosa oral (PROTEINATLAS, 2019).

A marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7 (Figura 10 A, B e C; respectivamente), em pele humana, está localizada extracelularmente, na camada granulosa do epitélio, já que estas são proteínas secretadas, como explanado na introdução (setas pretas apontam a marcação de LEKTI, setas azuis apontam a marcação de KLK5 e setas vermelhas apontam a marcação da KLK7). Portanto, este tecido foi utilizado como controle positivo para as reações realizadas neste trabalho.

Os controles negativos foram, igualmente, realizados em pele humana (Figura 10). Nestas amostras, foi utilizado o IgG não imune anti-coelho para o controle negativo da reação de imuno-histoquímica anti-LEKTI e anti-KLK5 (Figura 11 D e E, respectivamente); e o IgG não imune anti-cabra para o controle negativo da reação de imuno-histoquímica anti-KLK7 (Figura 10 F).

O perfil de expressão das proteínas avaliadas neste estudo, na mucosa oral, se assemelhou ao apresentado pela epiderme: marcação na matriz extracelular das camadas preenchidas por queratinócitos comprometidos com a diferenciação celular (camadas intermédia e superficial do epitélio). A seta preta, na Figura 10 G, aponta a marcação específica para LEKTI. A seta vermelha, na Figura 10 H, mostra marcação para KLK5. A seta verde, na Figura 10 I, mostra a marcação para KLK7. Todas as proteínas de interesse apresentaram o

mesmo padrão. Quanto às concentrações dos anticorpos, seguiram as mesmas otimizadas nos controles positivos e negativos.

Figura 10: Padrinização da marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7 através de IHC em pele humana e mucosa oral. **A** Marcação específica em pele humana de LEKTI (setas pretas). **B** Marcação específica em pele humana de KLK5 (setas azuis). **C** Marcação específica em pele humana de KLK7 (setas vermelhas). **D** Controle primário negativo IgG não imune anti-coelho para LEKTI. **E** Controle primário negativo IgG não imune anti-coelho para KLK5. **F** Controle primário negativo IgG não imune anti-cabra para KLK7. **G** Marcação específica em mucosa oral de LEKTI (seta preta). **H** Marcação específica em mucosa oral de KLK5 (seta vermelha). **I** Marcação específica em mucosa oral de KLK7 (seta verde). Barras em **A,B,C,D,E e F** = 12,5 µm. Barras em **G, H e I** = 25 µm.

3. A expressão absoluta de LEKTI diminui nos carcinomas orais

Após padronização e otimização da marcação de LEKTI, KLK5 e KLK7 no epitélio de revestimento da pele e da mucosa oral, o próximo passo foi avaliar a expressão destas proteínas no grupo controle de mucosa oral (G.C.), na lesão pré-maligna da cavidade oral (L.P.M.) e nos carcinomas (bem diferenciados – C.B.D.; e pouco diferenciados – C.P.D.). As marcações resultantes foram quantificadas através do software Fiji ImageJ. Conforme explicitado na metodologia desta dissertação, as taxas de expressão foram obtidas a partir da divisão da área de tecido epitelial marcado pela área epitelial total.

Na figura 11 é possível apreciar as marcações imuno-histoquímicas de LEKTI em G.C. (Figura 11 A); L.P.M. (Figura 11 B); C.B.D. (Figura 11 C) e C.P.D. (Figura 11 D), através das imagens representativas. As marcações do anticorpo anti-LEKTI estão apontadas pelas setas pretas, acontece nas células epiteliais diferenciadas da mucosa oral e da lesão pré-maligna, além de marcar as células tumorais bem diferenciadas dos carcinomas. Ainda, nesta figura, estão destacadas as características histopatológicas de cada grupo experimental: (i) a cabeça de seta preta aponta atipia das células basais nas L.P.M (Figura 11 A); (ii) o asterisco mostra a pérola de queratina, circundadas pelas células epiteliais bem diferenciadas, que expressam LEKTI, nos C.B.D. (Figura 11 C); (iii) as cabeças de setas azuis apontam as mitoses atípicas, nos C.P.D. (Figura 11 D); e (iv) a seta amarela aponta célula com pleomorfismo nuclear, nos C.P.D (Figura 11 D).

A quantificação das marcações mostra as seguintes médias, com relação à área marcada: 15,69% em G.C.; 10,95% em L.P.M.; 2,23% em C.B.D.; e 1,52% em C.P.D. (Figura 12 E). Como observado, houve significativa diminuição na porcentagem de área epitelial marcada para LEKTI, no grupo C.P.D., quando comparado ao grupo de G.C. (comparar na Figura 12 E; $p < 0,05$, teste de Dunn), e ao grupo de L.P.M. (comparar na Figura 12 E; $p < 0,05$, teste de Dunn). Não houve diferença significativa entre os grupos de M.N. e P.L e entre os grupos de C.B.D. e C.P.D.

Em conjunto, estes dados mostraram que LEKTI é abundantemente expresso na mucosa oral (grupo controle) e em lesões pré-malignas. No entanto, sua expressão é diminuída em carcinomas bem diferenciados.

Figura 11: Expressão absoluta de LEKTI diminui nos carcinomas orais. Padrão da expressão de LEKTI em: **A**, Grupo Controle (seta preta). **B**, Lesão Pré Maligna (seta preta); cabeças de seta = atipia da camada basal do epitélio. **C**, Carcinomas bem diferenciados (seta preta); asterisco= pérola de queratina. **D**, Carcinomas pouco diferenciados (seta preta); cabeças de seta azuis= mitoses atípicas; cabeça de seta amarela= pleomorfismo celular e citoplasmático. **E**, Gráfico da quantificação da expressão de LEKTI. As quantificações em % de área epitelial marcada por área epitelial total. Os dados mostram uma diferença significativa da expressão de LEKTI conforme a malignização do epitélio ($p < 0,0001$ pelo teste Kruskal-Wallis). Barras em **A** e **B**= 25 μ m. Barras em **C** e **D**= 12,5 μ m.

4. Expressão absoluta de KLK5 e KLK7 nos carcinomas orais

Esse resultado objetiva apresentar a quantificação da expressão de KLK5 e KLK7, conhecidos substratos de LEKTI. Os padrões de expressão pela marcação imuno-histoquímica de KLK5 e KLK7 e as características histopatológicas de cada grupo experimental podem ser apreciados na Figura 12.

As imagens representativas apresentam as marcações imuno-histoquímicas de KLK5 em G.C. (Figura 12 A); L.P.M. (Figura 12 B); C.B.D. (Figura 12 C) e C.P.D. (Figura 12 D). As marcações do anticorpo anti-KLK5 estão apontadas pelas setas vermelhas. Na Figura 12 também é possível apreciar as marcações imuno-histoquímicas de KLK7 em G.C. (Figura 12 F); L.P.M. (Figura 12 G); C.B.D. (Figura 12 H) e C.P.D. (Figura 12 I). As características histopatológicas de cada grupo experimental destacadas na figura 12 são: (i) a cabeça de seta preta aponta atipia das células basais nas L.P.M (Figura 12 A para KLK5 e F para KLK7); (ii) o asterisco mostra a pérola de queratina, circundadas pelas células epiteliais bem diferenciadas, que expressam LEKTI, nos C.B.D. (Figura 12 C para KLK5 e H para KLK7); (iii) as cabeças de setas azuis apontam as mitoses atípicas, nos C.P.D. (Figura 12 D para KLK5 e I para KLK7); e (iv) a seta amarela aponta célula com pleomorfismo nuclear, nos C.P.D (Figura 12 D para KLK5 e I para KLK7).

A quantificação das marcações de KLK5 mostra as seguintes médias, com relação à área marcada: 13,83% em G.C.; 12,24% em L.P.M.; 6,31% em C.B.D.; e 4,23% em C.P.D. Houve significativa diminuição na porcentagem de área epitelial marcada para KLK5, no grupo de C.P.D., quando comparado ao grupo de G.C. (comparar na Figura 12 E; $p < 0,05$, teste de Dunn), e ao grupo de L.P.M. (comparar na Figura 12 E; $p < 0,05$, teste de Dunn). Houve diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de área marcada para KLK5, no grupo de C.B.D., quando comparado ao grupo de G.C. (comparar na Figura 12 J; $p < 0,05$, teste de Dunn), e ao grupo de L.P.M. (comparar na Figura 12 E; $p < 0,05$, teste de Dunn). Não houve diferenças significativas entre os grupos de G.C. e L.P.M, e entre os grupos de C.B.D. e C.P.D.

Em relação a quantificação das marcações de KLK7 obteve-se as seguintes médias: 17,32% em G.C., 18,31% em L.P.M., 16,71% em C.B.D., e 14,70% em C.P.D. Através do teste de múltiplas comparações de Dunn é possível observar que não houve modulação significativa na

porcentagem de área marcada para KLK7 entre os grupos de G.C., L.P.M., C.B.D. e C.P.D. (comparar na Figura 12 J).

Figura 12: Quantificação da expressão de KLK5 e KLK7. **A**, Mucosa oral (grupo controle) exibindo a marcação imuno-histoquímica para KLK5 (seta vermelha aponta o padrão de expressão). **B**, Marcação de KLK5 em lesão pré-maligna (cabeça de seta aponta atipia das células basais do epitélio). **C**, Marcação para KLK5 em carcinomas bem diferenciados (asterisco aponta pérola de queratina). **D**, Marcação de KLK5 em carcinomas pouco diferenciados, cabeça de seta azul aponta mitose atípica e amarela aponta pleomorfismo nuclear e citoplasmático. **E**, Gráfico apresentando as quantificações em % de área epitelial marcada para KLK5. **F**, Mucosa oral normal exibindo a marcação imuno-histoquímica para KLK7 (seta verde aponta o padrão de expressão). **G**, Marcação de KLK7 em lesão pré-maligna (cabeça de seta aponta atipia das células basais do epitélio). **H**, Marcação para KLK7 em carcinomas bem diferenciados (asterisco aponta pérola de queratina). **I**, Marcação de KLK7 em carcinomas pouco diferenciados, cabeça de seta amarela aponta pleomorfismo nuclear e citoplasmático. **J**, Gráfico apresentando as quantificações em % de área epitelial marcada para KLK7. Barras: **A, B, F, G** = 25 μ m; em **C, D, H, I** = 12,5 μ m.

5. A Expressão de KLK5 diminui em amostras de carcinoma oral que apresentam maior quantidade de LEKTI

A expressão absoluta de LEKTI diminui no carcinoma. Todavia, a expressão absoluta da KLK5 e da KLK7, não apresenta um padrão solidamente diferente entre a mucosa não transformada e a mucosa transformada. Assumindo que LEKTI é o inibidor da KLK5 e da KLK7, haveria modulação da KLK5 e/ou KLK7, apenas na presença de LEKTI? Em outras palavras, haveria a modulação de KLK5 e KLK7 de forma dependente de LEKTI?

Com o objetivo de responder este questionamento científico, quantificou-se a KLK5 e a KLK7 em amostras com maior ($\geq 1\%$) ou menor ($<1\%$) quantidade de LEKTI. A Figura 13 apresenta os gráficos destas quantificações. Nota-se em G.C. que a expressão média de KLK5 (7,64%) aumenta conforme a expressão de LEKTI apresenta níveis mais altos (19,09%), porém não houve diferença estatística. Em L.P.M a modulação é a mesma, conforme a expressão de LEKTI está em níveis mais altos a expressão de KLK5 aumenta (de 11,09% para 13,7%). Importaneamente, nos carcinomas, as amostras com maior quantidade de LEKTI (++) possuem uma menor expressão de KLK5. Esta diminuição é significativa quando os Carcinomas (4,13%) foram comparados ao G.C. e L.P.M (19,09% e 11,09% respectivamente (Figura 13 A), (Valores de $p < 0,05$, teste de Dunn).

Assim, este resultado mostrou que a expressão de KLK5 diminui significativamente quando a expressão de LEKTI é maior, nos carcinomas orais, quando comparados às mucosas não

neoplásicas. Foi realizada a mesma análise para KLK7 (Figura 13 B), e o resultado não mostrou diferença significativa na modulação de KLK7, a depender de LEKTI.

Figura 13: Expressão das KLK5 e KLK7 em amostras que apresentam maiores e menores taxas de LEKTI. A, Expressão de KLK5 em G.C. (n = 50, círculos), L.P.M. (n = 50, quadrados) e Carcinomas (n = 201, losangos) a depender da baixa expressão de LEKTI (até 1% marcação, círculos pretos, quadrados pretos e losangos pretos) e da alta expressão de LEKTI (> 1% de marcação, círculos cinzas, triângulos cinzas e losangos cinzas) ($p < 0,05$ pelo teste Kruskal-Wallis). B, Expressão de KLK7 em G.C. (n = 50, círculos), L.P.M. (n = 50, quadrados) e Carcinomas (n = 201, losangos) a depender da baixa expressão de LEKTI (até 1% marcação, círculos pretos, quadrados cinzas e losangos cinzas) e da alta expressão de LEKTI (> 1% de marcação, círculos cinzas, triângulos cinzas e losangos cinzas) (para esta protease não houve diferenças estatísticas significantes, $p < 0,05$ pelo teste Kruskal-Wallis).

6. Correlação da expressão de LEKTI com as características demográficas

As amostras para este estudo foram selecionadas de acordo com o diagnóstico histopatológico, que foi associado à expressão de LEKTI, KLK5 e KLK7. Como a expressão de LEKTI diminui robustamente nos carcinomas orais, correlacionou-se a expressão de LEKTI com as características demográficas dos pacientes incluídos no estudo.

A tabela 1 mostra as características demográficas nos pacientes com maior ($\geq 1\%$, ++ LEKTI) ou menor ($< 1\%$, +) LEKTI expressão de LEKTI. A incidência dos carcinomas orais, neste coorte, foi em homens, independentemente da quantidade de LEKTI. Como esperado, a incidência foi maior em pacientes com mais de 60 anos. Entretanto, dos pacientes jovens acometidos com a doença (0 a 59 anos), apenas 19,51% dele apresentaram maior expressão de LEKTI, em comparação com 45,37% destes pacientes que apresentaram menor quantidade de LEKTI. Esta diferença, todavia, não foi estatisticamente significativa (teste do qui-quadrado, $p = 0,073$). Sobre o sítio da lesão, 29,27% dos carcinomas com maior expressão de LEKTI

incidiram na região mandibular, enquanto apenas 9,15 % dos carcinomas com menor expressão de LEKTI incidiram, nesta mesma região (teste qui-quadrado, $p= 0.009$). Finalmente, não houve diferenças estatisticamente significativas com relação ao tabagismo.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes.

		(++) LEKTI	(+) LEKTI
Total dos casos		41	142
		%	%
Gênero			
	Feminino	31.71	34.51
	Masculino	68.29	65.49
Idade			
	0-59	19.51	44.37
	≥60	70.73	45.07
	Sem informações	9.76	10.56
Etnia			
	Branços	65.85	71.13
	Negros	12.20	19.72
	Asiáticos	0.00	1.41
	Sem informações	21.95	7.75
Tabagismo			
	Fumantes	41.46	40.85
	Não fumantes	29.27	32.39
	Ex fumantes	2.44	2.11
	Sem informações	26.83	24.65
Sítio da lesão			
	Língua	19.51	33.10
	Palato	9.76	5.63
	Maxila	2.44	1.41
	Mandíbula (incluindo trígono retromolar)	29.27*	9.15*
	Assoalho bucal	2.44	16.20
	Gengiva	0.00	2.11
	Rebordo alveolar	17.07	13.38
	Mucosa Jugal	7.32	6.34
	Múltiplos locais	2.44	0.70
	Outros	4.88	2.82
	Sem informações	2.44	4.93

n=182 devido à falta de informação de algumas amostras. O teste do Qui-quadrado foi utilizado para comparar os dados clínicos: local da lesão, ocorrência na mandíbula, $*p=0.009$; $q=0.05$.

Levando em consideração o significativo aumento de LEKTI para a região mandibular, buscamos entender qual fator influenciava tal aumento, pois após validar o valor de p com o valor de q (teste qui-quadrado, $q=0,05$) não foi observado diferença estatística significativa. Para isto, observamos o grau de diferenciação dos carcinomas neste sítio anatômico das lesões. De acordo com a tabela 2 podemos observar que 70.83% das amostras na região mandibular correspondiam ao grupo de carcinomas bem diferenciados (C.B.D), enquanto que apenas 29.16% das amostras eram carcinomas pouco diferenciados (C.P.D). Pode-se concluir então, que o aumento de LEKTI está relacionado com o grau de diferenciação das amostras coletadas na região mandibular.

Tabela 2. Diferenciação dos carcinomas na região mandibular.

	C.B.D	C.P.D
Total (100 %)	17 Amostras	7 Amostras
24 amostras		
	%	%
Mandíbula	70.83	29.16
(incluindo triângulo retromolar)		

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O câncer de boca, mais precisamente, o carcinoma oral representa uma ameaça significativa à saúde pública, sendo assim necessário o engajamento científico na busca de melhor entender os mecanismos envolvidos com o surgimento e progressão desta patologia (LEMOS JUNIOR; ALVES; PEREIRA; BIAZEVIC, 2013). Um destes mecanismos é a expressão diferencial de certas proteínas na progressão tumoral (i.e., biomarcadores), que é um processo natural no decorrer da doença, e constitui um ponto crucial tanto no entendimento da doença quanto nos possíveis alvos terapêuticos que ele apresenta (LIST; SZABO; MOLINOLO; SRIURANPONG *et al.*, 2005).

O objetivo do presente estudo foi avaliar e correlacionar a expressão das serino-proteases, KLK5 e KLK7 e seu inibidor LEKTI, com a progressão tumoral do carcinoma oral. Com esse intuito, selecionamos amostras de lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral, afim de testar a hipótese de que a expressão de KLK5, KLK7 e/ou LEKTI é alterada/ modulada de acordo com a malignização do epitélio oral. A modulação da expressão destas proteínas no processo de carcinogênese poderia representar uma ferramenta promissora a ser utilizada como biomarcador de diagnóstico e/ou prognóstico, em carcinomas orais, no futuro próximo.

As amostras selecionadas para este estudo exibem características histológicas associadas às diferentes etapas da carcinogênese oral. Consideramos como mucosa normal (controle), as amostras diagnosticadas como hiperplasia fibrosa, uma conhecida injúria proliferativa benigna da cavidade oral, que surge a partir de um trauma crônico de baixa intensidade, sem relato de malignização (PEDRON; CARNAVA; UTUMI; MOREIRA *et al.*, 2007).

Partindo do pressuposto que os cânceres orais podem ser precedidos por patologias pré-existent na mucosa (as Lesões Orais Potencialmente Malignas) (SPEIGHT; KHURRAM; KUJAN, 2018), buscamos conhecer características histopatológicas mais associadas a progressão maligna nestas lesões. Selecionamos então amostras que apresentavam tais características, e estas representaram a etapa precedente ao carcinoma oral no nosso estudo.

Quando o carcinoma oral é estabelecido, seu perfil histopatológico pode, de forma geral, relacionar-se com o grau de malignidade por ele apresentado. Utilizamos este perfil para

determinar o grupo dos carcinomas bem diferenciados e o grupo de carcinomas pouco diferenciados. Os carcinomas orais bem diferenciados exibem um comportamento mais “benigno” e, de forma geral, apresentam um curso menos agressivo da doença. Os carcinomas orais pouco diferenciados, por outro lado, exibem as menores taxas de sobrevida, com maior índice de recorrência, ou seja, um curso mais agressivo desta patologia (COSTA ADE; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005).

Desta forma determinados os grupos experimentais que representam o processo de malignização do epitélio da mucosa oral e a progressão do mesmo, o passo seguinte então foi comprovar o perfil de expressão de KLK5, KLK7 e LEKTI na mucosa oral.

Nossos resultados iniciais indicaram a expressão de LEKTI, KLK5 e KLK7 em células bem diferenciadas da mucosa oral, com marcação específica em células dos estratos intermédio e superficial, do epitélio oral. Ainda, a positividade para LEKTI é presente em lesões pré-malignas e, em menor quantidade, nas células bem diferenciadas dos carcinomas orais, como exposto nas imuno-histoquímicas aqui representadas. Este achado vai de encontro com o que é visto na literatura, onde as análises de transcriptoma e micro-array mostraram a diminuição da expressão do gene SPINK5 codificador de LEKTI em carcinomas de cabeça e pescoço comparados a linhagens celulares orais normais e tecidos orais normais (GONZALEZ; GUJRATI; FREDERICK; HENDERSON *et al.*, 2003; YE; YU; TEMAM; ZIOBER *et al.*, 2008). Além do mais outro estudo demonstra que a superexpressão de LEKTI em linhagens células imortalizadas de cânceres de cabeça e pescoço levou a diminuição na migração e invasão destas células, sugerindo que LEKTI possa atuar como uma proteína supressora tumoral (JAYAKUMAR; WU; BRIGGS; RADJENDIRANE *et al.*, 2014).

Uma vez que LEKTI inibe diretamente KLK5 e KLK7 (SALES K.U; 2010), é pensado que pode haver a modulação destas proteínas na progressão maligna. Então passamos a investigar a expressão de KLK5 e KLK7, igualmente realizado para LEKTI, e realizamos a quantificação da marcação imuno-histoquímica dessas proteases. Os resultados sugerem que a expressão KLK5 é reduzida em carcinomas orais quando comparados à mucosa normal e lesões pré-malignas. Diferentes relatos divergem no que diz respeito ao aumento ou diminuição dos níveis de KLK5 em carcinomas orais (JOHNSON; MILLER; JIANG; LIU *et al.*, 2016;

LEUSINK; VAN DIEST; FRANK; BROEKHUIZEN *et al.*, 2015; PETTUS; JOHNSON; SHI; DAVIS *et al.*, 2009).

Sobre a expressão de KLK7, não houve modulação significativa nos carcinomas orais quando comparado a amostras pré-malignas e mucosa normal, pouco se encontra na literatura sobre o envolvimento desta protease de forma isolada com o câncer de boca e a carcinogênese.

O resultado sobre a diminuição de KLK5 em carcinomas orais nos intrigou e, inclusive, foi avaliado de forma mais profunda no manuscrito onde os dados desta dissertação estão publicados. Nocauteamos através de CRISPR-Cas9 a KLK5 em uma linhagem celular de carcinoma de boca (cal27), de forma a romper o equilíbrio entre enzima e inibidor (KLK5 e LEKTI, respectivamente), e realizamos ensaios que mimetizam o desenvolvimento tumoral. As células silenciadas para KLK5 migravam e proliferavam-se menos, quando comparadas às células que expressavam KLK5. Além do mais, em xenotransplantes dessas células nos camundongos nude, a ausência de KLK5 contribuiu para a diminuição do crescimento dos tumores gerados, sugerindo que não apenas os níveis absolutos de KLK5, mas a expressão relativa de KLK5 para LEKTI, é que provavelmente está associada a um pior prognóstico do carcinoma de boca (ALVES; KODAMA; DA SILVA; GOMES *et al.*, 2021).

Para tentar entender esta problemática de forma mais detalhada, nos questionamos se haveria a modulação de KLK5 e/ou KLK7, em amostras com alta ou baixa expressão de LEKTI, já que LEKTI é o inibidor cognato de KLK5 e KLK7. Neste trabalho, a marcação média de LEKTI, em mucosa oral, foi de 15,59% das células epiteliais marcadas. A média da quantificação de LEKTI, em carcinomas bem-diferenciados, é de 2,23% das células tumorais marcadas e, em carcinomas pouco diferenciados, é de 1,52% das células tumorais marcadas. Assim, relacionamos, arbitrariamente, amostras de carcinoma que expressavam níveis elevados de LEKTI (superiores a 1%), e menores níveis de LEKTI (inferiores a 1% de expressão).

Nas amostras de carcinomas que expressavam níveis elevados de LEKTI, a expressão de KLK5 está diminuída em comparação a amostras de mucosa oral e lesões pré-malignas que também expressavam níveis mais elevados de LEKTI. Assim, importantemente, este resultado mostrou que a expressão de KLK5 diminui significativamente quando a expressão de LEKTI é maior, nos carcinomas orais. Alternativamente, as amostras malignas e/ou não malignas que expressam menores níveis de LEKTI não mostraram modulação na expressão de KLK5 em

carcinomas orais. Em conjunto estes resultados podem explicar, em parte, os dados contraditórios da expressão de KLK5 nos carcinomas que, em geral, é avaliada independentemente de LEKTI, de forma absoluta (JOHNSON; MILLER; JIANG; LIU *et al.*, 2016; LEUSINK; VAN DIEST; FRANK; BROEKHUIZEN *et al.*, 2015; PETTUS; JOHNSON; SHI; DAVIS *et al.*, 2009). Além do mais, no estudo de ALVES; KODAMA; DA SILVA; GOMES *et al.* (2021), foi feita uma análise de bioinformática em um banco de dados de 570 carcinomas de cabeça e pescoço, associando a expressão do mRNA de LEKTI e KLK5 às características clínicas provenientes destes tumores. Os resultados demonstraram que menores níveis de mRNA de LEKTI estão associados a uma menor sobrevida, o mesmo não acontece com o mRNA para KLK5. Quando foi analisada a expressão relativa de KLK5 para LEKTI, observou-se que quanto maior essa relação, menor foi a sobrevida dos pacientes analisados. Importaneamente, mostra-se novamente a importância da expressão relativa de KLK5 para LEKTI, no prognóstico das lesões malignas de boca.

Não houve diferença significativa na modulação de KLK7, a depender de LEKTI.

A correlação da expressão de LEKTI com os dados demográficos dos pacientes participantes do estudo mostrou que a maior incidência dos carcinomas orais, neste coorte, foi em homens, independentemente da quantidade de LEKTI, este dado vai de encontro com a epidemiologia apresentada pelos principais institutos de pesquisa em câncer no mundo e no Brasil (WHO, IARC, INCA). Sobre a incidência de faixa etária, os resultados apresentaram que o câncer oral neste coorte prevaleceu em indivíduos maiores de 60 anos. Na literatura esta prevalência do câncer oral é bem elucidada nesta faixa etária (GHANTOUS; ABU ELNAAJ, 2017). O tabagismo é um dos fatores etiológicos mais importantes no câncer oral, toda via neste estudo não houve relação significativa de tabagismo e a alta expressão de LEKTI (GHANTOUS; ABU ELNAAJ, 2017; JIANG; WU; WANG; HUANG, 2019).

Por fim, incidência dos carcinomas orais, na região mandibular, foi significativamente maior quando as amostras expressavam maiores quantidades de LEKTI (29,27% dos carcinomas), enquanto 9,15% dos carcinomas incidiram, nesta mesma região, com menor expressão de LEKTI. Esta relação ainda precisa ser mais esclarecida, além do mais quando validamos a estatística com o valor de “q” no teste qui-quadrado não obtivemos significância. Observamos também que o grau de diferenciação na região mandibular deste coorte se tratava

de tumores bem diferenciados em maioria, o que explica o aumento da expressão de LEKTI. Em análises de bioinformática do nosso trabalho de 2021, observamos que a relação de KLK5/LEKTI é o único fator estatisticamente significativo que se correlaciona com a progressão histopatológica dos tumores, dados validados pela análise multivariada de regressão de Cox (ALVES; KODAMA; DA SILVA; GOMES *et al.*, 2021).

Os dados levantados neste estudo nos indicam que LEKTI, por sua especificidade e padrão de expressão, possa ser um forte candidato a biomarcador em casos de carcinoma oral, o que pode preencher uma lacuna importante no tratamento deste tipo de doenças, que é uma detecção precoce e eficaz (MOLINOLO; AMORNPHEMOLTHAM; SQUARIZE; CASTILHO *et al.*, 2009). Uma análise criteriosa dos nossos resultados indica que, talvez, não somente a presença ou ausência de LEKTI, mas também a modulação da expressão de seus alvos (KLK5 e KLK7) possam ser parâmetros prognósticos preditivos valiosos no carcinoma oral, mostrando potencial também para o desenvolvimento futuro de novos biomarcadores para esta neoplasia.

Nitidamente, análises mais extensas e profundas são necessárias para que se avance no processo de validação de LEKTI, KLK5 e KLK7 como biomarcadores, mas os *insights* gerados e aqui expostos têm sua importância neste processo.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- A expressão absoluta de LEKTI diminui nos carcinomas orais. Esta redução é ainda mais acentuada quando consideramos os carcinomas pouco diferenciados (se comparados aos carcinomas bem diferenciados);
- A expressão de KLK5 é reduzida em carcinomas orais quando comparados à mucosa oral e lesões pré-malignas;
- A expressão de KLK7 não sofre alterações significativas (sólidas), no carcinoma oral, quando consideramos a expressão absoluta desta protease;
- A expressão da KLK5 é modulada, negativamente, em amostras de carcinomas orais com maior expressão de LEKTI. Sugerindo a relevância da quantificação da expressão relativa entre KLK5 e LEKTI;
- A incidência dos carcinomas orais, na região mandibular, foi significativamente maior quando as amostras expressavam maiores quantidades de LEKTI. Porém este aumento está relacionado com o grau de diferenciação das amostras deste sítio anatômico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D. *et al.* **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010. 8582714238.

ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S. A. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, 500, n. 7463, p. 415-421, Aug 22 2013.

ALMANGUSH, A.; MÄKITIE, A. A.; TRIANTAFYLLOU, A.; DE BREE, R. *et al.* Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. **Oral Oncol**, 107, p. 104799, Aug 2020.

AWADALLAH, M.; IDLE, M.; PATEL, K.; KADEMANI, D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 628-636, Jun 2018.

BAJAJ, J.; DIAZ, E.; REYA, T. Stem cells in cancer initiation and progression. **J Cell Biol**, 219, n. 1, Jan 6 2020.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; SIDRANSKY, D.; REICHART, P. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. IARC, 2005. 9283224175.

BEN SLAMA, L. [Potentially malignant disorders of the oral mucosa: terminology and classification]. **Rev Stomatol Chir Maxillofac**, 111, n. 4, p. 208-212, Sep 2010.

BITOUN, E.; MICHELONI, A.; LAMANT, L.; BONNART, C. *et al.* LEKTI proteolytic processing in human primary keratinocytes, tissue distribution and defective expression in Netherton syndrome. **Hum Mol Genet**, 12, n. 19, p. 2417-2430, Oct 1 2003.

BORGONÑO, C. A.; DIAMANDIS, E. P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. **Nat Rev Cancer**, 4, n. 11, p. 876-890, Nov 2004.

BORGONÑO, C. A.; DIAMANDIS, E. P. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. **Nature Reviews Cancer**, 4, n. 11, p. 876-890, 2004/11/01 2004.

BRATTSAND, M.; EGELRUD, T. Purification, molecular cloning, and expression of a human stratum corneum trypsin-like serine protease with possible function in desquamation. **J Biol Chem**, 274, n. 42, p. 30033-30040, Oct 15 1999.

BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **The surgical clinics of north America**, 21, p. 947-962, 1941.

CALENIC, B.; GREABU, M.; CARUNTU, C.; TANASE, C. *et al.* Oral keratinocyte stem/progenitor cells: specific markers, molecular signaling pathways and potential uses. **Periodontol** 2000, 69, n. 1, p. 68-82, Oct 2015.

Câncer de boca. 10/08/2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca>. Acesso em: 20/09/2020.

CAUBET, C.; JONCA, N.; BRATTSAND, M.; GUERRIN, M. *et al.* Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. **J Invest Dermatol**, 122, n. 5, p. 1235-1244, May 2004.

CHAVANAS, S.; BODEMER, C.; ROCHAT, A.; HAMEL-TEILLAC, D. *et al.* Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. **Nat Genet**, 25, n. 2, p. 141-142, Jun 2000.

CHENG, M. F.; HUANG, M. S.; LIN, C. S.; LIN, L. H. *et al.* Expression of matriptase correlates with tumour progression and clinical prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, 65, n. 1, p. 24-34, Jul 2014.

CLEMENTS, J. A.; WILLEMSSEN, N. M.; MYERS, S. A.; DONG, Y. The tissue kallikrein family of serine proteases: functional roles in human disease and potential as clinical biomarkers. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 41, n. 3, p. 265-312, 2004.

COSTA ADE, L.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; RAMOS, C. C. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. **Braz J Otorhinolaryngol**, 71, n. 2, p. 181-187, Mar-Apr 2005.

DERAISON, C.; BONNART, C.; LOPEZ, F.; BESSON, C. *et al.* LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. **Mol Biol Cell**, 18, n. 9, p. 3607-3619, Sep 2007.

DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, 61, n. 5, p. 510-515, May 2009.

EGELRUD, T.; BRATTSAND, M.; KREUTZMANN, P.; WALDEN, M. *et al.* hK5 and hK7, two serine proteinases abundant in human skin, are inhibited by LEKTI domain 6. **Br J Dermatol**, 153, n. 6, p. 1200-1203, Dec 2005.

EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Proteolysis as a regulatory mechanism. **Annu Rev Genet**, 38, p. 709-724, 2004.

EISSA, A.; DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. **Biol Chem**, 389, n. 6, p. 669-680, Jun 2008.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K.; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T. *et al.* **WHO classification of head and neck tumours**. International Agency for Research on Cancer, 2017. 9283224388.

FORTUGNO, P.; FURIO, L.; TESON, M.; BERRETTI, M. *et al.* The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: implications for atopic dermatitis. **Hum Mol Genet**, 21, n. 19, p. 4187-4200, Oct 1 2012.

GALLIANO, M. F.; ROCCASECCA, R. M.; DESCARGUES, P.; MICHELONI, A. *et al.* Characterization and expression analysis of the Spink5 gene, the mouse ortholog of the defective gene in Netherton syndrome. **Genomics**, 85, n. 4, p. 483-492, Apr 2005.

GARBER, J. E.; OFFIT, K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol**, 23, n. 2, p. 276-292, Jan 10 2005.

GHANTOUS, Y.; ABU ELNAAJ, I. [GLOBAL INCIDENCE AND RISK FACTORS OF ORAL CANCER]. **Harefuah**, 156, n. 10, p. 645-649, Oct 2017.

GONZALEZ, H. E.; GUJRATI, M.; FREDERICK, M.; HENDERSON, Y. *et al.* Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, 129, n. 7, p. 754-759, Jul 2003.

GÓRA, J.; LATAJKA, R. Involvement of cysteine proteases in cancer. **Curr Med Chem**, 22, n. 8, p. 944-957, 2015.

GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. Measuring cancer evolution from the genome. **J Pathol**, 241, n. 2, p. 183-191, Jan 2017.

HAMDANE, N.; BAUMERT, T. F.; ZEISEL, M. B. [Risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus cure with direct-acting antivirals: the next challenges]. **Med Sci (Paris)**, 34, n. 5, p. 391-394, May 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, 22, n. 2, p. 91-103, Mar 2007.

HERNANDEZ, B. Y.; ZHU, X.; GOODMAN, M. T.; GATEWOOD, R. *et al.* Betel nut chewing, oral premalignant lesions, and the oral microbiome. **PLoS One**, 12, n. 2, p. e0172196, 2017.

HÜBBERS, C. U.; AKGÜL, B. HPV and cancer of the oral cavity. **Virulence**, 6, n. 3, p. 244-248, 2015.

IMREH, S. Genomic alterations in solid tumors. Introduction. **Semin Cancer Biol**, 9, n. 4, p. 241-244, Aug 1999.

ISHIDA-YAMAMOTO, A.; SIMON, M.; KISHIBE, M.; MIYAUCHI, Y. *et al.* Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. **J Invest Dermatol**, 122, n. 5, p. 1137-1144, May 2004.

JAYAKUMAR, A.; WU, H.; BRIGGS, K.; RADJENDIRANE, V. *et al.* LEKTI, A Physiological Inhibitor of Multiple Serine Proteinases, Suppresses Perineural and Lymphovascular Invasion of Human Head and Neck Cancer Cells in A Mouse Orthotopic Model. **MOJ Proteomics Bioinform**, 1, n. 5, p. 00029, 2014.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J. *et al.* Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, 61, n. 2, p. 69-90, Mar-Apr 2011.

JIANG, R.; SHI, Z.; JOHNSON, J. J.; LIU, Y. *et al.* Kallikrein-5 promotes cleavage of desmoglein-1 and loss of cell-cell cohesion in oral squamous cell carcinoma. **J Biol Chem**, 286, n. 11, p. 9127-9135, Mar 18 2011.

JIANG, X.; WU, J.; WANG, J.; HUANG, R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. **Tob Induc Dis**, 17, p. 29, 2019.

JOHNSON, J. J.; MILLER, D. L.; JIANG, R.; LIU, Y. *et al.* Protease-activated receptor-2 (PAR-2)-mediated NF- κ B activation suppresses inflammation-associated tumor suppressor microRNAs in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Biological Chemistry**, 291, n. 13, p. 6936-6945, 2016.

JOU, A.; HESS, J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. **Oncol Res Treat**, 40, n. 6, p. 328-332, 2017.

- KANEMARU, A.; YAMAMOTO, K.; KAWAGUCHI, M.; FUKUSHIMA, T. *et al.* Deregulated matriptase activity in oral squamous cell carcinoma promotes the infiltration of cancer-associated fibroblasts by paracrine activation of protease-activated receptor 2. **Int J Cancer**, 140, n. 1, p. 130-141, Jan 1 2017.
- KANWAL, R.; GUPTA, K.; GUPTA, S. Cancer epigenetics: an introduction. **Methods Mol Biol**, 1238, p. 3-25, 2015.
- KATAOKA, H.; KAWAGUCHI, M.; FUKUSHIMA, T.; SHIMOMURA, T. Hepatocyte growth factor activator inhibitors (HAI-1 and HAI-2): Emerging key players in epithelial integrity and cancer. **Pathol Int**, 68, n. 3, p. 145-158, Mar 2018.
- KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. *In: Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*, 2004. p. 654-654.
- KISHIBE, M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. **J Dermatol Sci**, 95, n. 2, p. 50-55, Aug 2019.
- KOMATSU, N.; TAKATA, M.; OTSUKI, N.; TOYAMA, T. *et al.* Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. **J Invest Dermatol**, 121, n. 3, p. 542-549, Sep 2003.
- KREUTZMANN, P.; SCHULZ, A.; STÄNDKER, L.; FORSSMANN, W. G. *et al.* Recombinant production, purification and biochemical characterization of domain 6 of LEKTI: a temporary Kazal-type-related serine proteinase inhibitor. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 803, n. 1, p. 75-81, Apr 15 2004.
- LEMOES JUNIOR, C. A.; ALVES, F. d. A.; PEREIRA, C. C. T.; BIAZEVIC, M. G. H. Câncer de boca baseado em evidências científicas. **Revista da Associação Paulista de Cirurgias Dentistas**, 67, n. 3, p. 178-186, 2013.
- LEUSINK, F. K.; VAN DIEST, P. J.; FRANK, M. H.; BROEKHUIZEN, R. *et al.* The Co-Expression of Kallikrein 5 and Kallikrein 7 Associates with Poor Survival in Non-HPV Oral Squamous-Cell Carcinoma. **Pathobiology**, 82, n. 2, p. 58-67, 2015.
- LI, Y. C.; CHANG, J. T.; CHIU, C.; LU, Y. C. *et al.* Areca nut contributes to oral malignancy through facilitating the conversion of cancer stem cells. **Mol Carcinog**, 55, n. 5, p. 1012-1023, May 2016.

LIST, K.; SZABO, R.; MOLINOLO, A.; SRIURANPONG, V. *et al.* Dereglated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation. **Genes Dev**, 19, n. 16, p. 1934-1950, Aug 15 2005.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **J Biol Chem**, 283, n. 45, p. 30433-30437, Nov 7 2008.

LÓPEZ-OTÍN, C.; OVERALL, C. M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 3, n. 7, p. 509-519, Jul 2002.

LOURENÇO, S. d. Q. C.; SCHUELER, A. F.; CAMISASCA, D. R.; LINDENBLATT, R. d. C. *et al.* Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 53, n. 3, p. 325-333, 2007.

MÄGERT, H. J.; STÄNDKER, L.; KREUTZMANN, P.; ZUCHT, H. D. *et al.* LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. **J Biol Chem**, 274, n. 31, p. 21499-21502, Jul 30 1999.

MAIA, S.; SOUSA, F. B.; MOTA, M. R. L.; NASCIMENTO, I. V. d. *et al.* **MODALIDADES DE QUIMIOPREVENÇÃO NO TRATAMENTO DE LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E NO CÂNCER ORAL: REVISÃO DE LITERATURA**. 24/03/2020 2020. ISSN 978-85-5722-028-7. Disponível em: www.even3.com.br/Anais/IJOU/49216-MODALIDADES-DE-QUIMIOPREVENCAO-NO-TRATAMENTO-DE-LESOES-POTENCIALMENTE-MALIGNAS-E-NO-CANCER-ORAL--REVISAO-DE-LITERA. Acesso em: 20/09/2020.

MELROSE, R. J. Premalignant oral mucosal diseases. **J Calif Dent Assoc**, 29, n. 8, p. 593-600, Aug 2001.

MOLINOLO, A. A.; AMORNPHIMOLTHAM, P.; SQUARIZE, C. H.; CASTILHO, R. M. *et al.* Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol**, 45, n. 4-5, p. 324-334, Apr-May 2009.

MÜLLER, S. Oral epithelial dysplasia, atypical verrucous lesions and oral potentially malignant disorders: focus on histopathology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 591-602, Jun 2018.

NEVILLE, B. **Patologia oral e maxilofacial**. Elsevier Brasil, 2011. 853524610X.

OBERST, M.; ANDERS, J.; XIE, B.; SINGH, B. *et al.* Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo. **Am J Pathol**, 158, n. 4, p. 1301-1311, Apr 2001.

OIKONOMOPOULOU, K.; HANSEN, K. K.; SAIFEDDINE, M.; VERGNOLLE, N. *et al.* Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. **Biol Chem**, 387, n. 6, p. 677-685, Jun 2006.

ORTMANN, C. A.; KENT, D. G.; NANGALIA, J.; SILBER, Y. *et al.* Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. **N Engl J Med**, 372, n. 7, p. 601-612, Feb 12 2015.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8, n. 3, p. 221-233, Mar 2007.

PAMPALAKIS, G.; SOTIROPOULOU, G. Tissue kallikrein proteolytic cascade pathways in normal physiology and cancer. **Biochim Biophys Acta**, 1776, n. 1, p. 22-31, Sep 2007.

PAVLOPOULOU, A.; PAMPALAKIS, G.; MICHALOPOULOS, I.; SOTIROPOULOU, G. Evolutionary history of tissue kallikreins. **PLoS One**, 5, n. 11, p. e13781, Nov 1 2010.

PEARSON, A. T.; JACKSON, T. L.; NÖR, J. E. Modeling head and neck cancer stem cell-mediated tumorigenesis. **Cell Mol Life Sci**, 73, n. 17, p. 3279-3289, Sep 2016.

PEDRON, I. G.; CARNAVA, T. G.; UTUMI, E. R.; MOREIRA, L. A. *et al.* Hiperplasia fibrosa causada por prótese: remoção cirúrgica com laser Nd: YAP. **Archives of Oral Research**, 3, n. 1, 2007.

PETTUS, J. R.; JOHNSON, J. J.; SHI, Z.; DAVIS, J. W. *et al.* Multiple kallikrein (KLK 5, 7, 8, and 10) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Histol Histopathol**, 24, n. 2, p. 197-207, Feb 2009.

PRASSAS, I.; EISSA, A.; PODA, G.; DIAMANDIS, E. P. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 3, p. 183-202, Mar 2015.

REID, P. A.; WILSON, P.; LI, Y.; MARCU, L. G. *et al.* Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. **Head Neck**, 39, n. 9, p. 1920-1932, Sep 2017.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, 8, n. 9, p. 11884-11894, 2015.

SALES, K. U.; FRIIS, S.; KONKEL, J. E.; GODIKSEN, S. *et al.* Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. **Oncogene**, 34, n. 3, p. 346-356, Jan 15 2015.

SALES, K. U.; MASEDUNSKAS, A.; BEY, A. L.; RASMUSSEN, A. L. *et al.* Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. **Nat Genet**, 42, n. 8, p. 676-683, Aug 2010.

SANKARANARAYANAN, R.; MATHEW, B.; VARGHESE, C.; SUDHAKARAN, P. R. *et al.* Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment. **Oral Oncol**, 33, n. 4, p. 231-236, Jul 1997.

SCHECHTER, N. M.; CHOI, E. J.; WANG, Z. M.; HANAKAWA, Y. *et al.* Inhibition of human kallikreins 5 and 7 by the serine protease inhibitor lympho-epithelial Kazal-type inhibitor (LEKTI). **Biol Chem**, 386, n. 11, p. 1173-1184, Nov 2005.

SIEGEL, R. M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 4, p. 308-317, Apr 2006.

SILVERMAN, S., Jr.; GORSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. **Cancer**, 53, n. 3, p. 563-568, Feb 1 1984.

SOLOMON, B.; YOUNG, R. J.; RISCHIN, D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. **Semin Cancer Biol**, 52, n. Pt 2, p. 228-240, Oct 2018.

SPEIGHT, P. M.; KHURRAM, S. A.; KUJAN, O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 612-627, Jun 2018.

SZABO, R.; BUGGE, T. H. Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 27, p. 213-235, 2011.

THOMPSON, L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. **Ear Nose Throat J**, 85, n. 2, p. 74, Feb 2006.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J.; APOSTOLIDIS, V. A.; DAWSON, M. *et al.* Granule serine proteases are normal nuclear constituents of natural killer cells. **Journal of Biological Chemistry**, 269, n. 28, p. 18359-18365, 1994.

VAN DER WAAL, I. Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 19, n. 4, p. e386-390, Jul 1 2014.

VERBOVŠEK, U.; VAN NOORDEN, C. J.; LAH, T. T. Complexity of cancer protease biology: Cathepsin K expression and function in cancer progression. **Semin Cancer Biol**, 35, p. 71-84, Dec 2015.

VOGEL, L. K.; SAEBØ, M.; SKJELBRED, C. F.; ABELL, K. *et al.* The ratio of Matriptase/HAI-1 mRNA is higher in colorectal cancer adenomas and carcinomas than corresponding tissue from control individuals. **BMC Cancer**, 6, p. 176, Jul 4 2006.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The Path to Cancer --Three Strikes and You're Out. **N Engl J Med**, 373, n. 20, p. 1895-1898, Nov 12 2015.

WARNAKULASURIYA, S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 125, n. 6, p. 582-590, Jun 2018.

WARNER, B. M.; CASTO, B. C.; KNOBLOCH, T. J.; ACCURSO, B. T. *et al.* Chemoprevention of oral cancer by topical application of black raspberries on high at-risk mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 118, n. 6, p. 674-683, Dec 2014.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. Artmed Editora, 2016. 8536315687.

WISNIEWSKI, D. J.; MA, T.; SCHNEIDER, A. Nicotine induces oral dysplastic keratinocyte migration via fatty acid synthase-dependent epidermal growth factor receptor activation. **Exp Cell Res**, 370, n. 2, p. 343-352, Sep 15 2018.

WOO, S. B. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. **Head Neck Pathol**, 13, n. 3, p. 423-439, Sep 2019.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncol**, 38, n. 8, p. 737-746, Dec 2002.

XIE, A.; LIU, J. Chemoprevention of oral cancer in leukoplakia patients: A systematic review and meta-analysis. **J Pak Med Assoc**, 67, n. 9, p. 1415-1419, Sep 2017.

YANG, P.; LI, Z. Y.; LI, H. Q. Potential Roles of Protease Inhibitors in Cancer Progression. **Asian Pac J Cancer Prev**, 16, n. 18, p. 8047-8052, 2015.

Referências Bibliográficas

YE, H.; YU, T.; TEMAM, S.; ZIOBER, B. L. *et al.* Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. **BMC Genomics**, 9, p. 69, Feb 6 2008.

YOUSEF, G. M.; DIAMANDIS, E. P. The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. **Endocr Rev**, 22, n. 2, p. 184-204, Apr 2001.

YOUSEF, G. M.; OBIEZU, C. V.; JUNG, K.; STEPHAN, C. *et al.* Differential expression of Kallikrein gene 5 in cancerous and normal testicular tissues. **Urology**, 60, n. 4, p. 714-718, Oct 2002.

ZHANG, Y.; POTHAKOS, K.; TSIRKA, S. A. Extracellular proteases: biological and behavioral roles in the mammalian central nervous system. **Curr Top Dev Biol**, 66, p. 161-188, 2005.

ALVES, M. G.; KODAMA, M. H.; DA SILVA, E. Z. M.; GOMES, B. B. M. *et al.* Relative expression of KLK5 to LEKTI is associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. **Transl Oncol**, 14, n. 1, p. 100970, Jan 2021.

BAJAJ, J.; DIAZ, E.; REYA, T. Stem cells in cancer initiation and progression. **J Cell Biol**, 219, n. 1, Jan 6 2020.

EISSA, A.; DIAMANDIS, E. P. Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. **Biol Chem**, 389, n. 6, p. 669-680, Jun 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

IARC. **Lip, oral cavity Source: Globocan 2018.** 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 25/09/2020.

IARC, G.-. **CANCER FACT SHEETS.** 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/1-Lip-oral-cavity-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 25/09/2020.

INCA. **O QUE É CANCER.** p. INCA. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 20/09/2020.

INCA. **CÂNCER DE BOCA.** 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca>. Acesso em: 25/09/2020.

Referências Bibliográficas

KISHIBE, M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. **J Dermatol Sci**, 95, n. 2, p. 50-55, Aug 2019.

ONCOMINE. Disponível em: <https://www.oncomine.org/resource/login.html>. Acesso em: 25/09/2020.

PRASSAS, I.; EISSA, A.; PODA, G.; DIAMANDIS, E. P. Unleashing the therapeutic potential of human kallikrein-related serine proteases. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 3, p. 183-202, Mar 2015.

PROTEINATLAS. **The Tissue Atlas**. 2019. Disponível em: https://www.proteinatlas.org/about#the_tissue_atlas. Acesso em: 25/09/2020.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, 8, n. 9, p. 11884-11894, 2015.

SALES, K. U.; MASEDUNSKAS, A.; BEY, A. L.; RASMUSSEN, A. L. *et al.* Matriptase initiates activation of epidermal pro-kallikrein and disease onset in a mouse model of Netherton syndrome. **Nat Genet**, 42, n. 8, p. 676-683, Aug 2010.

SANTIN, A. D.; CANE, S.; BELLONE, S.; BIGNOTTI, E. *et al.* The serine protease stratum corneum chymotryptic enzyme (kallikrein 7) is highly overexpressed in squamous cervical cancer cells. **Gynecol Oncol**, 94, n. 2, p. 283-288, Aug 2004.

SHAW, J. L.; DIAMANDIS, E. P. A potential role for tissue kallikrein-related peptidases in human cervico-vaginal physiology. **Biol Chem**, 389, n. 6, p. 681-688, Jun 2008.

WHO-IARC. **A digital manual for the early diagnosis of oral neoplasia (Anatomy)** 2020. Disponível em: https://screening.iarc.fr/atlasoral_list.php?cat=H4&lang=1. Acesso em: 25/09/2020.

ANEXO

ANEXO

Anexo 1. Pareceres de aprovação do projeto pelo Comitê de ética de Pesquisa do HCRP-USP

PROJETO DE PESQUISA 8270

Ribeirão Preto, 30 de MARÇO de 2015

UPC
HCFMRP - USP

Ilustríssima Senhora
Prof. Dr. Márcia Guimarães Villanova
MD. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Do HCFMRP e da FMRP-USP

Senhora Coordenadora,

Encaminho em anexo o projeto de pesquisa intitulado ESTUDO GENÉTICO DA VIA PROTEOLÍTICA DA MATRIPTASE EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO, juntamente com a documentação necessária para avaliação ética deste Comitê.

O projeto de pesquisa acima mencionado será desenvolvido no departamento de BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E BIOAGENTES PATOGENICOS.

Informo também que o pesquisador responsável e orientador possuem currículo Lattes.

O orçamento do presente projeto foi analisado pela equipe técnica da UPC antes da submissão ao Comitê e foi APROVADO.

Atenciosamente,

KATIUCHIA UZZUN SALES
Prof. Dra. Katiuchia Uzzun Sales
Laboratório de Genética e Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos
FMRP/USP

MARCIA GAIÃO ALVES

De acordo:

Prof. Dr. Dário S. Zamboni
Professor Associado do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos
na Função 5585643 - FMRP/USP

Dra. Ângela Ruyter Cruz
Profa. Titular e Chefe do Depto de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos
Chefe do Laboratório/Laboratório Carimbar e Assinar

Equipe Técnica
UPC
30/03/2015
Natália F. de Oliveira
Escriturária
Unidade de Pesquisa Clínica-HCRP
Matrícula 6043

Obs.: Caso algum chefe possua vínculo com a pesquisa, deverá ser solicitada assinatura do suplente.
Após assinatura em todos os campos, digitalizar toda a documentação do check list e encaminhar ao CEP via Plataforma Brasil.

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA
Fone (16) 3602-2632 FAX: 3602-296

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP -

COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO GENÉTICO DA VIA PROTEOLÍTICA DA MATRIPTASE EM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Pesquisador: Katiuchia Uzzun Sales

Versão: 1

CAAE: 50533515.6.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 109763/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio