LÍGIA GONZAGA FERNANDES

Análise da expressão gênica das proteínas de choque térmico 60 e 70 e dos receptores *Toll-like* 2 e 4 em diferentes graus de displasia em portadores de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio

São Paulo

2019

LÍGIA GONZAGA FERNANDES

Análise da expressão gênica das proteínas de choque térmico 60 e 70 e dos receptores *Toll-like* 2 e 4 em diferentes graus de displasia em portadores de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal). para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Jr

São Paulo

2019

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.

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Fernandes, Lígia Gonzaga.
Análise da expressão gênica das proteínas de choque térmico 60 e 70 e dos receptores *Toll-like* 2 e 4 em diferentes graus de displasia em portadores de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio / Lígia Gonzaga Fernandes ; orientador Celso Augusto Lemos Júnior -- São Paulo, 2019.

89 p. : tab., fig. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Queilite actínica. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Receptores Toll-like. 4. Proteínas de choque térmico. 5. RT-PCR em tempo real. I. Lemos Júnior, Celso Augusto. II. Título.

Fernandes LG. Análise da expressão gênica das proteínas de choque térmico 60 e 70 e dos receptores *Toll-like* 2 e 4 em diferentes graus de displasia em portadores de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 16 /08/2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo
Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina Julgamento: APROVADA

Prof. Dr. José Narciso Rosa Assunção Jr.
Instituição: Universidade Metropolitana de Santos Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Camila de Barros Gallo
Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: APROVADA

Aos meus pais, João (*in memoriam*) e Mirta, que dedicaram suas vidas a mim e às minhas irmãs, que abdicaram de quaisquer desejos e sonhos que tivessem pela nossa criação, educação e formação. Que sempre nos mostraram que não há receita ou fórmula mágica para alcançarmos nossos objetivos, que não sejam dedicação e muito trabalho. Obrigada por cada ensinamento, cada lembrança e por todo o incentivo que sempre me deram (pai, como é difícil escrever para você, sem você estar aqui). Obrigada por tanto!

Ao meu marido Gracio, por sempre ser tão paciente, compreensivo, por ser minha inspiração e meu maior incentivador. Obrigada por todo o seu amor, apoio, por estar comigo nos momentos de perdas e nas conquistas. Obrigada por ser quem eu sempre sonhei em ter ao meu lado e por me amar tanto.

Às minhas amadas irmãs Thaís e Esther, com quem dividi a vida por anos e aprendi desde cedo a respeitar e compreender o outros, principalmente nos momentos mais angustiantes. Obrigada por tantas descobertas juntas, tenho muita sorte de tê-las em minha vida. Amo vocês.

Aos meus amigos que fizeram parte da minha história e que sem vocês eu não seria inteira.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Jr que me acolheu neste doutorado, mesmo com suas inúmeras atividades e muitos alunos a orientar. Obrigada por apoiar este estudo, por suas contribuições e pelo conhecimento proporcionado em todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya que me guiou na vida acadêmica desde a graduação. Sua curiosidade me permitiu estudar o que eu me interessasse. Obrigada por me ajudar a conduzir tantos estudos, pelo incentivo, pelas críticas, paciência, generosidade, humildade e sinceridade. Foi uma honra estar ao seu lado durante tantos anos.

À Profª. Dra. Camila de Barros Gallo, por ter despertado a minha curiosidade pela biologia molecular e ter me iniciado no laboratório. Obrigada por toda a sua dedicação e paciência, sem a sua ajuda e conhecimento este trabalho não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. José Narciso Rosa Assunção Jr, que apoiou e contribuiu significativamente com amostras para este estudo através da Universidade Metropolitana de Santos.

Ao Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP, pela possibilidade de desenvolver a pesquisa no Laboratório de Patologia Molecular e colaboração de sua equipe, principalmente Juvani e Edna.

À todos os professores da Disciplina de Estomatologia por me proporcionarem a formação que tive na melhor faculdade de Odontologia do mundo. Vocês são os melhores.

Aos pacientes que confiaram em mim e estiveram sob meus cuidados, aprimorando meus conhecimentos e se doaram para os avanços nas pesquisas.

À secretária Nina, por toda ajuda, apoio e compreensão durante esses anos. Sempre foi muito querida e em muitos momentos cuidou de mim como uma mãe, obrigada pelo carinho.

Às secretárias Cecília e Marília por terem me ajudado nos momentos em que precisei tanto, mesmo com todas as atividades que lhes pertencem, muito obrigada.

Aos meus amigos de pós-graduação, agradeço o convívio e ajuda. Nos encontraremos muito ainda nos congressos mundo à fora.

Aos meus amigos de dentro ou fora do mundo acadêmico, que cada um à sua maneira, contribuiu para que este trabalho fosse concluído, em forma de apoio, compreensão, colo, carinho e paciência. Perdoem-me a ausência e obrigada por tudo.

À Faculdade de Odontologia da USP por me dar a oportunidade de mais essa formação. Carrego esta “chancela” com muita responsabilidade e orgulho.

À bibliotecária da FOUSP Glauci, por todo o apoio, presteza e agilidade em sanar minhas dúvidas e nas correções de minha tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, que viabilizou esta etapa da minha formação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Fernandes LG. Análise da expressão gênica das proteínas de choque térmico 60 e 70 e dos receptores *Toll-like* 2 e 4 em diferentes graus de displasia em portadores de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

A queilite actínica (QA) é a desordem potencialmente maligna oral mais frequente e precede a maioria dos casos de carcinoma epidermóide (CEC) de lábio em pacientes não fumantes. Acomete principalmente indivíduos do gênero masculino, leucodermas, acima dos 40 anos, com histórico de exposição crônica à radiação ultravioleta (UV). O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica das proteínas de choque térmico (HSP) 60 e 70 e dos receptores *Toll-like* 2 e 4 com lesões de QA e CEC de lábio por meio de RT-PCR em tempo real, a partir de amostras coletadas durante o procedimento cirúrgico de biópsia incisional. Conduziu-se um estudo caso-controle com 40 pacientes portadores de QA e 6 com CEC de lábio, submetendo o material de biópsia aos procedimentos laboratoriais de análise histopatológica e de extração de RNA para estudo da expressão dos TLR e das HSP por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Foram excluídas 7 amostras após o processo de extração de RNA e outras 15 amostras após a amplificação por PCR em tempo real, modificando a casuística para 18 amostras de QA e 6 de CEC de lábio. Os resultados foram analisados pelo método CT comparativo, pelo teste Shappiro-Wilk e pelo teste T-Student. Houve maior expressão da HSP60 e TLR4 na QA em relação ao CEC de lábio, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$). Já a HSP70 foi mais expressa na QA do que no CEC de lábio com diferença estatisticamente significativa ($p=0.034$) e o TLR2 mostrou-se mais expresso no CEC de lábio do que na QA, também com diferença estatisticamente significativa ($p=0.003$). Houve correlação significativa entre o aumento da expressão da HSP70 e os hábitos de tabagismo e exposição solar crônica em pacientes com QA. Estudos mais aprofundados são necessários, visto que não se encontram outros publicados com esses genes em QA e CEC de lábio até a presente data.

Palavras-chave: Queilite actínica. Carcinoma epidermóide de lábio. Receptores Toll-like. Proteínas de choque térmico. RT- PCR em tempo real.

ABSTRACT

Fernandes LG. Analysis of the gene expression of heat shock proteins 60 and 70 and *Toll-like* receptors 2 and 4 in different degrees of dysplasia in patients with actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Corrigida.

Actinic cheilitis (AC) is the most frequent oral malignant disorder and precedes most cases of lip squamous cell carcinoma (SCC) in nonsmoking patients. It mainly affects males, fair skinned, older than 40 years, with a history of chronic exposure to ultraviolet (UV) radiation. The objective of this study was to evaluate the gene expression of the heat shock proteins (HSP) 60 and 70 and the Toll-like receptors 2 and 4 in AC and lip SCC lesions through the real time RT-PCR, from samples collected during the surgical procedure of incisional biopsy. A case-control study was conducted with 40 patients with AC and 6 with lip SCC, and the biopsy material was submitted to laboratory procedures of histopathological analysis and extraction of RNA to study the expression of TLR and HSP through the real-time RT-PCR technique. Seven samples were excluded after the RNA extraction process and another 15 samples after real-time PCR amplification, modifying the sample to 18 of AC and 6 of lip SCC. The results were analyzed using the comparative CT method, the Shappiro-Wilk test and the T-Student test. There was higher expression of HSP60 and TLR4 in the AC in relation to the lip SCC, but there was no statistically significant difference ($p > 0.05$). HSP70 was more expressed in AC than in lip SCC with a statistically significant difference ($p = 0.034$) and TLR2 was more expressed in lip SCC than in AC, also with a statistically significant difference ($p = 0.003$). There was a significant correlation between increased HSP70 expression and smoking habits and chronic sun exposure in patients with AC. More extensive studies are needed, as there are no others published with these genes in AC and lip SCC lip until this date.

Keywords: Actinic cheilitis. Lip squamous cell carcinoma. Toll-like receptors. Heat shock proteins. Real time RT-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Lábio diagnosticado com queilite actínica (QA) apresentando ressecamento, atrofia, perda do limite vermelhão-pele, manchas eritematosas, placa branca, leve eversão do sulco sublabial..... 28

Figura 2.2 - Corte histológico corado em hematoxilina-eosina (HE), com aumento 10x, mostrando epitélio pavimentoso estratificado, hiperortoqueratinizado, nota-se ainda tecido conjuntivo denso apresentando extensas áreas com degeneração basofílica caracterizando elastose solar, conforme apontado na seta. 29

Figura 2.3 - Foto clínica de paciente com diagnóstico de CEC de lábio. Nota-se a presença de atrofia, perda do limite vermelhão-pele, eversão do sulco sublabial, manchas eritematosas e acastanhadas, ressecamento e pequena crosta onde foi realizada a biópsia com suspeita de QA. 35

Figura 2.4 - Observa-se no corte histológico Ilhas de epitélio infiltrando o tecido conjuntivo, presença de pleomorfismo celular e nuclear (HE, aumento 10x) 35

Figura 2.5 - Vias de sinalização dos TLRs em mamíferos. 38

Figura 5.1 - Diagrama ilustrando o fluxo dos pacientes admitidos e excluídos neste estudo de acordo com as etapas clínicas e laboratoriais 55

Figura 5.2 - A: Curva de amplificação considerada adequada, evidenciando amplificação exponencial do produto de PCR e a delimitação automática do limiar de amplificação exponencial pelo equipamento de PCR em tempo real (Threshold). B: Curva de dissociação dos iniciadores conferindo especificidade da reação de PCR..... 56

Figura 5.3 - Gráfico representando a diferença na expressão dos genes estudados, por meio da análise do CT comparativo a partir da amplificação em tempo real, entre o grupo caso (QA) e controle (CEC de lábio) evidenciando aumento na expressão da HSP60, HSP70 e TLR4 na QA em relação ao CEC de lábio. E redução da expressão do TLR2 na QA em relação ao CEC de lábio. Os resultados foram estatisticamente significativos para as análises da expressão gênica da HSP70 e do TLR2 ($p < 0.05$) 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Caracterização e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real 49

Tabela 4.2 - Distribuição das quantidades utilizadas de cada iniciador, e demais reagentes para PCR, definida a partir da análise da curva padrão..... 51

Tabela 5.1 - Características demográficas dos pacientes com QA e CEC de lábio . 53

Tabela 5.2 - Características clínicas e histopatológicas da amostra 54

Tabela 5.3 - Correlação entre a expressividade do gene da HSP70 em amostras de QA e as características clínicas e histológica destes pacientes 58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
APC	células apresentadoras de antígenos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CDO	Centro de Diagnóstico Oral
CEC	carcinoma epidermóide
CO_2	dióxido de carbono
CT	*cycle threshold*
DNA	ácido desoxirribonucleico
EAO	espécies ativas de oxigênio
Er:YAG	érbio – ítrio – alumínio - granada
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
FPS	fator de proteção solar
GAPDH	gene constitutivo Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
h	horas
HSP	proteína de choque térmico
IL-1	interleucina-1
IL-1R	receptor para interleucina-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LPM	Laboratório de Patologia Molecular
LPO	líquen plano oral
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MyD88	fator de diferenciação mielóide 88
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	nanômetro
O_2	oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	*odds ratio* – razão de chances
p	nível de significância

PAMP	padrões moleculares associados a patógenos
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDT	terapia fotodinâmica
pH	potencial hidrogeniônico da água
PRR	receptores reconhecedores de padrões moleculares
QA	queilite actínica
RNA	ácido ribonucleico
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RPM	rotação por minuto
RT-PCR	transcrição reversa prévia a reação em cadeia da polimerase
s	segundos
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TIR	domínio citoplasmático comum ao TLR e ao IL-1R
TLR	receptores *Toll-like*
TRIF	adaptador contendo o domínio TIR indutor de interferon-β
Unimes	Universidade Metropolitana de Santos
UV	radiação ultravioleta
UVA	espectro A da radiação ultravioleta
UVB	espectro B da radiação ultravioleta
μg	micrograma
μL	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

ºC	graus Celsius
%	porcentagem
<	menor
>	maior
=	igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 25
2 REVISÃO DE LITERATURA 27
2.1 Queilite actínica 27
2.2 Radiação ultravioleta 31
2.3 Carcinoma epidermóide de lábio 33
2.4 Receptores *Toll-like* 36
2.5 Proteínas de choque térmico 39
3 PROPOSIÇÃO 43
4 MATERIAL E MÉTODOS 45
4.1 CASUÍSTICA 45
4.1.1 Critérios de inclusão 46
4.1.2 Critérios de exclusão 46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 46
4.2.1 Obtenção das amostras 46
4.2.2 Experimentos 47
4.2.2.1 Extração do RNA total 47
4.2.2.2 Quantificação do RNA e verificação de sua qualidade 48
4.2.3 RT-PCR em tempo real 49
4.2.3.1 Iniciadores 49
4.2.3.2 Tratamento das amostras de RNA com DNase 50
4.2.3.3 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA 50
4.2.3.4 Reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real 51
4.2.4 Avaliação dos resultados e análises estatísticas 52
5 RESULTADOS 53
5.1 Características gerais dos pacientes 53
5.2 Avaliação da expressão gênica das HSP e dos TLR 55
6 DISCUSSÃO 59
7 CONCLUSÕES 65
REFERÊNCIAS 67
APÊNDICES 77
ANEXOS 79

1 INTRODUÇÃO

As desordens potencialmente malignas compõem um grupo de condições e lesões epiteliais com risco importante de transformação maligna (1). Estas desordens incluem diferentes entidades, sendo, no Brasil, a mais frequente delas a queilite actínica (QA). Esta lesão afeta principalmente o lábio inferior de indivíduos do gênero masculino, que sofreram exposição solar crônica, leucodermas acima de 40 anos.

A exposição crônica à radiação solar ultravioleta (UV) é considerada o fator etiológico da QA. A radiação UV é classificada como não ionizante e distinguida em três classes de acordo com seu comprimento de onda: UVA, UVB e UVC. A UVA penetra profundamente na pele e é responsável pelo fotoenvelhecimento, a UVB pode causar queimaduras na pele e alterações mutagênicas no DNA, e a UVC é praticamente toda absorvida pela camada de ozônio (2).

Talvez a QA seja a lesão oral potencialmente maligna mais negligenciada, pois seus sinais clínicos são muitas vezes confundidos com sinais do envelhecimento natural dos indivíduos e os profissionais de saúde, principalmente cirurgiões-dentistas, não são treinados para observar os sinais da lesão e diagnostica-la precocemente ou simplesmente ignoram os lábios durante o exame clínico. Junta-se a isso o fato de a maioria dos pacientes ser assintomática e não procurar ajuda ou orientação profissional (3).

Embora a grande maioria das lesões de câncer de lábio em pacientes não fumantes decorrerem da evolução maligna de QA, ainda não existem dados conclusivos sobre a sua taxa de transformação maligna. O interesse em seu estudo consiste no fato de se tratar de uma lesão bastante frequente e teoricamente evitável ou passível de bom controle.

Clinicamente o lábio pode apresentar atrofia, ressecamento, perda do limite vermelhão-pele, eversão do sulco sublabial, manchas eritematosas, acastanhadas ou leucoplásicas, fissuras, placas, crostas, erosões, e até mesmo úlceras. No exame histopatológico é possível observar no epitélio acantose, hiperqueratose, atrofia e displasia, e no conjuntivo processo inflamatório perivascular e elastose solar (4).

Apesar do grande número de trabalhos publicados a respeito da QA e do CEC de lábio, os mecanismos envolvidos e a sequencia de eventos ainda carecem

de esclarecimento. Os TLR são mediadores centrais na resposta imune inata e adaptativa, estando fortemente associados à patogênese de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes e, consequentemente relacionados a muitas doenças de pele, entre elas, injúrias pela radiação UV (5). Sabe-se também que os TLR tem importante papel na regressão e promoção do câncer (6,7). A radiação UVB estimula a supra-regulação das HSPs dos queratinócitos expostos à sua ação. As HSPs são capazes de se ligarem aos receptores TLR 2 e 4 e estimulam o curso da interleucina-1 (IL-1) nas células dentríticas. Essa sinalização induz a produção de citocinas imunosupressivas, como a IL-10. Possivelmente esse mecanismo possa explicar o papel adicional da radiação UVB no desenvolvimento do câncer junto ao seu efeito mutagênico. No campo das pesquisas moleculares, não há estudos acerca dos receptores Toll-like (TLR) e das proteínas de choque térmico (HSP) sobre essas lesões especificamente, tampouco alguma correlação entre elas nesse sentido.(8,9).

Esses aspectos nos levaram a desenvolver a presente pesquisa buscando contribuir com o conhecimento sobre a interação desses mediadores da resposta imune no contexto dos casos de QA e CEC de lábio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queilite actínica

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna que afeta os lábios, principalmente o inferior devido à sua localização anatômica naturalmente mais exposta à radiação solar (10). A etiologia da QA está diretamente relacionada à radiação ultravioleta (UV) dos raios solares que apresentam potencial de provocar mutações no DNA, elevando assim o potencial carcinogênico nos tecidos a ela expostos (11).

Comumente os indivíduos mais afetados são homens acima dos 40 anos, leucodermas, que exercem profissões que exigem exposição solar frequente como pescadores, agricultores e outros trabalhadores rurais, motoristas, engenheiros, topógrafos, pedreiros, carteiros e outros. A melanina constitui proteção natural contra a radiação UV, o que explica a reduzida ocorrência de QA em melanodermas (10,12,13).

Os lábios são mais suscetíveis à radiação tanto por sua localização ser propícia à incidência dos raios UV, quanto devido à espessura epitelial delgada e menor proteção de queratina em relação à pele. Além de contar com menos melanina e quase nenhuma secreção por parte das glândulas sebáceas e sudoríparas, diferente do que ocorre na pele. Sendo assim, os indivíduos de pele clara são mais propensos a desenvolver QA e CEC de lábio (4,10,14,15).

Há pouco tempo acreditava-se que mulheres são menos afetadas que homens devido ao fato de usarem batons, o que poderia funcionar como uma barreira protetora contra os raios UV, porém estudos recentes mostram que essa diferença pode estar associada a um fator protetor hormonal relacionado ao estrógeno (16).

A QA em geral manifesta-se em toda a extensão do lábio inferior, e pode apresentar sinais diversos como atrofia, perda de elasticidade, ressecamento, fissuras, edemas e descamação. Na maioria dos casos é assintomática e pode evoluir lentamente ao longo dos anos, proporcionando a falsa impressão de que o lábio apresenta características modificadas pelo do avanço natural da idade. Com o

passar do tempo, o lábio vai perdendo o limite entre vermelhão e pele adjacente, com enrijecimento ou espessamento dessa região e ocorre a eversão do sulco sublabial inferior. Também são características importantes manchas eritematosas, brancas e acastanhadas, placas brancas, sangramento, crostas, erosões e úlceras. O aspecto do lábio não é, em geral, uniforme, podendo apresentar alguns dos sinais citados em diferentes partes do mesmo (4,10,14). Algumas dessas características estão presentes na Figura 2.1.

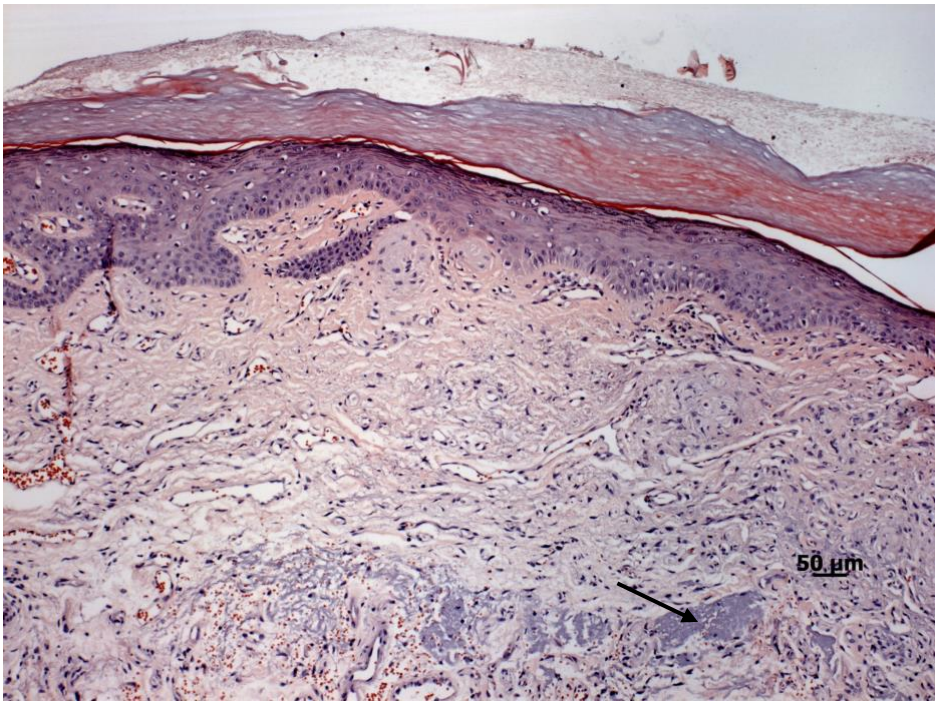
Figura 2.1 – Lábio diagnosticado com queilite actínica (QA) apresentando ressecamento, atrofia, perda do limite vermelhão-pele, manchas eritematosas, placa branca, leve eversão do sulco sublabial

Ao exame histológico, a QA pode apresentar epitélio escamoso estratificado com áreas de acantose e outras de atrofia. A camada de queratina pode ter aumento variado e no tecido conjuntivo próximo ao epitélio é observada a degeneração basofílica amorfa das fibras elásticas e colágenas do colágeno provocada pela radiação UV, chamada de elastose solar como é mostrada na Figura 2.2 (11,17). Os tipos mais afetados pela degradação são os colágenos I e III (4,14,18). Apenas 5 a 10% da radiação UV é refletida pela pele e mais de 70% é absorvida, o lábio absorve ainda mais por ser menos espesso, sendo assim a elastose solar talvez se

instale no sentido de promover algum tipo de proteção para os tecidos mais profundos (19,20).

Também é possível notar a presença de discreto infiltrado inflamatório adjacente ao epitélio, composto por linfócitos e eventualmente plasmócitos. Vasos sanguíneos dilatados também podem ser encontrados.

Figura 2.2 – Corte histológico corado em hematoxilina-eosina (HE), com aumento em 10x, mostrando epitélio pavimentoso estratificado, hiperortoqueratinizado, nota-se ainda tecido conjuntivo denso apresentando extensas áreas com degeneração basofílica caracterizando elastose solar, conforme apontado na seta.



As displasias epiteliais constituem alterações arquiteturais e citológicas importantes e foram classificadas pela OMS em displasia leve, moderada e intensa. O critério sugerido para a classificação de uma displasia discreta é a alteração arquitetural restrita ao terço inferior do epitélio acompanhada por atipia citológica. Para displasia moderada é preciso que haja alterações arquiteturais estendendo-se ao terço médio do epitélio. Para displasias intensas os critérios são alterações arquiteturais em mais de dois terços do epitélio associadas à atipias citológicas (21).

São consideradas alterações arquiteturais: estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células da camada basal, projeções epiteliais em forma de gota, aumento do número de figuras de mitose, mitoses anormalmente superficiais

(mitoses altas), queratinização prematura em células isoladas (disqueratose), pérolas de queratina nas projeções epiteliais. As alterações citológicas são: variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear), variação anormal de tamanho da célula (anisocitose), variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular), proporção núcleo/citoplasma aumentada, aumento do tamanho do núcleo, figuras de mitoses atípicas, número e tamanho de nucléolos aumentados, hipercromatismo (22).

Apesar desses critérios, a avaliação das displasias ainda é subjetiva, podendo variar de acordo com cada patologista. Alguns estudos sugerem que a evolução do carcinoma não está associada com nenhum tipo particular de displasia (21,23,24).

Existem algumas modalidades para o tratamento da QA, sendo a maioria delas invasivas e de difícil aceitação pelos pacientes, pois além de ser uma condição muitas vezes assintomática, os efeitos colaterais podem ser bastante incômodos. Os tratamentos cirúrgicos e ablativos como vermelhonectomia, criocirurgia, eletrocirurgia e ablação com laser de alta potência, tem diversos efeitos adversos. Já os tratamentos tópicos e menos invasivos como terapia fotodinâmica (PDT), aplicação de anti-inflamatórios, imoquimod e 5-fluorouracil (5-FU), tem sua efetividade questionável (25).

Dos métodos cirúrgicos, a vermelhonectomia é o método mais empregado, e também o mais agressivo, pois consiste na remoção cirúrgica de todo o vermelhão do lábio, podendo causar diversas complicações e inconvenientes como parestesia, infecção, necrose, edema, hematoma e presença de pelos no lábio devido às suturas (22,26,27).

Os lasers de alta potência como dióxido de carbono (CO_2) e érbio:YAG são utilizados para vaporização do vermelhão do lábio. A técnica tem bons resultados e menos desvantagens pós-operatórias que a cirurgia com bisturi, porém podem causar parestesia, formação de tecido de granulação, disestesia, dor, sensação de queimação e edema (25,28–32).

A aplicação tópica de agentes quimioterápicos também constitui uma possibilidade de tratamento. É frequentemente utilizada em pele com queratose actínica, lesão com características similares e mesma etiologia. Os mais estudados são o imiquimod, 5-fluorouracil (5-FU) e o mebutato de ingenol, sendo o imiquimod o

de melhor resultado relatado até os dias atuais. Podem causar dor, edema, erosões, formação de vesícula e crosta, além de ulceração (25,33–35).

Outra modalidade de tratamento é a terapia fotodinâmica (PDT), que consiste no uso de uma fonte de luz e um fotossensibilizador, que uma vez ativado produz radicais livre de oxigênio (O_2) que desestabilizam as membranas celulares e organelas, induzindo a morte celular. Porém, também apresenta efeitos indesejados como eritema, edema, dor e formação de crosta (25,36–40). O estudo de Sotiriou et al combinou a aplicação do PDT e imiquimod 5% e obteve bons resultados (41). O estudo de Choi et al relatou sucesso com 33 pacientes ao fazer ablação com laser de Er:YAG antes da aplicação do fotossensibilizador, para que este atingisse maior profundidade e em seguida fazer o PDT (42).

O uso tópico de agentes anti-inflamatórios é uma abordagem que vem sendo utilizada recentemente. Manipula-se um gel de diclofenaco a 3% com ácido hialurônico a 2,5%. Pode causar edema, eritema e sensação de queimação. Ainda existem poucos estudos à respeito, mas com bons resultados clínicos (43–45).

Existem poucos estudos envolvendo peeling químico, dermoabrasão, eletrodissecação e criocirurgia (25,46,47).

Muitos estudos à respeito dos métodos de tratamentos relatados acima não analisam os efeitos em nível histológico que mostraria a gradação das atipias no pós-tratamento, relatam apenas os resultados clínicos, limitando as análises. Outro fator limitador importante é o tempo de acompanhamento dos pacientes, que na maioria dos estudos é bastante curto.

2.2 Radiação Ultravioleta

O aumento da radiação solar UV nas últimas décadas, tem demandado maior atenção com a proteção solar da pele. A incidência de câncer de pele tem aumentado drasticamente no mundo inteiro (48,49). A radiação UV é considerada não-ionizante e é classificada em UVA (315-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (100 a 280nm), sendo a última praticamente toda absorvida pela camada de ozônio (2).

A maior parte da radiação UV recebida, pertence ao comprimento de onda UVA, que passa direto pela camada de ozônio e penetra profundamente na pele e é

responsável pelo fotoenvelhecimento. A radiação UVB é apenas parcialmente absorvida pela atmosfera e possui mais energia devido ao seu comprimento de onda, tendo maior poder de penetração, sendo mais prejudicial que a UVA (2,50).

As radiações UVA e UVB podem causar mutações no DNA. Quando a radiação UV penetra profundamente na pele, afeta derme, epiderme e suas principais células como queratinócitos e fibroblastos. Os fótons UV promovem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) a partir da interação em cromóforos endógenos. As ROS ou RNS oxidam as moléculas celulares, promovendo alterações no DNA. As ROS, RNS e outros produtos oxidados, afetam várias vias celulares e a expressão de várias moléculas sinalizadoras que podem iniciar o desenvolvimento de alterações patológicas no tecido cutâneo, como proliferação e diferenciação de células epidérmicas alteradas, diminuição na síntese do colágeno, acúmulo de material amorfo e aumento da degradação do colágeno e elastina. A exposição crônica a radiação UV causa um acúmulo gradual de moléculas danificadas que resultam em respostas inflamatórias, imunossupressão, hiperpigmentação da pele, fotoenvelhecimento e carcinogênese (49,51,52).

Entre os muitos efeitos biológicos da radiação UV, um deles é a supressão do sistema imune tanto local quanto sistêmico. Em nível local, pequenas doses de UV aparentemente diminuem o número de células de Langerhans, inibindo o potencial de apresentação de antígenos, o que é sustentado pela observação da hipersensibilidade de contato induzida em peles previamente irradiadas com UV que é drasticamente reduzida (52).

A penetração do UVB pode provocar alterações mutagênicas, como por exemplo, no gene supressor de tumor Tp53 (responsável pela expressão da proteína p53) que se acredita estar diretamente ligado à carcinogênese precoce de pele e lábio. Esse e outros danos genéticos podem acarretar na transformação maligna dos epitélios. A radiação UV pode alterar definitivamente genes responsáveis pela iniciação, promoção e progressão neoplásica (23,52).

A exposição contínua à radiação solar acumula e agrava os danos moleculares, dependendo das variáveis de tempo, dose, frequência da exposição, além da sensibilidade das células expostas e da capacidade de reparo do DNA, que tem importância vital para a manutenção da integridade genética das células (53).

A QA é resultado da expansão clonal de queratinócitos transformados induzidos pela radiação UVB com alterações que podem causar instabilidade genômica. Essa radiação causa danos às fibras elásticas e produz a degeneração do colágeno, o que resulta na formação de fissuras verticais no vermelhão, promovendo edema, espessamento e menor maleabilidade do tecido (15).

Apesar de ser uma condição potencialmente maligna, o índice de transformação maligna da QA ainda não está claro. Somente o diagnóstico clínico não é suficiente, é necessário ter o exame histopatológico para melhor entendimento dos fatores associados à transformação maligna. O CEC de lábio é precedido pela QA em 90% dos casos, e muitas vezes a falta do exame histopatológico pode esconder uma lesão de CEC em estágio inicial que poderia ser mais facilmente tratada do que no caso do diagnóstico tardio (20).

2.3 Carcinoma epidermóide de lábio

O câncer oral é uma das neoplasias malignas mais frequentes na população brasileira, é a 5ª neoplasia mais frequente entre homens e a 12ª mais frequente entre mulheres. Para o biênio 2018-2019 foram estimados 11,2 novos casos para cada 100.000 homens brasileiros e 3,28 para cada 100.000 mulheres (54). A incidência do CEC de lábio do Brasil é imprecisa, pois o Instituto Nacional do Câncer (INCA) agrupa as lesões labiais e intraorais, porém a literatura descreve algo em torno de 25 a 30% deste total diagnosticado ser câncer de lábio e 95% deles ser de fato CEC de lábio (20). Em países como Austrália, Canadá e Espanha, o lábio é o sítio mais prevalente dos cânceres de boca (55).

A taxa de sobrevivência do câncer oral é de aproximadamente 50% em cinco anos, e quando apenas o carcinoma de lábio é considerado, a taxa de sobrevivência aumenta. O CEC de lábio é considerado uma doença pouco agressiva, com prognóstico favorável por sua progressão lenta. Quando diagnosticado em estágio inicial, a cura ocorre em 80 a 90% dos casos e a taxa de mortalidade varia de 10 a 15%, porém quando diagnosticado tardiamente, a taxa de sobrevivência em 5 anos cai para 25%. Metástases podem ocorrer em estágios avançados em 11 a 18% dos casos. (20).

A maioria das lesões é diagnosticada entre a sexta e sétima décadas de vida em indivíduos leucodermas, provavelmente por ser o resultado do acúmulo de alterações moleculares e é vinte vezes mais comum no lábio inferior do que no superior (20). O CEC oral tem o tabaco como principal fator etiológico, ao passo que o CEC de lábio está quase sempre associado a exposição à radiação UV, ou seja, decorrente da evolução maligna de queilites actínicas (55).

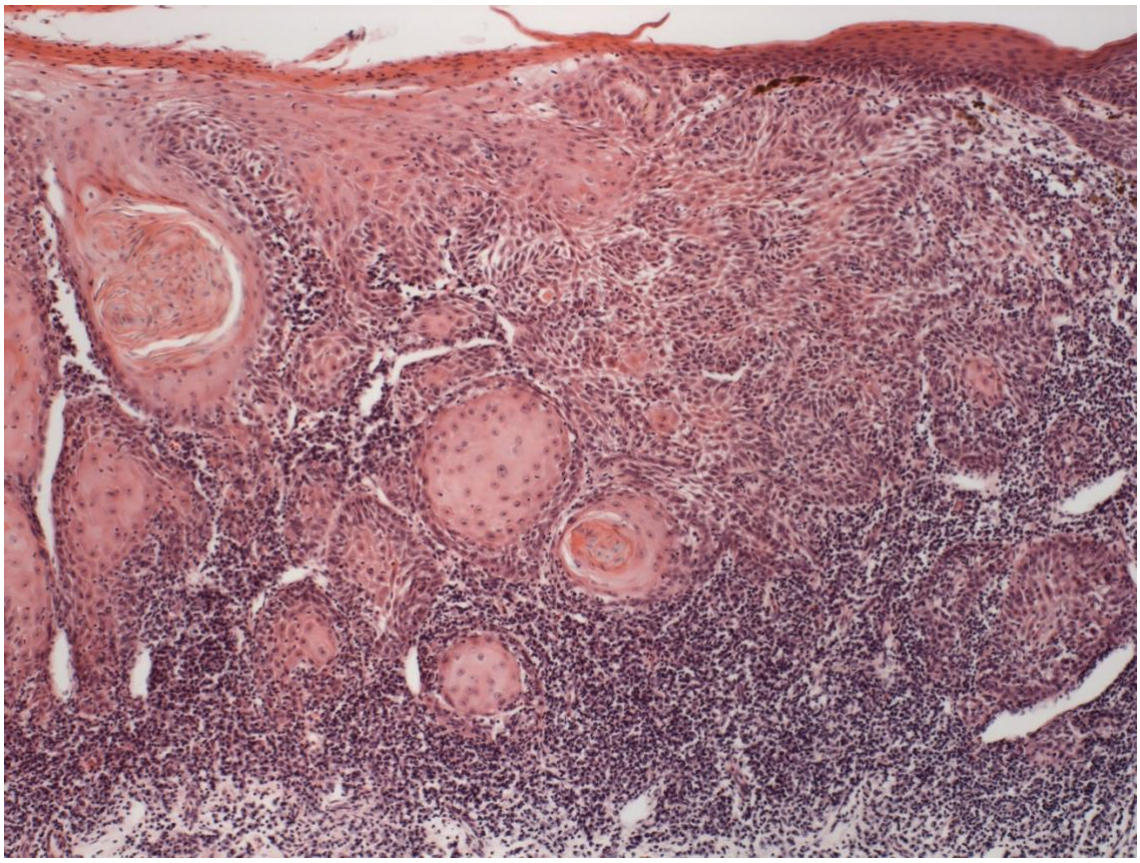
A probabilidade de uma QA progredir para um CEC de lábio é 2.5 vezes maior do que a probabilidade da queratose actínica, lesão em pele com o mesmo fator etiológico, evoluir para CEC em pele, podendo levar mais de duas a três décadas de exposição solar crônica para ocorrer a transformação maligna. Fatores genéticos, idade, área geográfica de residência, hábitos, imunossupressão e cor da pele são aspectos que podem contribuir para a evolução da lesão (56).

Inicialmente a lesão de CEC é assintomática e pode ser difícil de distinguir da QA. Manifesta-se como placa branca, fissuras que não cicatrizam, descamações e crosta (Figura 2.3) até evoluir para pequena úlcera e então lesão ulcerada clássica com exsudato, bordas endurecidas, base infiltrativa, sintomática e que não cicatriza. Pode ainda sangrar espontaneamente, ser verrucosa e formar uma massa exofítica friável (55,57).

O quadro histológico é caracterizado por ilhas de células epiteliais presentes no conjuntivo. As células tumorais tem citoplasma eosinofílico e núcleos aumentados, por vezes hipercromáticos e proporção núcleo-citoplasma aumentada. Diversos graus de pleomorfismo nuclear e celular podem ser observados, bem como a presença, diâmetro e intensidade de pérolas de queratina em proporções variáveis. A invasão é caracterizada pela extensão irregular do tumor através da membrana basal em direção ao tecido conjuntivo na derme (Figura 2.4). A invasão da derme pode ocorrer de forma expansiva ou de maneira infiltrativa no tecido adiposo, músculo, osso, sangue e vasos linfáticos, causando destruição tecidual. Muitas vezes há resposta inflamatória, predominantemente linfocitária, ao epitélio invasor e áreas focais de necrose (20).

Figura 2.3 – Foto clínica de paciente com diagnóstico de CEC de lábio. Nota-se a presença de atrofia, perda do limite vermelhão-pele, eversão do sulco sublabial, manchas eritematosas e acastanhadas, ressecamento e pequena crosta onde foi realizada a biópsia com suspeita de QA

Figura 2.4 – Observa-se neste corte histológico ilhas de epitélio infiltrando o tecido conjuntivo, presença de pleomorfismo celular e nuclear. (HE, aumento 10x).



O sistema de estadiamento TNM é o que determina o tipo de tratamento. T representa o tamanho do tumor, N a presença ou ausência de metástase em linfonodos regionais e M a presença ou ausência de metástases à distância (58). Tumores menores que 2cm (T1) ou de 2 a 4cm (T2) são tratados com cirurgia ou radioterapia. Caso as margens sejam positivas ou a invasão maior que 5mm, é recomendado que as duas terapias sejam realizadas. Em tumores maiores que 4cm (T3) ou invadindo estruturas adjacentes (T4), o tratamento de escolha é a cirurgia com radioterapia e, caso linfonodos tenham sido acometidos, é realizado o esvaziamento cervical (20).

A cirurgia é o tratamento de escolha para a maior parte dos tumores de lábio, e a ressecção total é o procedimento indicado. Essa terapêutica pode causar grandes deformidades impactando significativamente a qualidade de vida do paciente, desde que o lábio é a principal característica do terço inferior da face, influenciando na aparência, mastigação e deglutição. A reconstrução desta área é complexa e um desafio para os cirurgiões (57).

2.4 Receptores Toll-like

Os receptores Toll-like constituem um grupo de receptores de superfície celular que são componentes importantes do sistema imune. Cada receptor tem suas propriedades ligantes, vias de sinalização celular e perfis de produção de citocinas. Defeitos nas propriedades ligantes tem potencial para causar o aumento da susceptibilidade a infecções e desregulações anti-inflamatórias.

Através dos receptores Toll-like o sistema imune inato demonstra especificidade e controla a ativação do sistema imune adaptativo com precisão. O sistema imunológico inato é encarregado de conter a proliferação de patógenos invasores durante os estágios iniciais de uma infecção, antes do aumento linfocitário que caracteriza a resposta imune adaptativa. A principal característica do sistema imune inato é a rapidez com que ele responde aos micróbios e coordena a resposta celular apropriada para defender o hospedeiro. Para esta resposta ocorrer, o organismo estranho deve rapidamente ser reconhecido e identificado como uma

ameaça. São responsáveis pelo reconhecimento de padrões (PRR), mais especificamente, padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), que são derivados de um amplo espectro de agentes infecciosos, como bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus, protozoários e fungos. Esta interação PRR-PAMP propicia o desencadeamento da resposta imune inata (59,60).

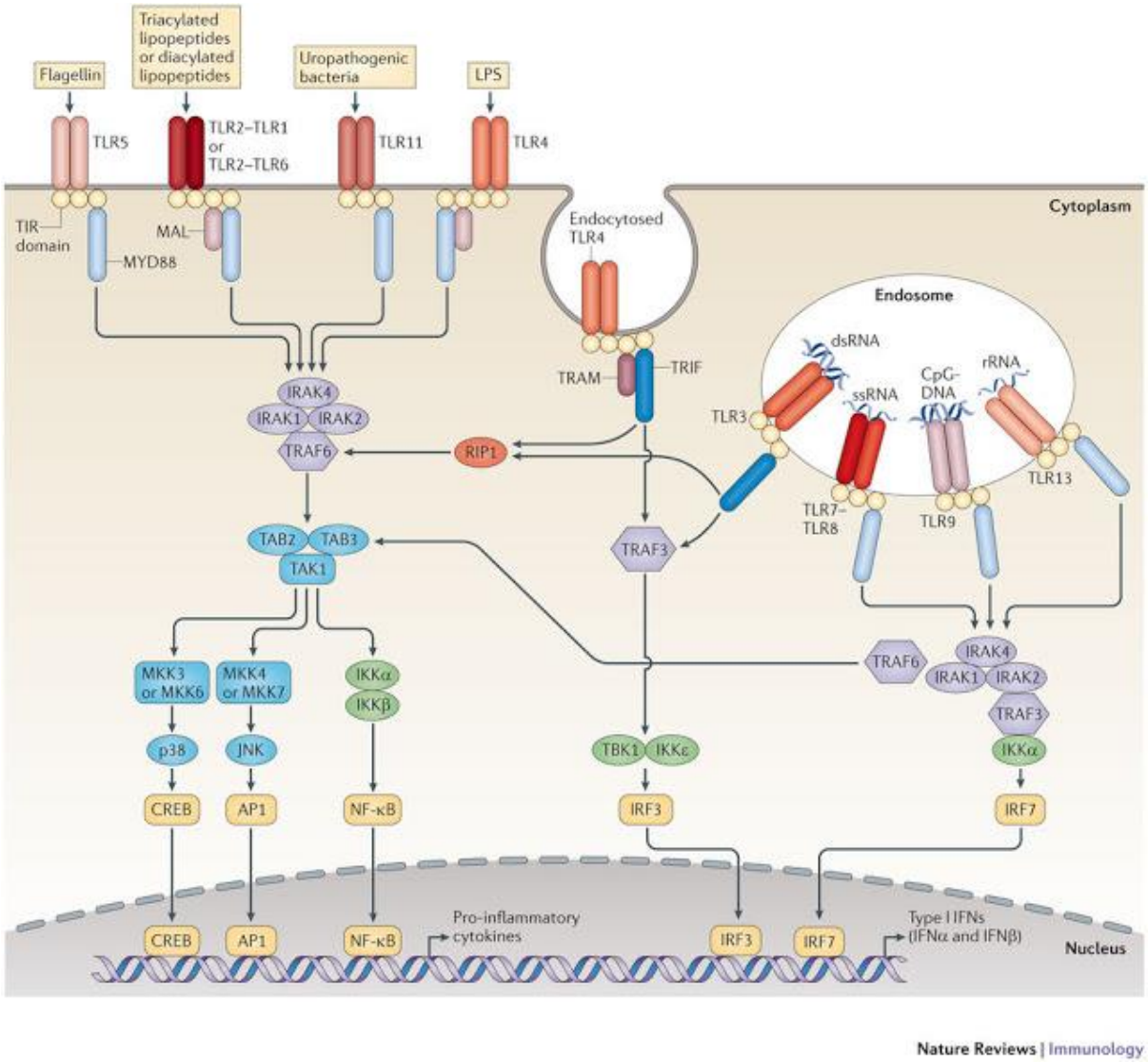
A ativação dos receptores *Toll-like* resulta na produção de citocina, e consequentemente estímulo à resposta inflamatória aguda e ao sistema imune adaptativo (60,61). Evidências mostram que os TRL podem reconhecer proteínas constitutivas do hospedeiro, como as HSPs (62–64).

Atualmente 13 TLR são reconhecidos, porém somente 10 estão identificados em seres humanos. Os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR10 estão localizados na membrana citoplasmática de diversos tipos celulares, especialmente em células apresentadoras de antígenos (APC) como as células dendríticas (DC) e macrófagos. Já os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 estão localizados intracelularmente nos endossomos. Isso confere a cada TLR propriedades e funções distintas no reconhecimento de PAMPs e na resposta imune (65–67) (Figura 2.5).

A sinalização dos receptores Toll-like é dependente da interação receptor-ligante e ativação do domínio TIR (IL-1R), que interage com moléculas adaptadoras, o que desencadeia a ativação de fatores de transcrição que regulam a resposta inflamatória. Cada tipo de receptor Toll-like recruta uma molécula adaptadora distinta, sendo que a maioria dos sinais desencadeados pelos TLRs são dependentes da MyD88. Somente o TLR3 e TLR4 utilizam outra molécula adaptadora, a Trif, sendo que o TLR4 utiliza tanto MyD88 quanto Trif (67).

O conhecimento e compreensão das sinalizações detalhadas dos receptores Toll-like podem elucidar hipóteses para o entendimento da patofisiologia de muitas doenças. Há crescentes evidências de que os receptores Toll-like tem a capacidade de reconhecer proteínas constitutivas do próprio organismo. De fato, a biologia destes receptores parece estar intimamente associada com um número considerável de condições dermatológicas, doenças autoimunes, doenças inflamatórias, inflamações crônicas, e até mesmo o câncer. Logo, seu envolvimento não está limitado apenas àquelas de etiologia infecciosa, como é amplamente conhecida e estudada. Alguns medicamentos dermatológicos bastante utilizados tem mostrado exercerem seus efeitos via sinalização de receptores Toll-like (6,7).

Figura 2.5 – Vias de sinalização dos TLRs em mamíferos.



Fonte: O´Neill et al. 2013, p.456.

Aparentemente os receptores Toll-like contribuem para iniciação e progressão do tumor através da ativação de sinais pro-inflamatórios, pro-apoptóticos, proliferativos e pro-fibrinogênicos, tanto no microambiente, quanto das próprias células tumorais e também parecem atuar na resposta imune anti-tumoral, causando a regressão do câncer. Porém um mesmo receptor pode ter funções opostas dependendo do órgão e células afetadas, mas na maior parte dos tumores estudados, os TLRs que promovem o tumor são o TLR2 e o TLR4 e os que tem função de regredir são TLR3, TLR5, TLR7/8, TLR9 (68).

Em circunstâncias normais TLR2 e 4 são normalmente expressos principalmente na membrana celular e, durante o processo de displasia, essa expressão se torna mais forte e mais citoplasmática (69).

Apesar de o papel do TLR2 na carcinogênese ainda não estar totalmente elucidado, evidências sugerem que os TLR tem papel importante na resposta à radiação UV e existem diversos estudos mostrando a sua expressão nos carcinomas orais (70). O estudo de Lee et al mostrou aumento da expressão do TLR2 em pele de indivíduos que sofreram exposição solar crônica quando comparado a pele que não foi submetida à exposição solar dos mesmos indivíduos (71). Ng et al 2011, mostrou aumento da expressão do TLR2 em queratinócitos de CEC oral e lesões displásicas, porém não encontrou maior expressão nas mesmas células de epitélios expostos a radiação UV (72).

O TLR4 foi primeiramente reconhecido por ser ativado por lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias gram-negativas, porém com o tempo, estudos mostraram que ele também reconhecia agonistas não provenientes de bactérias como taxol, fibronectina e HSP60. Alguns estudos sugerem que o TLR4 é requisitado pela imunossupressão induzida pela radiação UV, e uma vez que os eventos moleculares começam, ele teria o papel de reparar o DNA danificado (73). Kotrashetti et al encontraram forte expressão do TLR4 em lesões de CEC oral e displasias, sugerindo sua participação na progressão dos tumores (74).

2.5 Proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins – HSPs)

As proteínas de choque térmico (HSP) são, de forma geral, responsáveis pela proteção de proteínas contra danos térmicos em resposta à exposição a níveis elevados de estresse, inclusive o calor. Elas tem papel importante na manutenção da homeostase celular tanto em condições normais quanto em situações de estresse. São reconhecidas atualmente seis grandes famílias de acordo com seu peso molecular (HSP menores, 40, 60, 70, 90 e 110). O aumento da expressão das HSPs tem sido relacionada a regulação da apoptose e progressão tumoral, além de ser observado em certos tipos de câncer, como mama, colo do útero, pulmão, pâncreas, ovário, fígado, leucemia e em cavidade oral (75–78).

A atividade fisiopatológica das HSPs no processo de carcinogênese ainda não é conhecida, porém está relacionada com crescimento e diferenciação celular. Essas alterações vem sendo observadas também em lesões potencialmente malignas como líquen plano oral (LPO) e leucoplasias. Esse aumento da expressão também tem sido associado ao consumo de tabaco, radiação UV, graus de displasia epitelial e tempo de transição para malignidade dessas lesões, além de ser mais observado em lesões displásicas e malignas do que em mucosa normal (48,75,79).

A resposta das HSPs é fisiológica e adaptativa e se dá por condições de estresse, inflamações, infecções e estresse oxidativo. A indução dessas reações é utilizada como marcador em injúrias celulares e teciduais. As HSPs primariamente exercem sua proteção em nível mitocondrial inibindo a apoptose programada, porém esse efeito protetor não pode ser aplicado para todos os modelos de apoptose (80).

Em pele, a radiação UVB estimula a expressão de HSPs nos queratinócitos previamente expostos. Assim, as HSPs se ligam aos TLR2 e 4 estimulando a via de sinalização Toll/IL-1 em células dendríticas, o que leva à produção de citocinas imunosupressivas como IL-10 e TNF-α, o que pode ajudar a explicar o papel complementar da radiação UVB ao desenvolvimento do câncer, em conjunto ao seu efeito mutagênico (8).

A HSP60 está implicada principalmente no transporte e manutenção de proteínas mitocondriais e na conjugação adequada de polipeptídeos gerados em condições de estresse, além da transmissão e replicação de DNA mitocondrial. Também há indícios de que desempenha papel em certas respostas imunitárias, incluindo doenças autoimunes (76,81). O aumento de sua expressão vem sendo associado a estágios iniciais da carcinogênese em células de vários tecidos, como por exemplo o estudo de Fan et al 2006, que encontrou maior expressão da HSP60 em leucoplasias e CEC oral do que em mucosa normal (78).

O aumento da expressão da HSP70 é considerado um mecanismo de reparo precoce para prevenir danos celulares irreversíveis, protegendo as células tanto de estresse térmico quanto oxidativo. Ela pode se ligar a peptídeos auxiliando no descarte de proteínas defeituosas, bem como protegendo proteínas parcialmente constituídas para posterior complementação da síntese normal (48). A HSP70 age como um fator protetor na apoptose que pode causar efeitos deletérios promovendo a carcinogênese. Kaur et al 2000, encontraram diferenças significativas na expressão da HSP70 em tecidos normais, com displasia e com carcinoma, bem

como do p53, o que sugerem ser uma resposta imune contra a p53 durante a tumorigênese oral (77). Experimentos com irradiação a laser demonstraram que a HSP70 se expressa tanto na derme quanto na epiderme e pode servir como marcador bioquímico da zona tecidual exposta ao dano térmico (82,83)

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a expressão gênica das proteínas de choque térmico HSP60 e HSP70, e dos receptores *Toll-like* TLR2 e TLR4, por meio de estudo caso-controle, em indivíduos portadores de queilite actínica com diferentes graus de displasia em relação a indivíduos diagnosticados com CEC de lábio, utilizando-se como substrato tecido obtido por biópsia incisional.

4 CASUÍSTICA-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Os participantes deste estudo foram selecionados entre aqueles que procuraram o Centro de Diagnóstico Oral (CDO) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) para consulta com queixa primária de lesão no lábio, bem como casos assintomáticos, que apresentaram sinais clínicos sugestivos de QA ou CEC de lábio. Também fizeram parte desta casuística pacientes que cumpriram o mesmo critério de seleção provenientes da Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Metropolitana de Santos (Unimes), que gentilmente colaborou com este estudo, conforme autorização (ANEXO A). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, sob parecer 1.824.854 (ANEXO B) e CAAE 59004716.4.0000.0075, aprovado em 18/11/2016.

Desta forma, diante da suspeita de QA ou CEC de lábio, os pacientes receberam orientações e esclarecimentos relativos à etiologia e tratamento das lesões e foram convidados a participar do protocolo de pesquisa por meio de anuência ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C), com a coleta de amostra tecidual. Esta coleta era realizada simultaneamente ao procedimento de biopsia incisional, para análise de expressão de genes que podem estar relacionados com a etiopatogenia desta alteração. Desta forma, a metodologia delineada foi de um estudo caso-controle, sendo que os pacientes com diagnóstico de QA compuseram o grupo caso e os pacientes com CEC de lábio, o grupo controle.

Em relação aos casos de QA, os pacientes foram orientados quanto ao potencial de transformação maligna desta condição, a necessidade de biopsia incisional para diagnóstico apropriado, adequada gradação de displasia histológica e o devido acompanhamento. Além de instruções sobre estratégias voltadas à proteção solar de acordo com o perfil individual de exposição ao sol, representadas por barreiras físicas (chapéus, bonés, camisas com mangas compridas e guarda-sóis) e químicas (fotoprotetor labial em bastão com Fator de Proteção Solar (FPS)

mínimo 30. Os pacientes diagnosticados com CEC de lábio foram devidamente encaminhados para tratamento oncológico via Assistência Social da FOUSP.

4.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes que apresentaram sinais clínicos de QA ou CEC de lábio, com histórico de exposição solar crônica, que foram submetidos à biopsia incisional e cujo resultado do exame anatomopatológico foi compatível com uma das duas doenças.

4.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes com doenças autoimunes ou que faziam uso de corticosteroides ou imunossupressores; pacientes que não concordaram com os termos de consentimento livre e esclarecido ou onde o resultado do exame anatomopatológico não foi compatível com CEC ou QA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das amostras

As amostras foram coletadas durante o procedimento cirúrgico de biopsia incisional, sob condições ideais de assepsia e biossegurança, para diagnóstico da lesão.

Nos casos de suspeita de QA, a escolha do sítio da biopsia foi baseada na análise da região com características clínicas mais acentuadas ao longo do lábio afetado, segundo o seguinte critério em ordem decrescente de alterações: presença

de úlceras, erosões, crostas, placas brancas, manchas eritematosas, descamação, atrofia.

Nos casos em que a suspeita era CEC de lábio, o critério utilizado para eleição do sítio da biopsia foi localizar a área com a borda mais endurecida e infiltrativa da úlcera.

Após a eleição do local da biopsia, foi aplicada anestesia local infiltrativa com Mepivacaína 2% com epinefrina (Mepiadre 100 – Nova DFL, Rio de Janeiro, Brasil) próximo à região a ser incisada (aproximadamente 5 mm). Os pacientes foram submetidos à biopsia utilizando-se *punch* (Koplast CI LTDA – São Paulo, Brasil) de 5 mm de diâmetro. Uma amostra de tecido foi acondicionada em microtubos de 1.5ml (Axygen Scientific – Califórnia, EUA), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80ºC até a execução dos experimentos. Outra amostra foi removida, fixada em formol (10%) e encaminhada ao Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP para análise histopatológica. As suturas foram realizadas com fio de seda 4.0 (Ethicon® - Johnson & Johnson – Nova Jersey, EUA) e foi prescrito analgésico para o caso de dor pós-operatória. As suturas foram removidas 7 dias após o procedimento cirúrgico.

4.2.2 Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular (LPM) da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes.

4.2.2.1 *Extração do RNA total*

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento do RNA de células e tecidos.

Cada amostra congelada foi completamente macerada em nitrogênio líquido, até a visualização de um pó branco, sem permitir o descongelamento e a consequente degradação do RNA.

Em seguida, para cada 5mm de tecido biopsiado macerado, acrescentou-se 500μL de Trizol ao material que foi novamente macerado até a visualização de um pó rosa e então transferido para um microtubo 1.5mL contendo mais 500μL de Trizol. As amostras foram homogeneizadas em temperatura ambiente até seu descongelamento completo, por aproximadamente 5 min, e então transferidas para um isopor com gelo picado. Foi adicionado 200μL de clorofórmio (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil), e o microtubo devidamente selado foi vigorosamente agitado durante 30 s para a mistura das soluções e incubado a -20ºC durante 5 min. Os microtubos foram centrifugados (centrífuga Eppendorf modelo 5810R – Hamburg, Alemanha) a 10.000 rpm durante 15 min a 4ºC. Após a centrifugação, observou-se a formação de 3 fases: sendo a fase superior, transparente e aquosa, aquela que contém o RNA. Esta fase foi transferida para novos microtubos e 500μL de álcool isopropílico (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) foi adicionado em cada microtubo, homogeneizados por inversão e incubados a -20ºC durante 1h.

Em seguida os microtubos foram centrifugados a 10.000 rpm durante 10 min a 4ºC, verificando-se então a presença do precipitado de RNA no fundo do microtubo. O sobrenadante foi descartado e este precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) por inversão e novamente centrifugado a 10.000 rpm durante 5 min a 4ºC. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado submetido a secagem, deixando-se os microtubos abertos por no máximo 10 min. Em seguida o RNA foi ressuspendido acrescentando-se 30μL de água Milli-Q (Millipore Corporation – Massachusetts, EUA) para a dissolução do precipitado de RNA total.

4.2.2.2 *Quantificação do RNA e verificação de sua qualidade*

Para a validação do grau de pureza da amostra de RNA extraídas, foi utilizada a relação entre as leituras das absorbâncias de RNA e proteína medidas a 260 e 280 nm, respectivamente, determinada por espectrofotômetro (NanoDrop® 1000, Thermo Fisher Scientific – Massachusetts, EUA). A pureza da amostra foi considerada adequada quando o resultado desta relação era superior a 1.8. A quantificação das amostras para as etapas subsequentes foi realizada pelo mesmo espectrofotômetro.

4.2.3 RT-PCR em tempo real

4.2.3.1 *Iniciadores*

As sequências dos iniciadores para a reação de PCR em tempo real foram desenhadas na base de dados Primer-Blast[1], disponível da base de dados National Center for Biotechnology Information (NCBI), para os genes dos receptores TLR2, TRL4, HSP60, HSP70 e o gene constitutivo GAPDH (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Caracterização e sequência dos iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real

Gene	**GeneBank**	**Iniciadores 5´→ 3´**	**Tamanho do produto de PCR**	**TM (ºC)**
TLR2	NM_003264	Senso: GGAGTTCTCCCAGTGTTTGGT Anti-senso: CCAGTGCTTCAACCCACAAC	157pb	59
TLR4	NM_138554	Senso: CCCTGAGGCATTTAGGCAGCTA Anti-senso: AGGTAGAGAGGTGGCTTAGGCT	126pb	62
HSP60	NM_002156.5 NM_199440.1	Senso: TGCCAATGCTCACCGTAAGCCT Anti-senso: ACGCTTGACTGCCACAACCTGA	118pb	64
HSP70	NM_002154.4	Senso: GACCTGCCAATCGAGAATCAGC Anti-senso: CTGCGTTCTTAGCATCATTCCGC	130pb	62
GAPDH	NM_002046	Senso: GCATCCTGGGCTACACTGA Anti-senso: CCACCACCCTGTTGCTGTA	162pb	59

*pb: pares de base

1 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/

Os iniciadores TLR2, TLR4 e GAPDH já estavam previamente padronizados para a concentração de 400nM. Para os iniciadores HSP60 e HSP70 foi realizada uma curva padrão com três diluições-teste (200nM, 400nM e 600nM) para selecionar a concentração que obtivesse o melhor rendimento da reação de PCR. Para os iniciadores do gene da HSP60 foi padronizada a concentração foi de 200nM e para o gene da HSP70, 600nM.

4.2.3.2 *Tratamento das amostras de RNA com DNase*

As amostras foram previamente tratadas com DNase (DNase I Amp Grade Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) para a eliminação do DNA genômico que possivelmente estivesse presente na amostra. Esta etapa confere resultados mais confiáveis, visto que a amplificação pelo RT-PCR será apenas do cDNA, refletindo a expressão do gene (RNA mensageiro).

Assim, acrescentou-se a 1μg de RNA de cada amostra, 1μL do tampão da reação (10x DNase I reaction buffer, Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA), 1 μL da enzima DNase e completou-se o volume para 10μL com água Milli-Q num microtubo de 0.5 mL. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 15 min para permitir a ação da enzima de degradação do DNA.

A enzima foi inativada acrescentando-se à mistura 1μL de EDTA 25mM e pH 8.0 (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) e aquecimento a 65ºC durante 10 min na termocicladora (Eppendorf Mastercycler Personal, Eppendorf Corporation – Hamburgo, Alemanha) a 65ºC durante 10 min, resultando em uma amostra de RNA pronta para a reação de transcrição reversa.

4.2.3.3 *Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA*

A reação de transcrição reversa (RT) foi executada utilizando-se o conjunto de reagentes High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Life

Technologies – Califórnia, EUA), associando-se 1μg do RNA total, obtido posteriormente ao tratamento com a DNase.

O RNA foi associado a 1μL de RNase OUT (Invitrogen Life Tchnologies – Califórnia, EUA), 2μL de 10x RT Buffer, 0.8μL de 25x dNTP Mix (100mM), 2μL de 10x RT Random Primers, 1μL de Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/μL) e acrescentada água Milli-Q até completar o volume final de 10μL por amostra. Em seguida, as amostras foram levadas novamente à termocicladora e submetidas aos seguintes ciclos de temperaturas: 25ºC durante 10 min (incubação), 37ºC durante 120 min (reação de RT) e 85ºC durante 5 min (inativação da enzima de RT) para a síntese do cDNA.

4.2.3.4 *Reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real*

As reações foram realizadas em duplicatas visando a minimização dos erros de pipetagem, críticos neste tipo de experimento. Sendo assim, para cada tubo óptico de 0.2 mL, específico para PCR em tempo real, acrescentou-se a cada 1μL de cDNA, 5μL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems – Califórnia, EUA), somando-se as quantidades de cada iniciador e água Milli-Q descritas na Tabela 4.2, totalizando um volume final de reação de 10μL em cada tubo.

Tabela 4.2 – Distribuição das quantidades utilizadas de cada iniciador, e demais reagentes para PCR, definida a partir da análise da curva padrão

	HSP60	**HSP70**	**TLR2**	**TLR4**	**GAPDH**
Concentração	200nM	600nM	400nM	400nM	400nM
cDNA	1μL	1μL	1μL	1μL	1μL
SYBR	5μL	5μL	5μL	5μL	5μL
Primer F	0,2μL	0,6μL	0,4μL	0,4μL	0,4μL
Primer R	0,2μL	0,6μL	0,4μL	0,4μL	0,4μL
H_2O Milli-Q	3,6μL	2,8μL	3,2μL	3,2μL	3,2μL

A montagem das placas foi realizada de forma que, para cada amostra, todos os genes estudados fossem submetidos à amplificação na mesma reação. Além

disso buscou-se parear, por sexo e idade, as amostras dos grupos caso e controle. Estas considerações foram feitas tendo em vista a metodologia de análise de dados utilizada.

A amplificação em tempo real foi realizada no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies – Califórnia, EUA). As condições de ciclagem consistiram em ciclos de: 2 min a 50ºC (incubação), 10 min a 95ºC (ativação da enzima *Taq* polimerase), seguidos de 40 ciclos, cada um com duas fases: 15 s a 95ºC (desnaturação) e 60 s a 60ºC (hibridização/extensão-detecção).

Além das curvas de amplificação, foram realizadas as curvas de dissociação para verificar a especificidade da amplificação, confirmando a ausência da formação de dímeros de primer ou qualquer outro produto inespecífico, garantindo a confiabilidade dos resultados. Os dados foram normalizados com base na expressão do gene constitutivo (GAPDH) e analisados pelo método do CT comparativo.

4.2.4 Avaliação dos resultados e análises estatísticas

A expressividade dos genes analisados foi avaliada nos indivíduos portadores de QA em relação aos controles (CEC de lábio), a partir da normalização dos dados da quantificação, com base na expressão do gene constitutivo, pelo método CT comparativo conforme a quantificação relativa ou $2^{-\Delta\Delta CT}$. Neste método são comparados os valores de CT (*Threshold cycle*), ou seja, o número do ciclo em que a fluorescência gerada na reação atinge o limiar de amplificação exponencial (*threshold*).

Os dados também foram avaliados quanto à normalidade, pelo teste de Shappiro-Wilk (programa Bioestat 5.0, Manuel Ayres, 2007 – Pará, Brasil), e comparados estatisticamente pelo teste T de Student e teste Exato de Fisher. Quando possível, os dados clínicos foram correlacionados aos dados de expressividade por meio do teste de correlação de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

Foram coletadas um total de 42 amostras com hipótese diagnóstica de QA e 4 amostras com hipótese de CEC de lábio. Das 42 amostras com hipótese clínica de QA, 40 tiveram a confirmação do diagnóstico com presença ou não de variados graus de displasia epitelial e 2 tiveram diagnóstico de CEC de lábio, totalizando 6 amostras do grupo controle.

Todos os pacientes relataram histórico positivo de exposição solar crônica, por motivo laboral ou recreativo. As características gerais desses pacientes estão sumarizadas na Tabela 5.1. A relação entre os sinais clínicos e os graus de displasia epitelial após análise histopatológica das amostras utilizadas no estudo estão resumidas na Tabela 5.2.

Tabela 5.1 - Características demográficas dos pacientes com QA e CEC de lábio

Características demográficas		**QA (n= 40)**	**CEC (n= 6)**	***p****
Média de idade		62,7	74,16	**0,0310**
Sexo	Masculino	28 (70%)	5 (83,33)	0,8491
	Feminino	12 (30%)	1 (16,66%)	
Etnia	Leucoderma	37 (92,5%)	6 (100%)	
	Melanoderma	1 (2,5%)	0 (0%)	0.6509
	Outros	2 (5%)	0 (0%)	
Exposição solar	Sim	40 (100%)	6 (100%)	1
	Não	0 (0%)	0 (0%)	
Tabagismo	Sim	15 (37,5%)	5 (83,33%)	0,0718
	Não	25 (62,5%)	1 (16,66%)	
Sintomatologia	Sim	10 (25%)	3 (50%)	0.3299
	Não	30 (75%)	3 (50%)	

P*: teste T-Student (idade) e teste Exato de Fisher (demais variáveis)

Tabela 5.2 – Correlação entre parâmetros clínicos e grau de displasia da amostra de QA

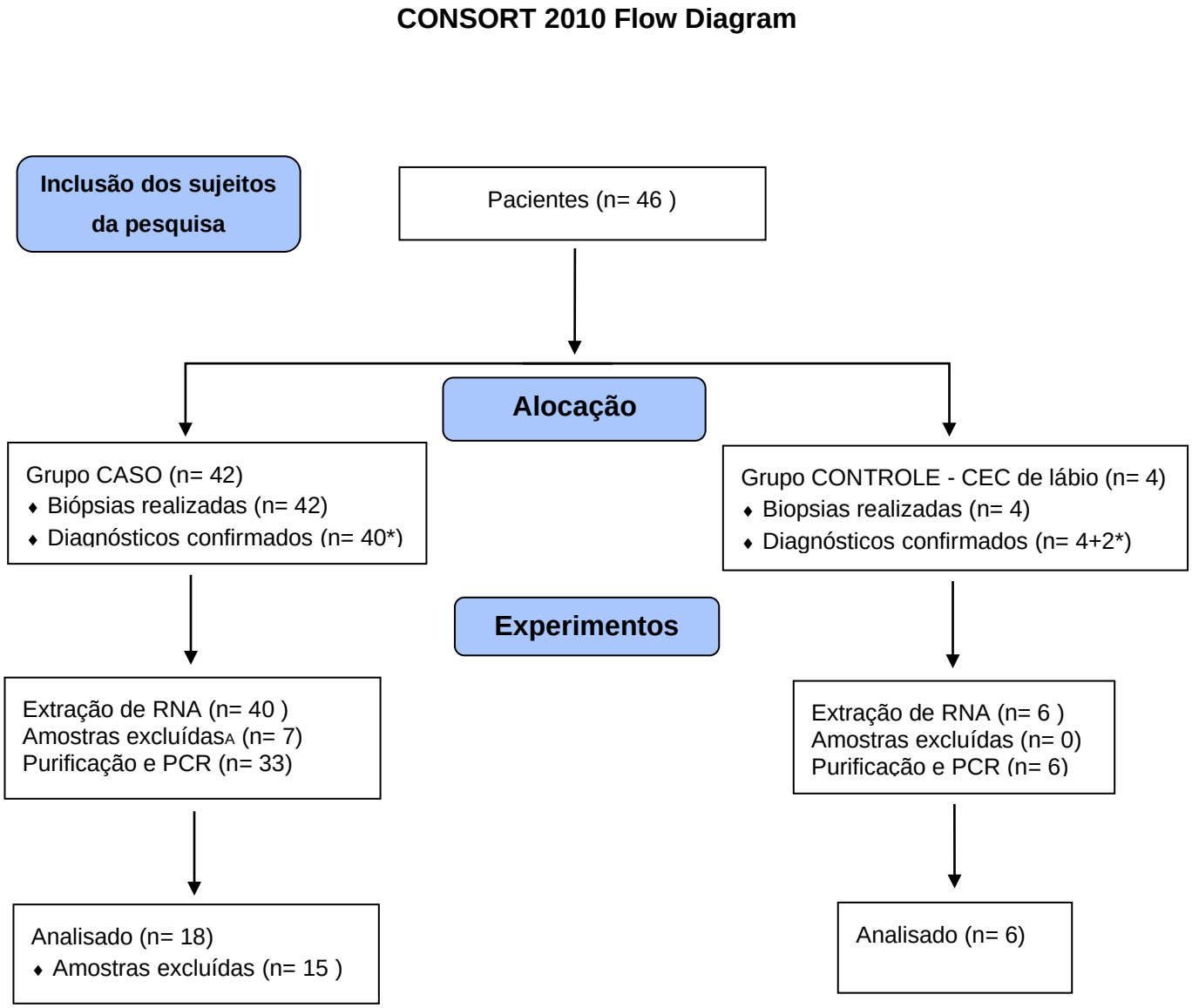
Sinais Clínicos	**Graus de Displasia Epitelial**			
	Sem displasia	**Displasia discreta**	**Displasia moderada**	**Displasia intensa**
Atrofia	2 (11,11%)	1 (5,55%)		
Mancha	1 (5,55%)	2 (11,11%)	2 (11,11%)	1 (5,55%)
Fissura				
Placa		1 (5,55%)	4 (22,22%)	
Erosão		1 (5,55%)		
Crosta	1 (5,55%)			
Úlcera	1 (5,55%)			1 (5,55%)

*Dentre os parâmetros clínicos, foi considerado o de maior relevância em cada paciente.

Todas as amostras coletadas foram submetidas aos procedimentos laboratoriais de extração e quantificação do RNA, e descartadas quando não possuíam pureza adequada, de acordo com a avaliação espectrofotométrica (Apêndice A), para dar continuidade ao experimento. As amostras de RNA consideradas aptas foram purificadas, convertidas a cDNA e submetidas a reação de PCR em tempo real.

Analisando os resultados obtidos pela amplificação em tempo real, foram consideradas para análise da expressão dos genes Toll-like 2 e 4 e das HSP60 e 70, 18 amostras do grupo QA e as 6 amostras do grupo CEC de lábio (controle). O diagrama (Figura 5.1) ilustra o fluxo dos pacientes admitidos e excluídos neste estudo.

Figura 5.1 – Diagrama ilustrando o fluxo dos pacientes admitidos e excluídos neste estudo de acordo com as etapas clínicas e laboratoriais

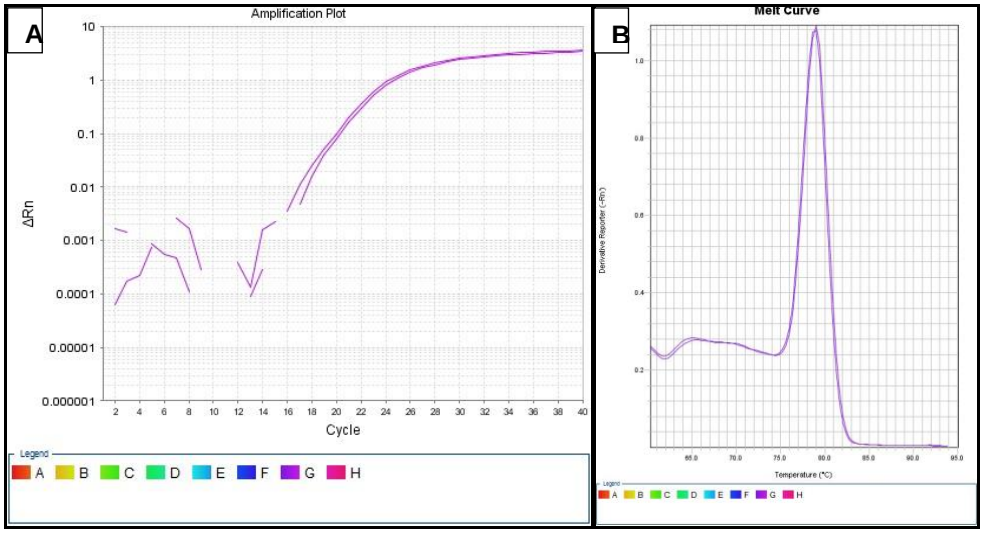


5.2 Avaliação da expressão gênica das HSP e dos TLR

Analisando os resultados obtidos pela amplificação em tempo real, foram consideradas para análise de expressão gênica dos receptores Toll-like 2 e 4 e das HSP60 e 70, 18 amostras do grupo caso e 6 do grupo controle, em que as curvas de

amplificação (Figura 5.2A) e de dissociação de iniciadores (Figura 5.2B) foram consideradas representativas. Os demais resultados foram descartados desta análise.

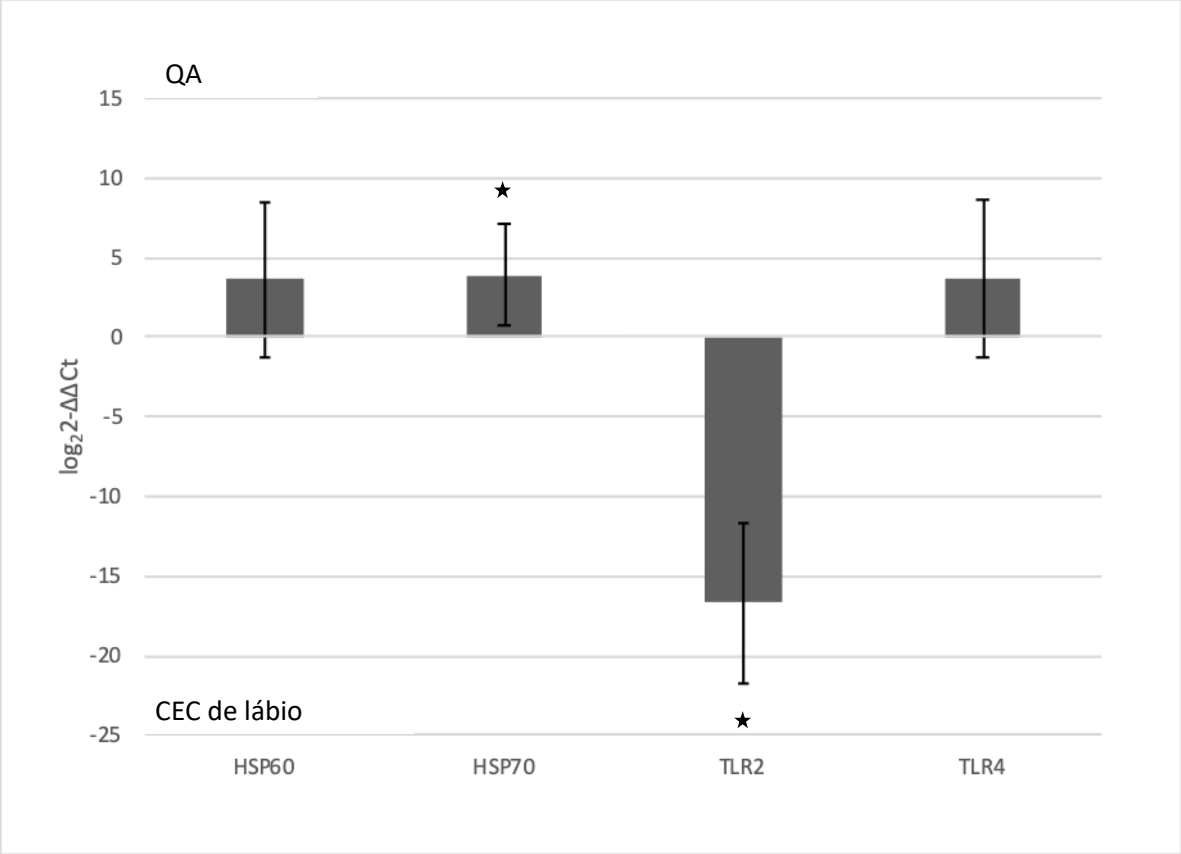
Figura 5.2 – A: Curva de amplificação considerada adequada, evidenciando amplificação exponencial do produto de PCR e a delimitação automática do limiar de amplificação exponencial pelo equipamento de PCR em tempo real (Threshold). B: Curva de dissociação dos iniciadores conferindo especificidade da reação de PCR



Os resultados obtidos pela quantificação relativa por meio da PCR em tempo real foram analisados pelo método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) e estatisticamente seguiam distribuição normal (teste Shappiro-Wilk, $p > 0.05$), sendo analisados pelo teste T-Student. Foi observado (Figura 5.3) que a expressão gênica relativa (*fold change*) da HSP60 é 3.6 vezes maior na QA em relação ao CEC de lábio, porém este resultado não apresentou significância estatística ($p > 0.05$). Já a HSP70 está 3.9 vezes mais expressa na QA do que no CEC de lábio e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0.034$).

O TLR2 mostrou-se 16.7 vezes mais expresso no CEC de lábio do que na QA e a diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0.003$). Já o TLR4 está 3.7 vezes mais expresso na QA do que no CEC de lábio, porém a diferença não foi estatisticamente significativa ($p>0,05$).

Figura 5.3 – Gráfico representando a diferença na expressão dos genes estudados, por meio da análise do CT comparativo a partir da amplificação em tempo real, entre o grupo caso (QA) e controle (CEC de lábio) evidenciando aumento na expressão da HSP60, HSP70 e TLR4 na QA em relação ao CEC de lábio. Redução da expressão do TLR2 na QA em relação ao CEC de lábio. Os resultados foram estatisticamente significativos para as análises da expressão gênica da HSP70 e do TLR2 ($p < 0.05$)



Tendo em vista o resultado de alta expressividade do gene da HSP70 na QA em relação ao CEC de lábio, foram realizadas análises de correlação entre a expressão deste gene e as características clínicas, como gênero, idade, tabagismo, tempo de exposição solar e gravidade de sinais clínicos; e histológicas, como o grau de displasia, dos pacientes com QA por meio do teste de Spearman (Tabela 5.2).

Tabela 5.3: Correlação entre a expressividade do gene da HSP70 em amostras de QA e as características clínicas e histológica destes pacientes

	HSP70	
	Coeficiente (r)	P
Gênero	-0,159	0,5285
Idade	0,0176	0,9448
Tabagismo	-0,4723	0,0477
Tempo de exposição solar	-0,6158	0,0065
Sinais clínicos	0,2547	0,3078
Displasia epitelial	-0,1118	0,6587

Apenas duas características clínicas, hábito ou história de tabagismo e tempo de exposição solar, apresentaram correlação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao aumento da expressividade do gene da HSP70. Isto porque o resultado, além de estatisticamente significativo, apresentou coeficiente negativo em ambas correlações, indicando que quanto menor o valor do ΔCT, maior era a associação com o hábito ou história de tabagismo, assim como, o tempo de exposição solar ao longo da vida do indivíduo. E a expressividade é inversamente proporcional ao valor do ΔCT. Entretanto, pelo valor deste coeficiente, observa-se que a correlação foi fraca quanto ao tabagismo e moderada em relação ao tempo de exposição solar.

O tempo de exposição solar teve média de 19,7 anos, variando entre 4 a 70 anos de exposição. As displasias mais graves foram encontradas em indivíduos com histórico a partir de 10 anos de exposição, revelando na amostra o efeito acumulativo da exposição crônica à radiação UV.

6 DISCUSSÃO

Descobrir o verdadeiro risco de malignidade das lesões potencialmente malignas é o objetivo de muitos pesquisadores e um assunto que vem sendo estudado há vários anos. Ainda não foi possível chegar em uma resposta, porém a cada estudo realizado, novas perspectivas são analisadas e vias de sinalização são mais detalhadas proporcionando avanço no conhecimento de como as células, organelas e moléculas intermediam, iniciam, sinalizam novas reações em diversos órgãos e situações.

A QA, uma desordem oral potencialmente maligna que antecede a maioria dos carcinomas de lábio, vem sendo estudada em vários aspectos: epidemiologia, prevenção, tratamentos, características clínicas, histopatológica, imunohistoquímica e biologia molecular. Neste estudo buscou-se analisar a expressão gênica de dois receptores *Toll-like* e duas proteínas de choque térmico em QA e CEC de lábio na tentativa de correlacionar as duas lesões e descobrir mais aspectos em comum, e contribuir um pouco mais para a literatura a respeito.

Apesar de a etiologia da QA ser conhecida, os estudos moleculares a respeito são relativamente recentes e não há até o momento algum estudo de expressão desses genes nesta lesão.

Os indivíduos mais afetados da amostra foram em sua maioria homens (5:1 no CEC de lábio e 3:1 na QA), leucoderma, acima dos 40 anos de idade, com histórico de exposição solar crônica, principalmente por motivo laboral. Porém, o número de mulheres afetadas por essa condição vem aumentando. Acreditava-se anteriormente que o hábito das mulheres de utilizarem batons exercia um papel de proteção contra a radiação UV, já que muitos deles tem FPS; porém atualmente sabe-se que existe o fator hormonal (estrógeno), que também desempenha a função de proteção contra a imunossupressão causada pela radiação UV (16). E ao contrário do que é encontrado na literatura, a amostra deste estudo teve um caso de paciente melanoderma e do gênero feminino, com histórico de exposição solar crônica e sintomática, diagnosticada com QA. A melanina age como uma proteção natural da pele, por isso a baixa incidência desta condição nestes pacientes (13,84).

Há um entendimento de que doenças e lesões que tem como fator etiológico a exposição solar crônica, são mais comuns em indivíduos que residem em zonas

rurais ou litorâneas, com baixa incidência em centros urbanos (56,85,86). O presente estudo incluiu, em sua maior parte, pacientes de centros urbanos que relataram exposição solar crônica indiscriminada e sem proteção quando crianças e adolescentes, e na vida adulta por conta de suas profissões, que fugiram do perfil das funções mais relatadas como agricultor e pescador. Por ter sido um estudo feito em um grande centro urbano, os pacientes da amostra relataram profissões como motorista, pedreiro, topógrafo, engenheiro, comerciante, jardineiro, porteiro, segurança, vigia, policial, guarda civil, carteiro, caminhoneiro.

Os pacientes atendidos nunca haviam usado algum tipo de proteção solar nos lábios, com exceção de poucas mulheres que relataram ter o hábito esporádico de usar batons. Dos 46 pacientes examinados, apenas 5 relataram estar cientes da necessidade de fazer uso diário de protetor solar no rosto e nas áreas expostas do corpo, porém todos desconheciam a necessidade de proteger os lábios da mesma maneira. Após orientação do uso do protetor solar labial e algumas consultas de acompanhamento, os 11 pacientes que eram sintomáticos relataram o cessar da sintomatologia. Todos os pacientes permanecem em acompanhamento a cada 6 meses.

Dois dos casos da amostra foram diagnosticados clinicamente como QA, um apresentou uma placa branca e outro uma crosta, porém após a análise histopatológica o diagnóstico final foi de CEC de lábio, o que ressalta a importância da biópsia incisional para confirmação da hipótese de QA, ou se for o caso, o diagnóstico precoce em estágio bastante inicial da doença, possibilitando consequências mais amenas do tratamento para o paciente e maiores taxas de sobrevivência (12). Um dos pacientes já fazia acompanhamentos devido ao diagnóstico de QA há 4 anos, e era assintomático, o que provavelmente significa que, caso ele não estivesse sendo acompanhado, possivelmente procuraria um ambulatório apenas quando a lesão já estivesse mais avançada.

É de extrema importância a capacitação dos profissionais de saúde, especialmente cirurgiões-dentistas, pois a QA é a lesão mais negligenciada. As alterações causadas pelo sol aqui descritas, são muitas vezes interpretadas como naturais do envelhecimento, quando não são. Também fundamental que se faça campanhas de prevenção relevantes para que o maior número de indivíduos seja atingido, seja em áreas onde a principal atividade econômica seja a agricultura, pecuária ou pesca; ou nos centros urbanos em que os indivíduos exercem diversas

atividades expostos ao sol. A população precisa estar consciente de que a proteção é necessária, utilizando chapéus de abas largas, mangas compridas e protetor solar labial em bastão durante as atividades laborais, principalmente em países tropicais como o Brasil, em que a incidência dos raios solares é maior (12).

Indivíduos leucodermas foram os mais afetados para as duas lesões, equivalente ao encontrado na literatura, já que essa população está mais suscetível aos efeitos relacionados à exposição aos raios UV (10,11,19). Este fato associado à intensa incidência de radiação solar em países tropicais como o Brasil, leva a um aumento da incidência de câncer de lábio (54). Os profissionais de saúde dessas regiões devem estar extremamente atentos aos pacientes para dar as devidas orientações e também para fazer diagnósticos mais precoces possíveis para que eles tenham melhor prognóstico e menores consequências relacionadas aos tratamentos (12).

Levando em consideração as análises histopatológicas, foram observados diferentes graus de displasia nos 42 pacientes diagnosticados com QA que fizeram parte do estudo. As análises foram feitas por diversos patologistas, de acordo com a rotina do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, porém por ser a gradação de displasias um critério ligeiramente subjetivo, talvez uma limitação do estudo tenha sido o fato de não ter apenas um mesmo avaliador calibrado para fazer esta análise.

Considerando que as HSPs são responsáveis pela manutenção da homeostase proteica, com funções de correção, manutenção do enovelamento das proteínas e eventualmente eliminação (apoptose) daquelas não passíveis de correção, seria esperada uma maior expressão dessas proteínas no tecido labial, que é naturalmente mais exposto a injúrias físicas, mecânicas e químicas. Adicionalmente, as neoplasias malignas requisitam maior participação das HSPs, desde que produzem com maior probabilidade e quantidade, proteínas defeituosas com necessidade de reparo e preservação. Talvez estudos imunohistoquímicos adicionais que comprovem relação direta, especialmente da HSP70 com maiores probabilidades de degeneração maligna, permitiriam a utilização desse parâmetro objetivo como preditor prognóstico juntamente com os atuais critérios histomorfológicos de classificação da displasia epitelial, que sabidamente carregam grau importante de subjetividade.

Os genes selecionados para a análise neste estudo nunca foram avaliados em amostras de QA, embora tenham sido avaliados em outras desordens orais

potencialmente malignas (78,87) e em CEC de boca (68,72,88). E tendo em vista o potencial de transformação maligna da QA, o controle selecionado por necessidade pelo método comparativo e questões éticas foi o CEC de lábio; sendo considerado um controle positivo, uma vez que a lesão maligna apresenta desregulação na função de múltiplos genes.

A expressão gênica da HSP60 neste estudo foi semelhante entre as amostras de QA e CEC de lábio. Dentre os genes estudados, é o que menos apresenta estudos publicados na literatura mundial incluindo outras desordens orais potencialmente malignas e carcinomas orais. Wu et al. 2014, observaram presença de auto-anticorpos da HSP60 na saliva de pacientes portadores de câncer oral e desordens potencialmente malignas quando comparados a indivíduos saudáveis (89). No estudo de Fan et al. 2006, com leucoplasias e carcinoma epidermoide oral, houve maior expressão proteica da HSP60 na leucoplasia quando comparada a tecido de mucosa normal, porém não houve diferença estatisticamente significante quando comparado ao carcinoma (78). A análise da expressão gênica da HSP60 entre pacientes com QA e controles saudáveis talvez possa encontrar diferenças em sua expressão.

O aumento da expressão da HSP60 está frequentemente relacionado com a progressão do câncer, sendo um indicador de prognóstico ruim para tumores de cabeça e pescoço, pulmões, próstata, neuroblastoma, entre outros (90). Os casos de CEC de lábio tem, de maneira geral, bom prognóstico e são menos agressivos, o que poderia explicar a semelhança na expressão gênica das duas lesões.

A HSP70 apresentou expressão gênica significativamente aumentada, em cerca de 4 vezes, na QA em relação ao CEC de lábio. As HSP desempenham papel de proteção celular aos danos causados por agentes estressores tais como mudanças de temperatura, alguns medicamentos, infecções virais, radiação, metais pesados, álcool, agentes oxidantes, deficiências nutricionais, hipóxia e transformação maligna. Evitando o desencadeamento da morte celular programada (apoptose), de forma a manter o equilíbrio homeostático no organismo (91).

O aumento da expressão proteica da HSP70 em desordens orais potencialmente malignas, especialmente nas leucoplasias, também foi observado em outros estudos (79,87,91,92). Além disso, dois destes estudos (91,92) também observaram a correlação positiva entre a expressão proteica da HSP70 com o grau

de displasia, ou seja, quanto maior o grau de displasia da amostra, maior era a imunomarcação para a HSP70. No presente estudo a correlação entre a expressão gênica e os diferentes graus de displasia não foi estatisticamente significativa, assim como também não se observou correlação com os aspectos clínicos da lesão. A diferença de observadores na avaliação histopatológica destes casos ou a estratificação utilizada podem estar relacionadas a não confirmação deste achado. Além do reduzido tamanho da amostra que foi possível reunir neste trabalho.

Por outro lado, observou-se que o aumento da expressão gênica da HSP70 foi correlacionado positivamente ao hábito de tabagismo. Já foi observado na literatura (80), o uso do tabaco aumenta o estresse celular, e consequentemente, a taxa de apoptose por meio da ativação de espécies ativas de oxigênio (EAO). Vayssier et al. (93) observaram que células de mamíferos sofrem apoptose após exposição a baixas concentrações de tabaco e sofrem necrose após altas concentrações. Em ambos os processos, há aumento da expressão proteica de HSP70. Este aumento parece ser uma tentativa de controle do estresse gerado pela ação do tabaco e seus efeitos sobre o processo de apoptose. O aumento da expressão da HSP70 caracteriza uma resposta ao estresse físico que acaba por potencializar a toxicidade química causada pelo uso do tabaco (87,94).

No presente estudo o aumento da expressão da HSP70 em amostras com QA também foi correlacionada positivamente com um maior tempo de exposição à radiação UV. E existe evidência na literatura que a exposição à radiação UV aumenta a expressão proteica da HSP70 em culturas celulares de dermofibroblastos humanos normais (48).

Culturas celulares de carcinomas orais mostram que a HSP70 não representa apenas um marcador do sofrimento celular, mas sim uma proteína relacionada a sinalização que é essencial para a proliferação e sobrevivência destas células tumorais; uma vez que o bloqueio destas proteínas foi relacionado ao aumento das taxas de apoptose destas células (95). Porém, a avaliação imunohistoquímica de amostras de carcinomas orais apresentou redução na expressão proteica da HSP70 conforme diminui o grau de diferenciação celular e piora o prognóstico da lesão maligna oral. E relacionou a participação da HSP70 aos eventos iniciais do carcinoma oral(96).

Os resultados deste estudo corroboram os resultados observados na literatura, uma vez que o aumento da expressão da HSP70 é observado em lesões com potencial de transformação maligna, e no caso da QA, correlacionado ao tabagismo e tempo de exposição solar, fatores estes conhecidamente relacionados às lesões malignas. O aumento da expressão da HSP70 na QA pode representar um marcador de interesse e de pior prognóstico em pacientes tabagistas e expostos ao sol por longos períodos, indicando possível chance de transformação maligna. Porém seriam necessários estudos adicionais para confirmação do aumento da expressão proteica em QA e estudos prospectivos para confirmação da relação da expressão da HSP70 com um risco aumentado de transformação maligna.

Este estudo encontrou maior expressão de TLR4 em QA, apesar de a diferença não ter sido estatisticamente significante em relação ao CEC de lábio. O TLR4 media o DNA danificado e inflamação induzidos pela radiação UVB, porém a relação entre os TLRs e a carcinogênese ainda é obscura. A forma com que a radiação UV ativa o TLR4 não está elucidada e necessita de maior investigação, porém alguns estudos mostram que ela ativa alguns ligantes do TLR4, como as HSPs, proteínas da família S100 e ácido hialurônico, que participam da iniciação dessa ativação (49,73). Song et al. mostrou que um tecido irradiado repetidas vezes com radiação UVA e UVB aumenta a expressão de TLR4, sugerindo que essa interação tem impacto importante na resposta imune da pele, sendo ele um importante mediador na imunossupressão crônica causada pela exposição à radiação solar prolongada (13).

O TLR2 foi mais expresso nas amostras de CEC de lábio do que na de QA. Apesar de este resultado ser compatível com a literatura, seu papel na progressão de carcinomas ainda não está clara (88,97). Alguns estudos relacionam a expressão do TLR2 com a progressão do tumor em câncer de cabeça e pescoço através do reconhecimento das HSPs (72,98). Este aumento da expressão também pode estar relacionado com a resistência a apoptose nos carcinomas orais (72). O estudo de Gallo et al. sugere existir uma possível relação entre o polimorfismo do TLR2 e o desenvolvimento de lesões orais malignas, o que poderia justificar a maior expressão deste gene no CEC de lábio do que na QA (63).

7 CONCLUSÕES

- A maioria das QAs mostrou algum grau de displasia epitelial, e em 2 casos já eram de fato CEC de lábio, o que ressalta a importância da biópsia para confirmar o diagnóstico e definir o regime de tratamento e acompanhamento. Neste trabalho não houve correlação entre grau de displasia e a expressão dos genes estudados.
- A HSP70 exibiu expressão aumentada em pacientes com QA em relação ao CEC de lábio. Além disso, houve correlação positiva significativa entre o aumento da expressão gênica da HSP70 e o hábito de tabagismo e o maior tempo de exposição solar em pacientes com QA. Desta forma, a HSP70 parece estar relacionada com lesões de QA com maior fator de risco, no que diz respeito à transformação maligna e deve ser investigada em estudos futuros.
- O TLR2 teve sua expressão aumentada nos pacientes com CEC de lábio, o que pode indicar um fator de prognóstico para lesões de QA com maior potencial de transformação maligna.
- TLR4 e HSP60 foram mais expressos na QA, porém sem diferença estatisticamente significantiva, o que pode sugerir que os mecanismos de ambos os genes podem sofrer alterações desde o início da exposição à radiação UV.

REFERÊNCIAS

1. Nadeau C, Kerr AR. Evaluation and Management of Oral Potentially Malignant Disorders. Vol. 62, Dental Clinics of North America. 2018. p. 1–27.

2. Gallagher RP, Lee TK. Adverse effects of ultraviolet radiation: A brief review. Vol. 92, Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2006. p. 119–31.

3. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. Vol. 125, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology. 2018. p. 582–90.

4. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis a review of 152 cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999;88(2):181–6.

5. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Imunologia Celular e Molecular. Imunologia Celular e Molecular. 2012. 560 p.

6. Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+CD25+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(18):7048–53.

7. Kim S, Karin M. Role of TLR2-dependent inflammation in metastatic progression. Ann N Y Acad Sci. 2011;1217(1):191–206.

8. Ermertcan AT, Öztürk F, Gündüz K. Toll-like receptors and skin. Vol. 25, Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology. 2011. p. 997–1006.

9. Kang SSW, Kauls LS, Gaspari AA. Toll-like receptors: Applications to dermatologic disease. Vol. 54, Journal of the American Academy of Dermatology. 2006. p. 951–83.

10. Picascia DD, Robinson JK. Actinie cheilitis: A review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. Vol. 17, Journal of the American Academy of Dermatology. 1987. p. 255–64.

11. Salgueiro AP, de Jesus LH, de Souza IF, Rados PV, Visioli F. Treatment of actinic cheilitis: a systematic review. Clin Oral Investig. 2019;

12. Mello FW, Melo G, Modolo F, Rivero ERC. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. J Clin Exp Dent. 2019;

13. Song HJ, Lee SH, Choi GS, Shin J. Repeated ultraviolet irradiation induces the expression of Toll-like receptor 4, IL-6, and IL-10 in neonatal human melanocytes. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2018;34(2):145–51.

14. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: Clinical and pathologic characteristics in 65 cases. Oral Dis. 2004;10(4):212–6.

15. Melrose RJ. Premalignant oral mucosal diseases. J Calif Dent Assoc. 2001;

16. Widyarini S, Domanski D, Painter N, Reeve VE. Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(34):12837–42.

17. Cavalcante ASR, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. J Oral Maxillofac Surg. 2008;66(3):498–503.

18. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral e Maxilofacial. In: Patologia Oral e Maxilofacial. 2009. p. 213.

19. Savage NW, McKay C, Faulkner C. Actinic cheilitis in dental practice. Aust Dent J. 2010;55 Suppl 1:78–84.

20. Vieira RAMAR, Minicucci EM, Marques MEA, Marques SA. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. An Bras Dermatol. 2015;87(1):105–14.

21. Speight PM, Morgan PR. The natural history and pathology of oral cancer and precancer. Community dental health. 1993.

22. Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenço SV. Actinic cheilitis: Histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. J Cutan Pathol. 2007;34(4):309–14.

23. Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: Histopathology and p53. Vol. 33, Journal of Cutaneous Pathology. 2006. p. 539–44.

24. Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BMJ. P53 Protein Expression in Malignant, Pre-Malignant and Non-Malignant Lesions of the Lip. J Clin Pathol. 1996;49(8):648–53.

25. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: A treatment review. Vol. 49, International Journal of Dermatology. 2010. p. 1225–34.

26. Rossoe EWT, Tebcherani AJ, Sittart JA, Pires MC. Queilite actínica: Avaliação comparativa estética e funcional entre as vermelhectomias clássica e em W-plastia. An Bras Dermatol. 2011;

27. Barry RBM, McKenzie J, Berg D, Langtry JAA. Direct primary closure without undermining in the repair of vermilionectomy defects of the lower lip. Br J Dermatol. 2012;167(5):1092–7.

28. Zelickson BD, Roenigk RK. Actinic cheilitis. Treatment with the carbon dioxide laser. Cancer. 1990;65(6):1307–11.

29. Castiñeiras I, Del Pozo J, Mazaira M, Rodríguez-Lojo R, Fonseca E. Actinic cheilitis: Evolution to squamous cell carcinoma after carbon dioxide laser vaporization. A study of 43 cases. J Dermatolog Treat. 2010;21(1):49–53.

30. De Godoy Peres FF, Aigotti Haberbeck Brandão A, Rodarte Carvalho Y, Dória Filho U, Plapler H. A study of actinic cheilitis treatment by two low-morbidity CO2 laser vaporization one-pass protocols. Lasers Med Sci. 2009;24(3):375–85.

31. Orenstein A, Goldan O, Weissman O, Winkler E, Haik J. A new modality in the treatment of actinic cheilitis using the Er:YAG laser. J Cosmet Laser Ther. 2007;9(1):23–5.

32. Armenores P, James CL, Walker PC, Huilgol SC. Treatment of actinic cheilitis with the Er: YAG laser. J Am Acad Dermatol. 2010;63(4):642–6.

33. Burns CA, Brown MD. Imiquimod for the treatment of skin cancer. Vol. 23, Dermatologic Clinics. 2005. p. 151–64.

34. Smith KJ, Germain M, Yeager J, Skelton H. Topical 5% imiquimod for the therapy of actinic cheilitis. J Am Acad Dermatol. 2002;

35. McDonald C, Laverick S, Fleming CJ, White SJ. Treatment of actinic cheilitis with imiquimod 5% and a retractor on the lower lip: Clinical and histological outcomes in 5 patients. Br J Oral Maxillofac Surg. 2010;48(6):473–6.

36. Ribeiro CF, Souza FH, Jordão JM, Haendchen LC, Mesquita L, Schmitt J V, et al. Photodynamic therapy in actinic cheilitis: clinical and anatomopathological evaluation of 19 patients. An Bras Dermatol [Internet]. 2012;87(3):418–23. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22714758

37. Berking C, Herzinger T, Flaig MJ, Brenner M, Borelli C, Degitz K. The efficacy of photodynamic therapy in actinic cheilitis of the lower lip: A prospective study of 15 patients. Dermatologic Surg. 2007;33(7):825–30.

38. Yazdani Abyaneh MA, Falto-Aizpurua L, Griffith RD, Nouri K. Photodynamic therapy for actinic cheilitis: A systematic review. Dermatologic Surg. 2015;41(2):189–98.

39. Sotiriou E, Apalla Z, Koussidou-Erremonti T, Ioannides D. Actinic cheilitis treated with one cycle of 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy: report of 10 cases. Br J Dermatol. 2008;159(1):261–2.

40. Castaño E, Comunión A, Arias D, Miñano R, Romero A, Borbujo J. Photodynamic therapy for actinic cheilitis. Actas Dermosifiliogr. 2009;100(10):895–8.

41. Sotiriou E, Lallas A, Goussi C, Apalla Z, Trigoni A, Chovarda E, et al. Sequential use of photodynamic therapy and imiquimod 5% cream for the treatment of actinic cheilitis: A 12-month follow-up study. Br J Dermatol. 2011;

42. Choi SH, Kim KH, Song KH. Efficacy of ablative fractional laser-assisted photodynamic therapy for the treatment of actinic cheilitis: 12-month follow-up results of a prospective, randomized, comparative trial. Br J Dermatol. 2015;173(1):184–91.

43. Ulrich C, Forschner T, Ulrich M, Stockfleth E, Sterry W, Termeer C. Management of actinic cheilitis using diclofenac 3% gel: A report of six cases. Br J Dermatol. 2007;156(SUPPL. 3):43–6.

44. C. U, T. F, M. U, E. S, W. S, C. T. 3% Diclofenac in 2,5% hyaluronic acid in the treatment of actinic cheilitis. Aktuelle Derm [Internet]. 2008;34(3):67–71.

45. Gonzaga AKG, de Oliveira PT, da Silveira ÉJD, Queiroz LMG, de Medeiros AMC. Diclofenac sodium gel therapy as an alternative to actinic cheilitis. Clin Oral Investig. 2018;22(3):1319–25.

46. Laws RA, Wilde JL, Grabski WJ. Surgical pearl: Scroll-shaped electrode for electrodesiccation of actinic cheilitis. J Am Acad Dermatol. 2000;42(5 I):827–8.

47. DUFRESNE RG, CRUZ AP, ZEIKUS P, PERLIS C, JELLINEK NJ. Dermabrasion for Actinic Cheilitis. Dermatologic Surg. 2008;34(6):848–50.

48. Rajnochová Svobodová A, Gabrielová E, Ulrichová J, Zálešák B, Biedermann D, Vostálová J. A pilot study of the UVA-photoprotective potential of dehydrosilybin, isosilybin, silychristin, and silydianin on human dermal fibroblasts. Arch Dermatol Res. 2019;May.

49. Min W, Ahmad I, Chang ME, Burns EM, Qian Q, Yusuf N. Baicalin Protects Keratinocytes from Toll-like Receptor-4 Mediated DNA Damage and Inflammation Following Ultraviolet Irradiation. Photochem Photobiol. 2015;91(6):1435–43.

50. Dutra DM, Do Nascimento MAG, Soares MSM. Actinic cheilitis: A case report and a review of the literature. Revista Odonto Ciencia. 2016.

51. Svobodová A, Vostálová J. Solar radiation induced skin damage: Review of protective and preventive options. Vol. 86, International Journal of Radiation Biology. 2010. p. 999–1030.

52. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: Molecular mechanisms. Vol. 32, Journal of Cutaneous Pathology. 2005. p. 191–205.

53. Mancebo SE, Wang SQ. Skin cancer: Role of ultraviolet radiation in carcinogenesis. Rev Environ Health. 2014;29(3):265–73.

54. INCA. Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil [Internet]. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva. 2015. p126.

55. Czerninski R, Zini A, Sgan-Cohen HD. Lip cancer: Incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. Br J Dermatol. 2010;162(5):1103–9.

56. Jadotte YT, Schwartz RA. Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I. Diagnostic insights. J Am Acad Dermatol. 2012;66(2):173–84.

57. Maruccia M, Onesti MG, Parisi P, Cigna E, Troccola A, Scuderi N. Lip cancer: A 10-year retrospective epidemiological study. Anticancer Res. 2012;32(4):1543–6.

58. Costa A de LL, Júnior RF de A, Ramos CCF. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. Braz J Otorhinolaryngol. 2015;71(2):181–7.

59. Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. Clinical Microbiology Reviews. 2003.

60. ARANCIBIA SA, BELTRÁN CJ, AGUIRRE IM, SILVA P, PERALTA AL, MALINARICH F, et al. Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses [Internet]. Vol. 40, Biological Research. 2007.

61. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: Linking innate and adaptive immunity. Vol. 6, Microbes and Infection. 2004. p. 1382–7.

62. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem. 2002;277(17):15107–12.

63. de Barros Gallo C, Marichalar-Mendia X, Setien-Olarra A, Acha-Sagredo A, Bediaga NG, Gainza-Cirauqui ML, et al. Toll-like receptor 2 rs4696480 polymorphism and risk of oral cancer and oral potentially malignant disorder. Arch Oral Biol. 2017;82:109–14.

64. Hussaini HM, Parachuru VPB, Seymour GJ, Rich AM. Forkhead box-P3+ regulatory T cells and toll-like receptor 2 co-expression in oral squamous cell carcinoma. Acta Histochem. 2017;119(3):205–10.

65. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. Vol. 11, Nature Immunology. 2010. p. 373–84.

66. Galluzzi L, Vacchelli E, Eggermont A, Fridman WH, Galon J, Sautès-Fridman C, et al. Trial watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. Vol. 1, OncoImmunology. 2012. p. 699–716.

67. Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling networks: An integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. J Dent Res [Internet]. 2011 Apr 12;90(4):417–27.

68. Pradere JP, Dapito DH, Schwabe RF. The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. Vol. 33, Oncogene. 2014. p. 3485–95.

69. Jouhi L, Renkonen S, Atula T, Mäkitie A, Haglund C, Hagström J. Different toll-like receptor expression patterns in progression toward cancer. Vol. 5, Frontiers in Immunology. 2014.

70. Rich AM, Hussaini HM, Parachuru VPB, Seymour GJ. Toll-like receptors and cancer, particularly oral squamous cell carcinoma. Frontiers in Immunology. 2014.

71. Park HS, Jin SP, Lee Y, Oh IG, Lee S, Kim JH, et al. Toll-like receptor 2 mediates a cutaneous reaction induced by repetitive ultraviolet B irradiation in C57/BL6 mice in vivo. Exp Dermatol. 2014;

72. Ng LK, Rich AM, Hussaini HM, Thomson WM, Fisher AL, Horne LS, et al. Toll-like receptor 2 is present in the microenvironment of oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer. 2011;104(3):460–3.

73. Ahmad I, Simanyi E, Guroji P, Tamimi IA, Delarosa HJ, Nagar A, et al. Toll-like receptor-4 deficiency enhances repair of UVR-induced cutaneous DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. J Invest Dermatol. 2014;134(6):1710–7.

74. Kotrashetti VS, Nayak R, Bhat K, Hosmani J, Somannavar P. Immunohistochemical expression of TLR4 and TLR9 in various grades of oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma, and their roles in tumor progression: A pilot study. Biotech Histochem. 2013;88(6):311–22.

75. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ, Seymour GJ. Heat shock protein expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. Eur J Cancer Part B Oral Oncol. 1995;31(1):63–7.

76. Habich C, Burkart V. Heat shock protein 60: Regulatory role on innate immune cells. Vol. 64, Cellular and Molecular Life Sciences. 2007. p. 742–51.

77. Kaur J, Das SN, Srivastava A, Ralhan R. Cell surface expression of 70 kDa heat shock protein in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological features. Oral Oncol. 1998;34(2):93–8.

78. Fan GK, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. Oral Oncol. 2006;42(2):147–53.

79. Seoane J, Ramírez JR, Romero MA, Varela-Centelles P, Garcia-Pola MJ. Expression of heat shock protein (HSP70) in oral lichen planus and non-dysplastic oral leucoplakia. Clin Otolaryngol Allied Sci. 2004;29(2):191–6.

80. Anbarasi K, Kathirvel G, Vani G, Jayaraman G, Shyamala Devi CS. Cigarette smoking induces heat shock protein 70 kDa expression and apoptosis in rat brain: Modulation by bacoside A. Neuroscience. 2006;138(4):1127–35.

81. Cappello F, Di Stefano A, David S, Rappa F, Anzalone R, La Rocca G, et al. HSP60 and HSP10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease. Cancer. 2006;107(10):2417–24.

82. Wegele H, Müller L, Buchner J. Hsp70 and Hsp90—a relay team for protein folding. In: Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 2004. p. 1–44.

83. Sajjadi AY, Mitra K, Grace M. Expression of heat shock proteins 70 and 47 in tissues following short-pulse laser irradiation: Assessment of thermal damage and healing. Med Eng Phys. 2013;35(10):1406–14.

84. Mello FW, Melo G, Modolo F, Rivero ERC. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. J Clin Exp Dent. 2019;11(1):e62–9.

85. Ferreira AM, de Souza Lucena EE, de Oliveira TC, da Silveira JD, de Oliveira PT, de Lima KC. Prevalence and factors associated with oral potentially malignant disorders in Brazil’s rural workers. Oral Dis. 2016;22(6):536–42.

86. De Souza Lucena EE, Costa DCB, Da Silveira EJD, Lima KC. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. Oral Dis. 2012;18(6):575–9.

87. Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. Expression of 70-kDa heat shock protein in oral lesions: marker of biological stress or pathogenicity. Oral Oncol [Internet]. 1998;34(6):496–501.

88. Ikehata N, Takanashi M, Satomi T, Watanabe M, Hasegawa O, Kono M, et al. Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development. Biochem Biophys Res Commun. 2018;495(3):2227–34.

89. Wu CC, Chang YT, Chang KP, Liu YL, Liu HP, Lee IL, et al. Salivary auto-antibodies as noninvasive diagnostic markers of oral cavity squamous cell carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(8):1569–78.

90. Wu J, Liu T, Rios Z, Mei Q, Lin X, Cao S. Heat Shock Proteins and Cancer. Trends in Pharmacological Sciences. 2017.

91. Seoane JM, Varela-Centelles PI, Ramirez JR, Cameselle-Teijeiro J, Romero MA, Aguirre JM. Heat shock proteins (HSP70 and HSP27) as markers of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Am J Dermatopathol. 2006;28(5):417–22.

92. Patil P, Nandimath K, Prabhu S, Naikmasur V. Heat shock protein (HSP70) as a marker of epithelial dysplasia in oral dysplastic lesions: A clinicopathological study. J Oral Maxillofac Pathol. 2015;19(1):53.

93. Vayssier M, Banzet N, François D, Bellmann K, Polla BS. Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70. Am J Physiol Cell Mol Physiol. 2017;275(4):L771–9.

94. Vayssier M, Banzet N, François D, Bellmann K, Polla BS. Tobacco smoke induces both apoptosis and necrosis in mammalian cells: differential effects of HSP70. Am J Physiol Cell Mol Physiol. 2017;

95. Kaur J, Kaur J, Ralhan R. Induction of apoptosis by abrogation of HSP70 expression in human oral cancer cells. Int J Cancer. 2000;85(1):1–5.

96. Tavassol F, Starke OF, Kokemüller H, Wegener G, Müller-Tavassol CC,

Gellrich NC, et al. Prognostic significance of heat shock protein 70 (HSP70) in patients with oral cancer. Head Neck Oncol. 2011;

97. Farnebo L, Shahangian A, Lee Y, Shin JH, Scheeren FA, Sunwoo JB. Targeting Toll-like receptor 2 inhibits growth of head and neck squamous cell carcinoma. Oncotarget. 2015;6(12).

98. Szczepański M, Stelmachowska M, Stryczyński Ł, Golusiński W, Samara H, Mozer-Lisewska I, et al. Assessment of expression of toll-like receptors 2, 3 and 4 in laryngeal carcinoma. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology. 2007;264(5):525–30.

APÊNDICE A – Tabela A.1 – Quantificação de todas as amostras coletadas para análise de pureza do RNA com espectrofotômetro Nanodrop®

Amostra	*C (μg/μL)*	*A260/A280*	*A260/A230*
QA1	0.04	1.49	0.22
QA2	0.52	1.82	1.99
QA3	0.06	1.52	0.28
QA4	0.009	1.54	0.30
QA5	0.011	1.62	0.33
QA6	0.011	1.76	0.26
QA7	0.017	1.52	0.21
QA8	0.15	1.85	2.11
QA9	0.30	1.85	0.60
QA10	0.24	1.89	1.29
QA11	0.59	1.58	0.32
QA12	0.40	1.92	0.72
QA13	0.17	1.74	0.52
QA14	0.28	1.86	0.54
QA15	0.35	1.73	0.63
QA16	0.31	1.72	0.58
QA17	1.22	1.73	0.82
QA19	1.74	1.84	1.28
QA20	0.29	1.94	0.70
QA21	0.31	2.06	1.06
QA22	0.22	1.8	0.55
QA23	0.14	1.68	0.38
QA24	0.12	1.70	0.38
QA25	0.21	1.84	0.71
QA26	0.20	1.62	0.50
QA27	0.18	1.78	0.39
QA28	0.44	2.07	0.92
QA29	0.14	1.53	0.42
QA30	0.41	2.02	1.00
QA31	0.53	1.59	0.28
QA32	0.35	1.97	0.76
QA33	0.33	2.05	1.92
QA34	0.10	1.84	0.61
QA35	0.43	1.92	0.88
QA36	0.53	1.68	0.39
QA37	0.45	2.01	0.99

QA38	0.56	1.58	0.30
QA39	0.34	2.13	1.43
QA40	0.58	1.60	0.30
CEC1	0.18	1.81	0.57
CEC2	0.16	1.78	0.45
CEC3	3.82	1.78	1.33
CEC4	1.31	1.93	0.64
CEC5	3.69	1.92	0.96
CEC6	1.37	1.95	1.01

ANEXO A – Autorização de Pesquisa na Clínica Odontológica

UNIVERSIDADE METROPOLITANA DE SANTOS
CAMPUS BANDEIRANTE I, II, III E IV

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA NA CLÍNICA ODONTOLÓGICA

TÍTULO DA PESQUISA: ANÁLISE DAS EXPRESSÕES GÊNICA E PROTEICA DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 60 E 70 E DOS RECEPTORES TOLL-LIKE 2 e 4 EM DIFERENTES GRAUS DE DISPLASIA EM PORTADORES DE QUEILITE ACTÍNICA

PESQUISADORES: Lígia Gonzaga Fernandes

ORIENTADOR/PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Junior
PROFESSOR RESPONSÁVEL LOCAL: Prof. Dr. José Narciso Rosa Assunção Junior

OBJETIVO PRINCIPAL DA PESQUISA: Correlacionar a expressão gênica à proteica, parâmetros clínicos e diferentes graus de displasia das queilites actínicas.

Obs. Lembramos da necessidade da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa trazendo cópia do parecer e assinalando os dias de utilização da Clínica Odontológica para a pesquisa (.

Dia e horário da utilização da clínica para a pesquisa citada acima após aprovação:Sextas- feiras das 8:00 às 12:00 junto a disciplina de Semiologia

Autorizo a utilização da Clínica Odontológica para a pesquisa acima descrita.

Santos, 18/08/2017

Profa. Dra. Sandra Kalil Bussadori
Coordenadora do Centro de Pesquisa e Pós Graduação

Av. Cons. Nébias, 536, Santos, CEP: 11045-002 – SP – Fone: 55-13-3328-3400 – Homepage: www.unimes.br

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DAS EXPRESSÕES GÊNICA E PROTEICA DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 60 E 70 E DOS RECEPTORES TOLL-LIKE 2 e 4 EM DIFERENTES GRAUS DE DISPLASIA EM PORTADORES DE QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL.

Pesquisador: Celso Lemos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 59004716.4.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.824.854

Apresentação do Projeto:

Por serem lesões com etiologia definida, é possível e necessário conscientizar a população sobre essas condições e sua prevenção.

A queilite actínica é muitas vezes negligenciada pelos pacientes, médicos e cirurgiões-dentistas. Dessa forma, os pacientes susceptíveis não alteram seus hábitos de exposição solar; os profissionais não desenvolvem a capacidade de realizar orientação adequada ou detecção precoce da entidade; e certamente vivenciamos uma incidência de câncer de lábio maior do que a inevitável. As análises histopatológicas de rotina, embora capazes de estabelecer o diagnóstico das queilites actínicas, utilizam critérios de gradação das displasias epiteliais ainda questionáveis do ponto de vista do valor preditivo rumo à degeneração maligna. Sendo assim estudos utilizando técnicas de marcação imunoistoquímica podem permitir avanço de nosso poder de precisão prognóstica em relação aos pacientes portadores de queilite actínica e, por conseguinte, na adequação do planejamento terapêutico em bases individualizadas.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as expressões gênica e proteica das HSPs e dos TLRs em indivíduos com queilite actínica

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

com diferentes graus de displasia em relação a indivíduos controles sadios e com carcinoma epidermóide oral.

• Identificar a expressão gênica dos TLR nas queilites actínicas em relação a indivíduos controles normais e com carcinoma epidermóide de oral.

• Identificar a expressão proteica dos TLR nas queilites actínicas em relação a indivíduos controles normais e com carcinoma epidermóide de oral.

• Correlacionar a expressão gênica à proteica, parâmetros clínicos e diferentes graus de displasia das queilites actínicas.

• Correlacionar as expressões gênica e proteica das HSPs e dos TLRs em indivíduos com queilite

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos, inerentes ao procedimento cirúrgico de pequeno fragmento, sendo que a biópsia incisional é realizada como procedimento padrão para o diagnóstico da lesão e gradação das possíveis displasias presentes.

Benefícios: A participação do paciente não trará benefícios diretos e ele, porém contribuirá para que mais estudos à cerca de sua condição sejam realizados,portanto será beneficiado indiretamente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é muito importante pois permitirá avaliar se técnicas de marcação munoistoquímica podem permitir avanço no poder de precisão prognóstica em relação aos pacientes portadores de queilite actínica e, por conseguinte, na adequação do planejamento terapêutico em bases individualizadas, já que as análises histopatológicas de rotina, embora capazes de estabelecer o diagnóstico das queilites actínicas,utilizam critérios de gradação das displasias epiteliais ainda questionáveis do ponto de vista do valor preditivo rumo à degeneração maligna.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou, Folha de Rosto, TCLE, Projeto detalhado, Autorização do Laboratório de patologia bucal, Autorização do laboratório de patologia molecular e autorização da clínica.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.824.854

objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_773501.pdf	14/10/2016 11:13:48		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/08/2016 13:31:46	Lígia Gonzaga Fernandes	Aceito
Outros	Autorizacao_Clinica_Ligia.pdf	17/08/2016 15:37:55	Lígia Gonzaga Fernandes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado.docx	15/08/2016 18:58:28	Lígia Gonzaga Fernandes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	15/08/2016 18:46:22	Lígia Gonzaga Fernandes	Aceito
Outros	Autorizacao_patologia.pdf	15/08/2016 18:45:52	Lígia Gonzaga Fernandes	Aceito
Outros	Autorizacao_lab_pato_molecular.pdf	15/08/2016 18:45:21	Lígia Gonzaga Fernandes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 18 de Novembro de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO C – Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

ANÁLISE DAS EXPRESSÕES GÊNICA E PROTEICA DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 60 E 70 E DOS RECEPTORES TOLL-LIKE 2 e 4 EM DIFERENTES GRAUS DE DISPLASIA EM PORTADORES DE QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA

1. NOME:
.....
SEXO: .M □ F □
DATA NASCIMENTO:...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº .....
APTO: ..... BAIRRO: .....
CIDADE ..... CEP:.....
TELEFONE: DDD (.....) .....

II. DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

ANÁLISE DAS EXPRESSÕES GÊNICA E PROTEICA DAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO 60 E 70 E DOS RECEPTORES TOLL-LIKE 2 e 4 EM DIFERENTES GRAUS DE DISPLASIA EM PORTADORES DE QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **LIGIA GONZAGA FERNANDES**

ORIENTADOR: **CELSO LEMOS**

CO ORIENTADOR: **CAMILA DE BARROS GALLO**

Departamento USP: Estomatologia

Rubricas: Participante da Pesquisa _____ **Pesquisador Responsável** _____

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : **18 meses**

III. REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. **Justificativa e os objetivos da pesquisa**: O objetivo deste trabalho é avaliar a expressão dos genes e proteínas descritas acima para tentarmos estabelecer as probabilidades de evolução da queilite actinica, lesão clinicamente diagnosticada no seu lábio inferior, para câncer de lábio.

   Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: O participante da pesquisa está sendo voluntariamente convidado para participar desta pesquisa. O participante da pesquisa será submetido a uma entrevista em que responderá perguntas sobre a sua saúde, seguida de exame clínico bucal completo. biópsia (pequena cirurgia para remoção de fragmento de tecido) no lábio inferior, em área que a ser escolhida de acordo com o aspecto clínico da lesão. Havendo condições adequadas, o participante da pesquisa será submetido a procedimento de biópsia para confirmação do diagnóstico e caracterização microscópica do seu caso. A escolha da área a ser operada leva em conta alterações clínicas evidentes da lesão. Diante da confirmação do diagnóstico o participante da pesquisa receberá instruções para utilização do protetor solar labial e, dependendo dos resultados dos exames deverá retornar periodicamente para controle e acompanhamento em períodos regulares de 3 a 6 meses.

2. **Desconfortos e riscos esperados:** É esperado pequeno desconforto associado ao procedimento cirúrgico da biópsia necessária para determinar o diagnóstico, que pode provocar pequeno inchaço e alguma sensibilidade local

durante alguns dias. Voltamos a salientar que esse procedimento é necessário e rotineiro. Todas as medidas para a sua segurança serão tomadas e qualquer dúvida adicional o participante da pesquisa poderá ligar para o tel (11) 3091-7883, contatando os pesquisadores responsáveis.

3. **Benefícios que poderão ser obtidos**: Pode não haver benefício direto aos participantes da pesquisa. Ela pretende contribuir para aumentar o conhecimento sobre a doença - queilite actínica - trazendo benefícios a toda população que sofre dessa condição. O participante da pesquisa terá o benefício de conhecer detalhadamente as características de seu quadro clínico e receberá instruções individualizadas de tratamento e controle. Uma vez estabelecido o diagnóstico, que deve consumir cerca de três consultas, o participante da pesquisa deverá permanecer em controles periódicos regulares, de 3 ou 6 meses, de acordo com as características clínicas e microscópicas de seu quadro.

IV. ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO PARTICIPANTE DA PESQUISA CONSIGNANDO:

Acesso a qualquer tempo às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimento de eventuais dúvidas. A aluna de doutorado Lígia Gonzaga Fernandes é a pesquisadora e operadora, o Prof. Dr. Celso Lemos é o orientador e o Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya e a Profa. Dra. Camila de Barros Gallo pesquisadores colaboradores da pesquisa. Todos podem ser encontrados no endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP - Departamento de Estomatologia tel: 3091-7883 ou pelo Email: ligia.fernandes@usp.br e telefone celular. Se o participante da pesquisa tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP Fone: (11) 3091.7960 – E-mail: cepfo@usp.br Horário de Funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para

defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012).

1. É garantida a sua liberdade de retirada deste consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
2. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros participantes não sendo divulgado a sua identificação em nenhum momento;
3. O participante da pesquisa tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
4. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante da pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas e medicações. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelos pesquisadores.
5. O pesquisador poderá utilizar o material remanescente para outras pesquisas, o Sr. (a) deseja ser avisado? SIM ( ) NÃO ( )

V. CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim. Eu discuti com a doutoranda Lígia Gonzaga Fernandes sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Rubricas: Participante da Pesquisa **Pesquisador Responsável**

Declaro ainda que recebo uma via deste Termo (assinada pelo pesquisador) para minha guarda.

Assinatura do participante da pesquisa Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste participante da pesquisa ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador Responsável Data ____/____/____