FERNANDA MOMBRINI PIGATTI

Participação da via Notch em lesões labiais fotoinduzidas

São Paulo

2015

FERNANDA MOMBRINI PIGATTI

Participação da via Notch em lesões labiais fotoinduzidas

Versão Original

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

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins

São Paulo

2015

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.

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Pigatti, Fernanda Mombrini.

Participação da via Notch em lesões labiais fotoinduzidas / Fernanda Mombrini Pigatti ; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2015.
59 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original

1. Neoplasias bucais. 2. Radiação ultravioleta. 3. Imunohistoquímica.
4. Receptores de superfície celular. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

Pigatti FM. Participação da via Notch em lesões labiais fotoinduzidas. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ **Julgamento:**_____

Aos meus pais, **Altêmia** e **José Carlos**, aos meus irmãos, **Juliana** e **Gabriel**, e a todos que, por diversas maneiras, me incentivaram e contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

AGRADECIMENTOS

À minha **família** por todo amor e apoio em todas as minhas escolhas. Amo vocês!

À minha **orientadora** pela confiança, estímulo e ensinamentos. Esforço-me a cada dia para seguir seu exemplo de dedicação e amor à docência.

A todos os **professores e funcionários** que ajudaram a trilhar esse caminho. Levarei comigo uma lembrança e um aprendizado de cada um.

Aos meus **amigos**. Aos de sempre, aos recentes, aos que torceram, aos que ajudaram ativamente, aos que, simplesmente, tornaram a jornada mais amena. A participação de cada um foi fundamental.

Muito obrigada!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

Pigatti FM. Participação da via Notch em lesões labiais fotoinduzidas [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

A intensa exposição ao Sol sujeita o lábio, principalmente o inferior, aos danos provocados pela absorção de radiação ultravioleta (UV). O carcinoma epidermoide é a neoplasia maligna que se desenvolve nos lábios após exposição crônica prolongada aos raios UV e acredita-se que todos os casos sejam precedidos pela desordem potencialmente maligna denominada queilite actínica. Ambas as lesões são causados pelos efeitos nocivos da radiação UV agindo diretamente sobre o DNA, por meio do fenômeno da fotocarcinogênese. Nesse processo, a radiação provoca mutações que são capazes de causar a iniciação, progressão e a promoção de neoplasias. No entanto, é também importante considerar que outros eventos moleculares, além das mutações, estão envolvidos na iniciação e progressão do câncer. Alterações moleculares com ganho ou perda de função de componentes da via de sinalização Notch estão envolvidas em diferentes tipos de cânceres hematológicos e sólidos. Entretanto, a participação da sinalização Notch em câncer de lábio ainda é desconhecida. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar se a via Notch está relacionada às lesões de queilite actínica e de carcinoma epidermoide de lábio e sua participação na fotocarcinogênese bucal. Para isso, foram utilizados 45 casos de queilite actínica, 15 casos de carcinoma epidermoide de lábio e 05 casos de lábio com aspecto de normalidade, nos quais foi analisada a expressão de Notch1 e Jagged1 por meio da técnica de imuno-histoquímica. Os resultados demonstraram que houve perda da expressão de Notch1 em 40% dos carcinomas epidermóides de lábio, sugerindo que a expressão reduzida de Notch1 pode converter os queratinócitos a um estado ativado e imaturo. Observou-se ainda, diferença nos padrões de marcação de Nocth1 e Jagged1 nas células epiteliais sugerindo que o sinal da via Notch seja transmitido a partir de uma célula apical para uma célula basal devido a localização das células que expressam o receptor e das que expressam o ligante. Concluiu-se, assim, que os resultados imuno-histoquímicos não apontam a uma regulação diferencial da expressão da proteína Notch1 e Jagged1 em lesões UV induzidas.

Palavras-chave: Câncer Labial. Raios Ultravioleta. Imuno-histoquímica. Receptores Nocth.

ABSTRACT

Pigatti FM. Participation of the Notch pathway in photoinduced lip lesions [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

The intense exposure to the sun subject the lips, particularly the lower, the damage caused by the absorption of ultraviolet (UV) radiation. The squamous cell carcinoma is a malignant tumor that develops on the lips after prolonged chronic exposure to UV rays and it is believed that all cases are preceded by potentially malignant disorder called actinic cheilitis. Both lesions are caused by the harmful effects of UV radiation acting directly on the DNA, through the phenomenon of photocarcinogenesis. In this process, the radiation causes mutations that are capable of causing the initiation, progression and promotion of cancer. However, it is also important to consider that other molecular events, apart from the mutations are involved in the initiation and progression of cancer. Molecular abnormalities with gain or loss of Notch pathway components function are involved in several types of hematological and solid cancer. However, the participation of Notch signaling in lip cancer is still unknown. The objective of this study was to investigate whether the Notch pathway is related to injuries actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip and participation in oral photocarcinogenesis. For this, were used 45 cases of actinic cheilitis, 15 cases of squamous cell carcinoma of the lip and lip 05 cases with normal aspect in which we analyzed the expression of Notch1 and Jagged1 by immunohistochemistry. The results showed loss of Notch1 expression in 40% of squamous cell carcinomas of the lip, suggesting that reduced expression of Notch1 can convert to an activated keratinocytes and immature state. There was also a difference in labeling patterns of Notch 1 and Jagged1 epithelial cells suggesting that the Notch pathway signal is transmitted from an apical cell to a basal cell due to localization of cells expressing the receptor and expressing the ligand. In summary, the immunohistochemical results do not show a differential regulation of Notch 1 and Jagged1 expression in UV induced lesions.

Keywords: Lip Neoplasm. Ultraviolet Rays. Immunohistochemistry. Receptors, Notch.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 Carcinoma epidermoide de lábio caracterizado pela proliferação e invasão de queratinócitos atípicos no tecido conjuntivo subjacente. Pérolas córneas de diferentes tamanhos e estroma com intenso infiltrado inflamatório mononuclear podem ser notados. HE (100X no original).....34
- Figura 5.2 Aspectos histológicos das lesões de queilite actínica. Quelite actínica com displasia epitelial discreta exibindo ampla faixa de elastose solar (**A**). Lesão de queilite actínica com displasia epitelial moderada, exibindo estratificação irregular do epitélio e pleomorfismo celular (**B**). Displasia epitelial intensa em lesão de queilite actínica apresentando disqueratose e projeções afiladas em direção ao tecido conjuntivo (**C**). Alterações arquiteturais e citológicas em lesão de queilite actínica com displasia epitelial intensa (**D**). HE **A**, **B** e **C** (100X no original) e **D** (400X no original).....35
- Figura 5.3 Lesão de queilite actínica mostrando expressão da proteína Notch1 em região basal do epitélio (**A**). Detalhe da expressão de Nocth1 em camada basal e parabasal do epitélio (**B**). Imuno-histoquímica anti-Notch1. **A** (100X no original) e **B** (400X no original).....37
- Figura 5.4 Lesão de queilite actínica exibindo forte imunomarcação da proteína Notch1 em mastócitos e marcação fraca em vasos sanguíneos. Imuno-histoquímica anti-Notch1 (400X no original).....38
- Figura 5.5 Lesão de queilite actínica exibindo marcação fraca das células da camada basal e até metade da camada espinhosa (**A**). Queilite actínica mostrando forte positividade das células basais e até o final da camada espinhosa. (**B**). Imuno-histoquímica anti-Jagged1 (400X no original).....40

Figura 5.6	Lesão de queilite actínica exibindo intensa imunomarcção da proteína Jagged1 em mastócitos e em vasos sanguíneos. Imuno-histoquímica anti-Jagged1 (400X no original).....	41
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Escala de Fitzpatrick para determinação do fototipo de pele.....	21
Tabela 5.1	Intensidade de marcação da proteína Notch1 em lesões labiais fotoinduzidas e em lábio normal.....	36
Tabela 5.2	Intensidade de marcação da proteína Jagged1 em lesões labiais fotoinduzidas e em lábio normal.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albumina sérica bovina)
CEL	Carcinoma Epidermoide de Lábio
CFC	Clorofluorcarbonetos
DNA	<i>Dedeoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
HE	Hematoxilina e Eosina
NED	<i>Notch extracellular domain</i> (Domínio extracelular de Notch)
NICD	<i>Notch intracellular domain</i> (Domínio intracelular de Notch)
OMS	Organização Mundial da Saúde
QA	Queilite Actínica
TACE	<i>Tumor necrosis factor α converting enzyme</i> (Enzima conversora de fator de necrose tumoral α)
TMN	Tumor-Nodo-Metástase
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
cm	Centímetro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
μm	Micrômetro
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogênico
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3 PROPOSIÇÃO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Seleção de casos e amostras teciduais	28
4.2 Análise morfológica	28
4.3 Estudo imuno-histoquímico	30
4.4 Avaliação dos resultados	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Análise morfológica	33
5.2 Imuno-histoquímica.....	35
5.2.1 Notch1	36
5.2.2 Jagged1	38
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXOS.....	57

1 INTRODUÇÃO

A intensa exposição ao Sol sujeita o lábio, principalmente o inferior, aos danos provocados pela absorção de radiação ultravioleta (UV).

O vermelhão do lábio é uma zona de transição entre a pele e a mucosa. Essa região anatômica é composta por epitélio estratificado associado a um tecido conjuntivo subjacente que tem como função proteger a ação danosa do meio externo.

Apesar de apresentar barreiras físico-químicas protetoras, a região labial é acometida por lesões de diversas etiologias, dentre elas as neoplasias.

O carcinoma epidermoide é a neoplasia maligna que se desenvolve nos lábios após exposição crônica prolongada aos raios UV e acredita-se que todos os casos de carcinoma de lábio sejam precedidos pela desordem potencialmente maligna denominada queilite actínica.

Ambas as lesões são causados pelos efeitos nocivos da radiação UV agindo diretamente sobre o DNA, por meio do fenômeno da fotocarcinogênese. Nesse processo, a radiação provoca mutações que são capazes de causar a iniciação, progressão e a promoção de neoplasias. No entanto, é também importante considerar que outros eventos moleculares, além das mutações, estão envolvidos na iniciação e progressão do câncer.

Alterações moleculares com ganho ou perda de função de componentes da via de sinalização Notch estão envolvidas em diferentes tipos de cânceres hematológicos e sólidos. Entretanto, a participação da sinalização Notch em câncer de lábio ainda é desconhecida.

Assim, o objetivo do presente trabalho é investigar se a via Notch está relacionada às lesões de queilite actínica e de carcinoma epidermoide de lábio e sua participação na fotocarcinogênese bucal.

Para isso, foram utilizados 15 casos de queilite actínica, 15 casos de carcinoma epidermoide de lábio e 05 casos de lábio sem lesões UV induzidas como casos controle, nos quais foram analisadas a expressão de Notch1 e Jagged1 por meio da técnica de imuno-histoquímica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A intensa exposição ao Sol, por meio das atividades profissionais ou de lazer realizadas ao ar livre, sujeita os tecidos humanos aos danos provocados pela absorção de radiação ultravioleta (UV). A pele é o maior órgão e o mais exposto ao excesso de radiação e, como consequência, o câncer de pele é o mais frequente no mundo. Entretanto, os lábios, em especial o inferior, também estão em situação de suscetibilidade aos efeitos dessa radiação.¹

A zona de vermelhão do lábio está organizada em duas principais camadas, semimucosa e lâmina própria, que são constituídas por componentes epiteliais e mesenquimais. A semimucosa, transição gradual entre a pele e a mucosa oral, é a camada mais externa e o principal ponto de contato do lábio com o meio externo. Desta maneira, a semimucosa labial desempenha um importante papel na resistência a agressões ambientais.^{2,3}

A lâmina própria é constituída por tecido conjuntivo vascularizado e exibe células mesenquimais e imunes que participam ativamente de várias respostas fisiológicas. A semimucosa, demarcada da lâmina própria a partir da membrana basal, é dividida em estratos celulares a partir do exterior da membrana basal: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e o estrato córneo. Cada estrato é identificado pela morfologia e pelo grau de diferenciação do queratinócito, indicado pela expressão de citoqueratinas e outras proteínas.⁴

Os queratinócitos são as células epiteliais mais abundantes e formam uma barreira física por meio da diferenciação celular programada à medida que migram em direção à superfície para, eventualmente, formar corneócitos. Além da criação de uma barreira física altamente eficaz, os queratinócitos também acumulam pigmentos de melanina à medida que amadurecem, que têm como função bloquear a penetração da radiação UV. Apesar dos pigmentos de melanina serem encontrados em abundância nos queratinócitos, eles não são produzidos nestas células. Em vez disso, a síntese de melanina é restrita aos melanócitos, que através de extensões dendríticas mantém íntimo contato com até cinquenta queratinócitos vizinhos.^{5,6}

Entretanto, mesmo com barreiras físico-químicas protetoras, esse epitélio de transição é acometido por lesões de diversas etiologias, dentre elas as neoplasias.

A neoplasia mais comum em região oral é o carcinoma epidermoide. O carcinoma epidermoide é uma neoplasia maligna de origem epitelial que, apesar de descrito coletivamente como “carcinoma oral”, pode ocorrer tanto na região intraoral quanto no vermelhão dos lábios. Entretanto, essas lesões apresentam etiologia e comportamento clínico

bastante distintos. O carcinoma epidermoide intraoral pode ocorrer em qualquer localização da cavidade oral: língua, gengivas, palato, assoalho e mucosa jugal. Porém, há uma maior frequência de casos localizados em assoalho e lateral/ventre de língua. Os principais fatores etiológicos relacionados à lesão intraoral são o hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas. Outros fatores como o hábito de mascar noz de areca, hereditariedade, poluição ambiental, micro-organismos e deficiência de micronutrientes na dieta, também podem contribuir para o aparecimento do carcinoma epidermoide intraoral.⁷⁻⁹

Em zona de vermelhão do lábio, o carcinoma epidermoide se desenvolve após exposição crônica prolongada aos raios UV. No Brasil, o carcinoma epidermoide de lábio (CEL) desempenha um papel importante nos índices epidemiológicos, no entanto, não existem dados nacionais mostrando a sua incidência isolada. Os dados estatísticos disponíveis e que devem ser considerados para este tipo de neoplasia são os observados para o câncer de boca. Considera-se que o CEL corresponda a cerca de 14% de todos os cânceres de boca diagnosticados. A incidência é maior entre os homens, com uma proporção de 6:1 em relação às mulheres e atinge principalmente pessoas com mais de 50 anos de idade, de pele clara e que realizam atividades profissionais e/ou de lazer ligadas à exposição solar crônica.^{10,11}

O lábio inferior é o sítio anatômico mais comum do CEL que, clinicamente, pode se apresentar de diferentes maneiras. Inicialmente, a lesão é assintomática e manifesta-se como placas leucoplásicas entremeadas por áreas eritroplásicas, por vezes atróficas, mostrando fissuras persistentes recobertas por crostas. Gradualmente é formada uma lesão ulcerada, infiltrativa, com limites claros e taxa de crescimento variável, que não cicatriza. Em estágios avançados, pode haver dor associada à lesão, que se apresenta como uma úlcera com bordas endurecidas.¹²

Histologicamente, o CEL é caracterizado pela proliferação de queratinócitos atípicos, organizados em ilhas e cordões de tamanhos variados, que invadem o tecido conjuntivo. As células neoplásicas apresentam-se poliédricas, volumosas, de limites precisos, exibindo citoplasma amplo e claro, além de núcleos redondos ou ovais centrais com cromatina frouxa. Individualmente, as células neoplásicas exibem importante pleomorfismo celular e nuclear, como aumento do tamanho dos núcleos, aumento do número e evidênciação nucleolar, alteração da relação núcleo/citoplasma, aumento do número de figuras de mitose que são, por vezes, atípicas. Na maioria das vezes notam-se pérolas de queratina de tamanhos variados, evidenciando o grau de diferenciação celular. O estroma da lesão é composto por tecido

conjuntivo denso em que se pode notar intenso infiltrado inflamatório mononuclear com áreas de coleções neutrofílicas.^{13,14}

O CEL é considerado uma doença de baixa agressividade e prognóstico favorável, devido a sua tendência de progredir lentamente. O estadiamento do CEL baseado no sistema TNM (de acordo com o qual T representa o tamanho do tumor; N, a presença ou ausência de metástases nos gânglios linfáticos regionais; e M, na presença ou ausência de metástases à distância) é que determina o tipo de tratamento. Nos estágios I (tumores menores do que 2 cm) e II (entre 2 e 4 cm) o tratamento de escolha é a excisão cirúrgica da lesão e baseia-se nos resultados funcionais e estéticos esperados. A presença de margens positivas ou profundidade de invasão tumoral superior a 5 mm sugere que uma combinação das duas formas de terapia deve ser considerada para obter melhores resultados. Estágios III (tumores com mais de 4 cm) e IV (invasão de estruturas adjacentes) são os principais desafios. A excisão de linfonodos regionais é feita quando se suspeita terem sido afetados pela neoplasia e feito por rotina nos estágios III e IV.¹⁵⁻¹⁷

Acredita-se que todos os casos de CEL sejam precedidos pela desordem potencialmente maligna denominada queilite actínica (QA), porém a distinção entre os estágios iniciais do CEL e a QA é bastante complexa, pois ambos apresentam aspectos clínicos semelhantes. Além disso, o tempo de evolução de uma QA para o CEL é longo e incerto.¹⁸

A QA, assim como o CEL, afeta pessoas de pele clara, com baixa capacidade de bronzeamento e que se queimam com facilidade. A maioria dos pacientes é de homens a partir da 5ª década de vida.¹⁹

Clinicamente, a QA manifesta-se como um aumento volumétrico em lábio inferior, o qual adquire consistência mais endurecida e apresenta zonas de ressecamento, descamação e mudança de coloração. As linhas verticais do lábio também podem se apresentar mais pronunciadas e associadas a áreas de atrofia, edema, eritema e ulceração. Um dos aspectos mais marcantes desse processo é um limite impreciso e diminuído entre a zona de vermelhão de lábio e a pele da face, característica que está relacionada com um pior prognóstico da lesão.²⁰

Histologicamente, a QA apresenta-se como fragmento de semimucosa revestida por epitélio estratificado pavimentoso para ou ortoqueratinizado com variação na quantidade de queratina. O revestimento epitelial pode apresentar espessura variável de células, podendo conter áreas de atrofia, bem como áreas focais de acantose, e a camada granulosa geralmente encontra-se aumentada e bem evidente. Podem ser notadas, ainda no epitélio, alterações

relacionadas tanto à forma quanto à maturação dos queratinócitos, evidenciando os diferentes graus de displasia. A lâmina própria é composta por tecido conjuntivo denso e mostra faixa de degeneração basofílica das fibras elásticas e colágenas, que corresponde a uma alteração induzida pela radiação UV. Infiltrado inflamatório crônico também está comumente presente na lâmina própria, em variados graus, assim como vasos sanguíneos congestos e dilatados.²¹

As opções de tratamento para QA são diversas e numerosas. A criocirurgia e a eletrodissecção podem ser eficazes para as regiões focais de QA, enquanto terapias tópicas com o 5-fluorouracil e o imiquimod expõem e tratam áreas subclínicas da doença. Tratamentos cirúrgicos mais invasivos como vermelhonetomias e terapia com laser de CO₂, apesar de mais radicais, são altamente eficazes e tendem a ter taxas mais baixas de recorrência da QA.²²

Tanto a QA como o CEL são causados pelos efeitos nocivos da radiação UV agindo diretamente sobre o DNA, por meio do fenômeno da fotocarcinogênese. Nesse processo, a radiação provoca mutações que são capazes de causar a iniciação, progressão e a promoção de neoplasias.^{23,24}

Apenas uma pequena fração da radiação emitida pelo Sol que atinge a superfície da Terra reside na faixa UV. Isso corresponde somente a cerca de 6% do espectro eletromagnético de energia solar.²⁵

A radiação UV consiste de uma faixa de comprimentos de onda que varia de 100 a 400 nm e é dividida em três espectros de radiação: UVC (comprimentos de onda inferiores a 280 nm), UVB (280-315 nm), e UVA (315-400 nm). Fortuitamente, a parte predominante das ondas curtas, de alta energia e destrutivas do espectro de radiação UV, são facilmente filtradas pelo ozônio atmosférico. Isso compreende os comprimentos de onda de até 310 nm (toda radiação UVC e grande parte da UVB). Os demais espectros de UV transmitidos, isto é, uma pequena parte do espectro UVB e UVA, são responsáveis pelos efeitos sobre os tecidos biológicos.^{26,27}

A destruição da camada de ozônio estratosférico, como uma fonte de aumento da exposição aos raios UV, tem sido motivo de preocupação desde os anos 70. Na época, uma série de publicações mostrou que certos gases inertes, como os clorofluorcarbonetos (CFC), liberados na atmosfera por atividades humanas, podem afetar a camada de ozônio. Isso culminou, em 1985, com o relatório de que havia um buraco crescente na camada de ozônio sobre a Antártida. Em reação, o Protocolo de Montreal foi adotado em 1987, levando a uma proibição global sobre a produção de CFC. O ozônio manteve-se em declínio até 1995, mas foi se recuperando lentamente desde então. Esta é uma boa notícia para o futuro, no entanto,

há outra ameaça à camada de ozônio no horizonte, na forma de gases de efeito estufa e as mudanças climáticas. Considerando esse cenário, os profissionais da saúde precisam estar aptos para orientar a prevenção e manejar pacientes com lesões UV-induzidas.²⁸⁻³⁰

Os mecanismos envolvidos no dano de biomoléculas causado por radiação UV são em grande parte devido à absorção direta da luz para formar moléculas mais reativas. O DNA é um dos principais alvos dos danos UV-induzidos em uma variedade de organismos, uma vez que os núcleos celulares são ricos em agentes absorventes de radiação UV, tais como, os ácidos nucleicos e as proteínas cromóforas. O DNA pode absorver os espectros de radiação UVB e UVA promovendo alterações na sua estrutura, o que conduz à instabilidade genética.³¹

Uma série de organismos produzem pigmentos adicionais que absorvem a radiação UV, tal como a melanina, com o intuito de proteger moléculas mais nobres. Existem dois tipos de melanina: a eumelanina, insolúvel, de cor castanha a negra, com ação fotoprotetora e antioxidante; e a feomelanina, solúvel em solução alcalina, de cor amarela a vermelha, igualmente com efeito antioxidante. A eumelanina é muito mais eficaz no bloqueio da radiação UV que a feomelanina.³²

O sistema Fitzpatrick de fototipagem da pele foi criado em 1975 e é utilizado como uma expressão constitutiva da sensibilidade à radiação UV. Este tipo de pele auto-referida é determinado pelo uso de um questionário, onde as pessoas são graduadas a partir da tendência para queimar e capacidade de bronzear respectivamente 24 horas e 7 dias após a primeira exposição solar sem fotoproteção no início do verão. Há quatro respostas possíveis para pessoas de pele "branca" (tipo de pele I, II, III, IV). Pele morena é classificada como tipo de pele V e pele negra como tipo de pele VI (tabela 2.1).³³

Pessoas de pele clara, que são quase sempre sensíveis à radiação UV e têm alto risco de câncer de pele, possuem menor quantidade de eumelanina e, portanto, sofrem muito mais os danos dos raios UV do que os indivíduos de pele mais escura. Na verdade, os níveis de feomelanina são semelhantes entre indivíduos de pele escura e de pele clara, e é a quantidade de eumelanina que determina a cor da pele, a sensibilidade à radiação UV e o risco de câncer. Cada melanócito tem capacidade de sintetizar os dois tipos de melanina. No entanto, nenhum deles podem evitar completamente a radiação UV que chega ao DNA no tecido superficial.³⁴

Tabela 2.1 - Escala de Fitzpatrick para determinação do fototipo de pele

Tipo de pele	Características
I	Sempre queima, nunca bronzeia
II	Sempre queima, bronzeia com dificuldade
III	Às vezes queima, bronzeia gradualmente
IV	Raramente queima, bronzeia com facilidade
V	Queima muito raramente, bronzeia com muita facilidade
VI	Nunca queima, bronzeia com muita facilidade

Vários tipos diferentes de danos ao DNA causados pela radiação UV foram identificados. Contudo, as duas principais classes de mutações são resultantes de ligações covalentes entre bases pirimidina adjacentes — timina-timina ou timina-citosina. Isto conduz à formação dos dímeros de pirimidina ciclobutano e dos fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona.³⁵

Os dímeros de pirimidina ciclobutano surgem quando bases pirimidínicas adjacentes absorvem a energia da radiação UV, formando um anel ciclobutano pela ligação covalente entre os átomos de carbono 5 e 6 de ambas as bases nitrogenadas. No caso do fotoproduto (6-4)-pirimidina-pirimidona, embora também se trate de uma ligação covalente entre pirimidinas da mesma fita, esta não é cíclica e envolve os carbonos 6 e 4 das pirimidinas 5' e 3', respectivamente.³⁶

A ideia mais espontânea e lógica que vem à mente quando se fala de dano ao DNA é o processo de mutagênese e, como consequência, o aumento do risco relacionado à carcinogênese, principalmente quando o acúmulo de mutações afeta os genes relacionados à estabilidade genômica. Na verdade, o papel das mutações em locais em que ocorreram dímeros de pirimidina que foram não reparados é bem estabelecido no caso do gene supressor de tumor *TP53*, em especial nos carcinomas de pele. No entanto, é também importante considerar que outros eventos moleculares, além das mutações, estão envolvidos na iniciação e progressão do câncer.³⁷

Para o desenvolvimento do câncer, a radiação UV deve iniciar dois eventos separados: a transformação neoplásica das células epiteliais e uma infrarregulação sistêmica da resposta imunitária celular. As neoplasias malignas UV-induzidas são altamente imunogênicas e, portanto, rejeitadas por um organismo imunocompetente. Entretanto, a imunossupressão causada pela radiação UVB impede a destruição imunológica destes tumores. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez há quase duas décadas em um modelo murinho no qual tumores induzidos por UVB desenvolveram-se em ratos UVB-irradiados, mas foram rejeitados quando transplantados para um receptor não-irradiado.³⁸⁻⁴⁰

Os mastócitos são células multifuncionais que desempenham um papel importante na inflamação e têm sido associados tanto com a resistência, quanto com uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento de tumores. Estas células estão presentes num grande número de tecidos, incluindo a pele. A prevalência de mastócitos na pele humana é modificado por fatores intrínsecos, como os relacionados aos mecanismos de regulação de c-kit, e extrínsecos, como pela exposição solar crônica.^{41,42}

Em ratos, os mastócitos são críticos para a imunomodulação sistêmica induzida por UVB. Estudo com camundongos com depleção de mastócitos sugeriu que os mastócitos foram fundamentais para imunomodulação induzida por UVB.⁴³

Os tecidos de revestimento, sobretudo a pele e as mucosas, sofrem constante auto-renovação celular. Durante o estado de diferenciação terminal dos queratinócitos, as células se tornam-se achatadas e, frequentemente, desprovidas de núcleo, sendo denominadas de corneócitos. O desprendimento dos corneócitos é contínuo pelo processo natural da descamação epitelial, enquanto são substituídos por meio da proliferação das células da camada basal.⁴⁴

Os genes da família Notch são altamente conservados dentre as diferentes espécies e participam de amplo espectro de processos fisiológicos, incluindo a decisão do destino celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência/apoptose. Assim, Notch e seus ligantes são expressos em vários tecidos, sendo abundantemente expressos na epiderme. A ativação de Notch resulta na promoção da paragem do crescimento e do início da diferenciação, por conseguinte, sugerindo que a ativação específica de Notch pode regular a homeostase da pele através do equilíbrio entre estes processos. Ou seja, a ativação de Notch funciona como um interruptor molecular que controla a transição de células entre as camadas da pele durante o processo de diferenciação epidérmica.⁴⁵

Em 1917, Thomas Morgan demonstrou entalhes nas bordas das asas de *Drosophila melanogaster* quando estudava os mecanismos hereditários mendelianos. Essa característica

fenotípica foi atribuída à haploinsuficiência, fenômeno no qual um dos alelos de um determinado gene é inativado por mutação e o alelo normal restante não é suficiente para manter o fenótipo normal, do gene que posteriormente foi denominado *Notch* (do inglês, notch = entalhe).⁴⁶

Em humanos, são descritos quatro receptores Notch homólogos — Notch1 a 4 — e cinco ligantes transmembrana — Delta 1, 3 e 4 (DLL1, DLL3 e DLL4) e Jagged 1 e 2 (JAG1 e JAG2) —, que exibem diferentes padrões de expressão, sugerindo contribuições diferentes em cada tecido.^{47,48}

Receptores Notch são formados por dois domínios estruturais: um domínio extracelular, o NED (*Notch extracellular domain*) e outro intracelular, o NICD (*Notch intracellular domain*). O NED é formado por um domínio de 29-36 repetições curtas consecutivas do fator de crescimento epidérmico (EGF – do inglês, *epidermal growth factor*), essencial para que haja uma interação eficiente entre receptores e ligantes. Esse domínio está associado a três repetições de unidades ricas em cisteína (LIN), que parecem inibir a via de sinalização Notch quando os ligantes não estão presentes.⁴⁸

O NICD apresenta dois grandes domínios de interação proteica. O primeiro é formado por seis repetições curtas consecutivas de anquirina intercaladas às unidades de sinais de localizações nucleares. Esse complexo contém também um segmento de domínio RAM (R). Um segundo domínio é constituído por uma região de transativação (TAD) – ainda não definido para os receptores Nocth3 e 4 – conectado a uma sequência PEST (P).^{48,49}

A ativação da via Notch ocorre por meio de interação receptor-ligante exclusivamente entre células adjacentes. Tal interação resulta na clivagem do domínio extracelular do receptor Notch (NED) pela ação de uma metaloproteinase, a TACE (do inglês, *tumour necrosis factor α converting enzyme*). O fragmento clivado sofre endocitose pela célula que expressa o ligante, induzindo uma segunda clivagem, desta vez, do domínio intracelular do receptor Notch (NICD). Essa segunda clivagem ocorre graças à ação de um complexo enzimático denominado gama-secretase, formado por presenilinas, nicastrina, APO1 e PEN2 e resulta na liberação do domínio intracelular do receptor Notch (NICD), que migra para o núcleo da célula e age como um co-ativador transcricional.^{48,49}

O domínio intracelular do receptor Notch (NICD) é considerado um co-ativador transcricional porque não pode se ligar diretamente ao DNA. Ele forma um dímero com a proteína CSL que está, agora sim, ligada ao DNA. Dessa forma, são ativados os genes-alvo, tais como: Hes1, Herp1 e Herp2. Esta não é a única via transcricional dependente da sinalização Notch.^{50,51}

A via de sinalização Notch é altamente conservada durante a evolução e regula uma série de propriedades celulares.^{51,52} Sua atividade afeta a diferenciação, proliferação e apoptose, que controlarão um grande número de processos de desenvolvimento, tais como: a neurogênese, a hematopoiese, a vasculogênese e o crescimento e diferenciação de queratinócitos.^{53,54}

A epiderme é composta de várias camadas de queratinócitos – a camada basal, espinhosa, granular e a camada córnea, definidas de baixo para cima a partir da lâmina basal – que estão em vários estágios de diferenciação terminal. Dentro da camada basal, as células-tronco epidérmicas se dividem para auto-renovar e produzir células amplificadoras transientes, que possuem uma capacidade proliferativa mais limitada. Na fase inicial de diferenciação, estas células param a proliferação, separam-se da membrana basal subjacente e migram para dentro das camadas espinhosas e granulares. Concomitante com esta migração, queratinócitos começam a expressar proteínas marcadoras, como citoqueratina 1, citoqueratina 10 e involucrina na camada espinhosa, e filagrina e loricrina na camada granular. Em última análise, uma série complexa de alterações morfológicas e bioquímicas resultam na produção da camada córnea, o estrato córneo. Este processo de diferenciação da epiderme necessita de coordenação exata dos eventos moleculares que levam à geração de um epitélio estratificado. Uma grande quantidade de trabalhos têm destacado papéis importantes para muitas moléculas, incluindo Notch e seus ligantes.^{55,56}

A expressão de Notch1, Notch2 e Notch3 em pele de rato e em folículos pilosos já foi relatada e a via de sinalização Notch parece ter papel importante na regulação da diferenciação epidérmica.⁵⁷⁻⁵⁹

Notch1 desencadeia a diferenciação de queratinócitos murinos e humanos *in vitro* e, tem o potencial de estimular tanto o crescimento quanto a inibição dessas células.^{53,56}

Na epiderme humana, Notch1 é expresso em todas as camadas da epiderme, enquanto Notch2 é expresso na camada basal. Na epiderme de rato, no entanto, Notch1 é expresso mais fortemente na camada espinhosa e Notch2 também tem expressão na camada espinhosa, mas não na camada basal. Ligantes Notch, como membros da família Jagged e Delta-like, são expressos em padrões de sobreposição com Notch na epiderme tanto de humanos, quanto de camundongos.^{53,60}

Devido a sua participação em processos regulatórios em um grande número de tecidos, não é de surpreender que alterações moleculares com ganho ou perda de função de componentes da via de sinalização Notch estejam envolvidas em diferentes tipos de cânceres hematológicos e sólidos.

Embora ainda existam inconsistências nas descrições a respeito da expressão de Notch em cânceres humanos, há dados que sugerem que a via de sinalização Notch possa atuar tanto como promotor quanto como supressor tumoral, dependendo do tipo de célula e/ou tecido envolvido, bem como do nível de expressão das proteínas e de potenciais interferências com outras vias de sinalização.^{61,62}

Na pele, Notch1 tem um papel na promoção da diferenciação de queratinócitos. Carcinoma de células basais em humanos mostra uma redução na expressão de Notch1, Notch2 e Jagged1, o que sugere que a perda de sinalização de Notch na epiderme poderia levar ao desenvolvimento de carcinoma de células basais. Coerente com isso, a supressão da expressão Notch1 em pele de ratos resulta em desenvolvimento espontâneo de carcinoma basocelular.^{63,64}

A exposição excessiva à radiação UV pode levar ao desenvolvimento de câncer de pele. Estudos demonstram que os mastócitos desempenham um papel chave em todo este processo carcinogênico. Inicialmente, a radiação UV recruta mastócitos para a pele e os ativam para que haja liberação de seus mediadores inflamatórios e supressores imunitários. A radiação UV também estimula mastócitos a produzir fatores de remodelação tecidual e fatores pró-angiogênicos, que facilitam o crescimento, a sobrevivência e diferenciação das células neoplásicas.^{65,66}

O desenvolvimento e remodelação vascular envolve uma série de processos complexos, e a via de sinalização Notch tem demonstrado ser decisiva nesse processo. Dois ligantes Notch, Jagged1 e Delta 4, são proeminentemente expressos nos vasos.^{67,68}

As proteínas Notch1 e Notch2 são constitutivamente expressas na superfície de mastócitos murinos durante o processo de desenvolvimento. A proteína do ligante Jagged1 também é expressa em mastócitos de rato, porém restrita, principalmente, à células em fase final de maturação.⁶⁹

Recentemente, Notch1 foi estudado na carcinogênese oral, em trabalho que analisou tanto desordens potencialmente malignas quanto carcinoma epidermoide, ambos intraorais. Os autores sugeriram que a redução da expressão de Notch1 está relacionada com a diferenciação aberrante nessas lesões, o que revelaria uma função essencial desta proteína na manutenção da integridade do epitélio normal.⁶¹

A expressão de Notch1 foi também analisada em carcinomas de pele. Achados recentes mostraram expressão variável do Notch1 em lesões potencialmente malignas (queratose solar) e em câncer de pele (carcinoma epidermoide e carcinoma basocelular) dependendo da localização anatômica e histologia da neoplasia. Assim, enquanto que no

carcinoma epidermoide de pele em áreas expostas ao sol Notch1 é regulada negativamente e sugere uma função supressora de tumor do receptor, no carcinoma epidermoide em áreas protegidas do sol, Notch1 foi regulada positivamente.⁷⁰

Entretanto, a participação da sinalização Notch em câncer de lábio ainda é desconhecida. Para este fim, este estudo visa investigar se a via Notch está relacionada às lesões de queilite actínica e de carcinoma epidermoide de lábio e sua participação na fotocarcinogênese bucal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a participação da via de sinalização Notch na fotocarcinogênese oral.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a distribuição e a intensidade da expressão imuno-histoquímica do receptor Notch1 em casos de queilite actínica (QA) com diferentes graus de displasia epitelial (discreta, moderada e intensa), em casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e no epitélio do vermelhão do lábio com aspectos usuais de normalidade;
- Avaliar a distribuição e a intensidade da expressão imuno-histoquímica do ligante Jagged1 em casos de QA com diferentes graus de displasia epitelial, em casos de CEL e no epitélio do vermelhão do lábio com aspectos usuais de normalidade;
- Comparar nos diferentes grupos os padrões de marcação encontrados para cada um dos marcadores utilizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (Anexo A).

4.1 Seleção de casos e amostras teciduais

Para este estudo foram selecionados, a partir dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP, os casos de lesões no vermelhão do lábio com diagnóstico histológico de “queilite actínica” (QA) e “carcinoma epidermoide” (CEL).

A partir das lâminas coradas por hematoxilina e eosina (HE) recuperadas dos arquivos, foram analisados os aspectos morfológicos e o grau de displasia epitelial dos casos de QA avaliados, conforme item abaixo. Todos os casos de QA e CEL selecionados para este trabalho apresentavam elastose solar (ou degeneração basofílica do colágeno), sinal que demonstra a absorção de radiação ultravioleta pelos tecidos.

Após a graduação histológica e recuperação dos blocos de parafina, foram selecionados 15 casos de QA com cada um dos três graus de displasia epitelial (discreta, moderada, intensa) e cujos blocos de parafina continham material suficiente para a realização da pesquisa sem seu esgotamento. Foram também selecionados 15 casos de CEL e 5 amostras de outras lesões de vermelhão de lábio cujo corte histológico continha epitélio com aspectos usuais de normalidade para a região, que serviram de padrão de marcação para o lábio normal (LN).

4.2 Análise morfológica

A análise morfológica dos casos de QA e de CEL selecionados foi feita pela observação em microscopia de luz de cortes de 5 µm corados por HE. As lesões de queilite actínica foram analisadas individualmente afim de determinar o grau de displasia epitelial. A

graduação das displasias foi realizada por dois pesquisadores separadamente e, nos casos em que houve discordância, foi feita uma nova análise com os dois pesquisadores juntos e o grau de displasia final foi determinado por um acordo das partes.

O grau de displasia epitelial foi determinado utilizando-se os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁷¹:

Alterações arquiteturais:

- Estratificação irregular do epitélio;
- Perda da polaridade das células basais;
- Cristas epiteliais em forma de gota;
- Aumento do número de figuras mitóticas;
- Mitoses superficiais atípicas;
- Queratinização prematura das células individuais (disqueratose);
- Pérolas de queratina em projeções epiteliais.

Alterações citológicas:

- Alteração no tamanho do núcleo (anisonucleose);
- Alteração na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear);
- Alteração no tamanho da célula (anisocitose);
- Alteração na forma da célula (pleomorfismo celular);
- Alteração na relação núcleo/citoplasma;
- Núcleo com tamanho aumentado;
- Figuras de mitoses atípicas;
- Aumento no número e tamanho dos nucléolos;
- Hiperchromatismo.

A seguir, cada caso foi classificado de acordo com a proposta da OMS⁷¹:

- Displasia epitelial discreta: alteração da arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio com presença de atipia citológica;
- Displasia epitelial moderada: alteração da arquitetura epitelial estendendo-se ao terço médio. A análise do grau de atipia citológica pode aumentar o grau de displasia;
- Displasia epitelial intensa: mais de 2/3 do epitélio com alteração da arquitetura epitelial associado à atipias citológicas.

4.3 Estudo imuno-histoquímico

Foram realizadas reações imuno-histoquímicas para cada caso selecionado pela técnica da estreptavidina-biotina utilizando como marcador os anticorpos anti-Notch1, clone EP1238Y e anti-Jagged1, clone EPR4290 (Abcam, Cambridge, MA, USA), seguindo-se as especificações do fabricante e de acordo com a metodologia descrita a seguir.

Cortes de 3µm de espessura das amostras selecionadas e das amostras controle foram obtidos dos blocos de parafina originais dos espécimes fixados em formol e foram estendidos em lâminas previamente tratadas pelo 3-aminopropiltietoxisilano para aumento da aderência do corte.

As lâminas contendo os cortes seguiram para desparafinização em dois banhos de xilol, sendo o primeiro de 30 minutos e o segundo de 15 minutos, ambos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram submetidas à reidratação em cadeias descendentes de etanóis e prontamente seguiram para incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 05 minutos, para a remoção do pigmento formólico.

Na sequência foi realizada a lavagem das lâminas em água destilada e estas receberam os tratamentos para a recuperação dos sítios antigênicos com solução de EDTA 1mM, pH9,0 por 30 minutos em banho-maria a 95°C.

Posteriormente, as lâminas foram submetidas a uma nova lavagem em água destilada e seguiram para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual por meio da incubação em dois banhos de 15 minutos em uma solução 1:1 (v/v) de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol.

As lâminas foram lavadas em água destilada novamente e foram imersas em solução tampão de Tris (Tris 50mM, NaCl 150mM) pH7,6 em três banhos de 03 minutos cada, e, posteriormente, seguiu a incubação dos anticorpos primários diluídos em Tris e acrescidos de albumina bovina (BSA) 1%, na proporção de 1:100 para ambos os anticorpos. A incubação foi realizada por 18 horas a 4°C.

Todos os procedimentos posteriores foram precedidos de banhos em solução tampão de Tris.

Para incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o kit LSAB plus (DAKO, Carpinteria, CA, USA). As reações foram reveladas pela diaminobenzina (DAKO Liquid DAB+, K3468) por meio da incubação das lâminas por 10 minutos e, após lavagem em solução tampão de Tris e água destilada para remoção dos excessos, os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Mayer.

Em seguida, foram realizadas novas lavagens em água corrente e destilada, e as lâminas passaram por banhos em cadeia crescente de etanóis, desidratadas em xilol, montadas com utilização de resina e lamínulas e examinadas em microscópio de luz.

Foram consideradas positivas apenas as células que exibiram coloração acastanhada na membrana e no citoplasma, confirmando a expressão imuno-histoquímica para o anticorpo anti-Notch1 e para o anticorpo anti-Jagged1. A marcação de interesse foi visualizada nos queratinócitos da região epitelial, bem como no corpo da lesão, nos casos de carcinoma epidermoide.

4.4 Avaliação dos resultados

As lâminas submetidas ao estudo imuno-histoquímico foram avaliadas por dois observadores independentes.

A avaliação da imunomarcação das proteínas Notch1 e Jagged1 foi realizada a partir do padrão de expressão das células marcadas positivamente, determinadas pela coloração acastanhada, levando em consideração a quantidade de proteína expressa pela intensidade da coloração, divididas em forte ou fraca.

A expressão imuno-histoquímica do receptor Notch1 e do ligante Jagged1 foi identificada na membrana e no citoplasma dos queratinócitos, e também nos mastócitos e nos vasos sanguíneos.

A presença e a distribuição de cada uma das proteínas estudadas neste trabalho – Notch1 e Jagged1 – foi analisada isoladamente para cada um dos casos em queratinócitos.

A expressão de Notch1 foi considerada positiva quando se visualizou coloração marrom na membrana e no citoplasma dos queratinócitos. Foram estabelecidas duas categorias de expressão:

- Negativo (ausência de marcação celular);
- Região basal (células da camada basal e até $\frac{1}{3}$ da camada espinhosa, sendo que para os casos de CEL foram consideradas as células da camada mais externa e até $\frac{1}{3}$ da camada mais interna).

Baseado na intensidade de marcação, o grau de intensificação atribuído para o receptor Notch1 foi dividido em um sistema subjetivo de escores classificando as imunomarcações em ausente, fraca ou forte.

A avaliação da expressão do anticorpo anti-Jagged1 foi realizada pela determinação da coloração em membrana e citoplasma dos queratinócitos. Os padrões distintos de marcação para Jagged1 permitiu que os casos fossem agrupados nos seguintes padrões de expressão:

- Marcação das células da camada basal e até $\frac{1}{2}$ da camada espinhosa, sendo que para os casos de CEL foram consideradas as células da camadas mais externa e até $\frac{1}{2}$ da camada mais interna;
- Marcação das células da camada basal e até $\frac{3}{4}$ da camada espinhosa, sendo que para os casos de CEL foram consideradas as células da camadas mais externa e até $\frac{3}{4}$ da camada mais interna;

Baseado na intensidade de marcação, a intensidade de marcação para o ligante Jagged1 foi dividido em um sistema subjetivo de escores classificando as imunomarcações em fraca ou forte.

Os achados para a expressão imuno-histoquímica de Notch1 e Jagged foram comparados entre as lesões de queilite actínica (QA) e os casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL), bem como entre os casos com aspectos usuais de normalidade (LN).

Foi realizada uma comparação do padrão de expressão para a região epitelial e para as ilhotas e cordões neoplásicos a partir da marcação imuno-histoquímica das proteínas Notch1 e Jagged1 em queratinócitos entre as amostras de QA com displasia epitelial discreta, QA com displasia epitelial moderada, QA com displasia epitelial intensa, CEL e LN.

Comparou-se também, a quantidade de proteína avaliadas a partir da intensidade de marcação entre os casos de QA com displasia epitelial discreta, QA com displasia epitelial moderada, QA com displasia epitelial intensa, CEL e LN avaliados por meio da técnica de imuno-histoquímica para o anticorpo anti-Jagged1 e Notch1.

5 RESULTADOS

Para este estudo foram selecionados, a partir dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP, casos de lesões no vermelhão do lábio que receberam o diagnóstico histológico de “queilite actínica” (QA) e “carcinoma epidermoide” (CEL). Um total de 60 casos de lesões de lábio, sendo 15 casos de QA com displasia epitelial discreta, 15 casos com displasia epitelial moderada, 15 com displasia epitelial intensa e 15 CEL, foram selecionados para compor a amostra deste trabalho. Foram selecionados ainda, 05 amostras com aspectos usuais de normalidade que continham epitélio de semimucosa do vermelhão do lábio sem alterações morfológicas, compatíveis com lábio normal.

5.1 Análise morfológica

A análise morfológica dos 15 casos de CEL deste estudo revelou que as lesões eram caracterizadas pela proliferação de queratinócitos atípicos, organizados em ilhas e cordões de tamanhos variados, que invadiam o tecido conjuntivo. As células neoplásicas apresentavam-se poliédricas, volumosas, de limites precisos, exibindo citoplasma amplo e claro, além de núcleos redondos ou ovais centrais com cromatina frouxa. Individualmente, as células neoplásicas exibiam importante pleomorfismo celular e nuclear. Na maioria das vezes notou-se pérolas de queratina de tamanhos variados. O estroma da lesão era composto por tecido conjuntivo denso em que se pode notar, na maior parte dos casos, intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Todos os casos exibiram degeneração basofílica do colágeno (ou elastose solar) sendo que por vezes era evidente apenas em áreas focais e em outras lesões estendia-se por todo o corte (Figura 5.1).

Os casos de queilite actínica (QA) eram caracterizados morfológicamente por fragmento de semimucosa labial revestida por epitélio estratificado pavimentoso ora paraqueratinizado, ora ortoqueratinizado com variação na quantidade de queratina. O revestimento epitelial exibia espessura variável de células. Por vezes eram observadas áreas de atrofia, bem como áreas focais de acantose, e a camada granulosa geralmente encontrava-se aumentada e bem evidente. Notou-se, ainda no epitélio, alterações relacionadas tanto à

forma quanto à maturação dos queratinócitos, evidenciando os diferentes graus de displasia. A lâmina própria era composta por tecido conjuntivo denso e todos os casos mostraram faixa de elastose solar (ou degeneração basofílica das fibras elásticas e colágenas). Após a determinação dos graus de displasia, foram selecionados 15 casos de QA com cada um dos três graus de displasia epitelial (discreta, moderada, intensa) (Figura 5.2).

Figura 5.1 - Carcinoma epidermoide de lábio caracterizado pela proliferação e invasão de queratinócitos atípicos no tecido conjuntivo subjacente. Pérolas córneas de diferentes tamanhos e estroma com intenso infiltrado inflamatório mononuclear podem ser notados. HE (100X no original).

Figura 5.2 - Aspectos histológicos das lesões de quelite actínica. Quelite actínica com displasia epitelial discreta exibindo ampla faixa de elastose solar (A). Lesão de quelite actínica com displasia epitelial moderada, exibindo estratificação irregular do epitélio e pleomorfismo celular (B). Displasia epitelial intensa em lesão de quelite actínica apresentando disqueratose e projeções afiladas em direção ao tecido conjuntivo (C). Alterações arquiteturais e citológicas em lesão de quelite actínica com displasia epitelial intensa (D). HE A, B e C (100X no original) e D (400X no original).

5.2 Imuno-histoquímica

O padrão de expressão imuno-histoquímica do receptor Notch1 e do ligante Jagged1 foi identificada na membrana e no citoplasma dos queratinócitos. Entretanto, a distribuição de expressão de cada uma das proteínas mostrou-se distinta quando analisadas nas diferentes camadas do epitélio e, nos casos de CEL, nas diferentes camadas das ilhotas e cordões neoplásicos. Vale ressaltar que todos os casos negativos em queratinócitos tiveram controles internos positivos.

5.2.1 Notch1

Todos os casos de QA deste estudo mostraram positividade para o Notch1 e a distribuição foi a mesma para as amostras do trabalho, independentemente do grau de displasia epitelial. A marcação positiva foi observada na região basal do epitélio, que compreende as camadas basal e parabasal, ou seja, as camadas mais baixas do estrato espinhoso do epitélio de superfície (Figura 5.3).

Dos 15 casos de CEL deste estudo, 9 (60%) mostraram-se positivos para a marcação de Notch1, sendo que a localização da proteína foi na camadas mais externas das ilhotas neoplásicas.

Todos casos de LN foram positivos para a proteína Notch1. O padrão de marcação foi semelhante em todas as amostra e abrangia as camadas basal e parabasal, isto é, a região basal do epitélio.

Observamos ainda, uma forte imunoexpressão para o receptor Notch1 em mastócitos presentes em todos os casos de QA e uma marcação fraca em vasos sanguíneos em todas as amostras, incluindo os casos controle (Figura 5.4).

Neste trabalho avaliou-se a intensidade da marcação, como um indicativo da quantidade de proteína presente. A Tabela 5.1 mostra os resultados para a intensidade da marcação em todos os casos do estudo.

Tabela 5.1 - Intensidade de marcação da proteína Notch1 em lesões labiais fotoinduzidas e em lábio normal

Casos	Ausente n (%)	Fraca n (%)	Forte n (%)
QA			
Displasia epitelial discreta	0 (%)	7 (46,7%)	8 (53,3%)
Displasia epitelial moderada	0 (0%)	2 (13,3%)	13 (86,7%)
Displasia epitelial intensa	0 (0%)	8 (53,3%)	7 (46,7%)
CEL	6 (40%)	2 (13,3%)	7 (46,7%)
LN	0 (0%)	4 (80%)	1 (20%)

n = total de casos

QA: Queilite actínica; CEL: Carcinoma epidermoide de lábio; LN: Lábio normal.

Figura 5.3 - Lesão de queilite actínica mostrando expressão da proteína Notch1 em região basal do epitélio (A). Detalhe da expressão de Nocth1 em camada basal e parabasal do epitélio (B). Imuno-histoquímica anti-Notch1. A (100X no original) e B (400X no original).

Figura 5.4 - Lesão de queilite actínica exibindo forte imunomarcção da proteína Notch1 em mastócitos e marcação fraca em vasos sanguíneos. Imuno-histoquímica anti-Notch1 (400X no original).

5.2.2 Jagged 1

Todos os casos de QA foram positivos para a proteína Jagged1. Dois padrões de marcação foram evidenciados: o primeiro, no qual a positividade foi observada desde a camada basal até a metade do epitélio, ocorreu em 66,7% (10 casos) das QA com displasia discreta, 53,3% (8 casos) das QA com displasia moderada e 60% (9 casos) das QA com displasia intensa. O segundo padrão mostrou positividade desde a camada basal até o final da camada espinhosa, deixando livres de marcação as camadas granulosa e córnea. Este segundo padrão foi observado em 33,3% (5 casos) das QA com displasia discreta, 46,7% (7 casos) das QA com displasia moderada e 40% (6 casos) das QA com displasia intensa (Figura 5.5).

Todos os casos de CEL foram positivos para a Jagged1. Da mesma forma que para a QA, foram observados dois padrões de marcação: o primeiro, presente em 60% (9 casos) dos casos, revelou apenas as camadas mais externas das ilhotas positivas; enquanto o segundo,

observado em 40% (6 casos) dos casos, revelou positividade desde a camada mais externa até a camada mais interna das ilhotas neoplásicas, deixando livre a marcação das pérolas de queratina.

Todos os casos do grupo LN foram positivos para a proteína Jagged1 e exibiram um único padrão de marcação das camadas epiteliais, o qual evidenciava a positividade nas células da camada basal até a metade do epitélio.

Jagged1 foi fortemente expresso em vasos sanguíneos de todas as amostras, incluindo os casos LN e os casos de QA demonstraram ainda, forte marcação da proteína Jagged1 em mastócitos (Figura 5.6).

A Tabela 5.2 mostra a intensidade da marcação da reação de imuno-histoquímica, como um sugestivo da quantidade de proteína presente.

Tabela 5.2 - Intensidade de marcação da proteína Jagged1 em lesões labiais fotoinduzidas e em lábio normal

Casos	Ausente n (%)	Fraca n (%)	Forte n (%)
QA			
Displasia epitelial discreta	0 (%)	6 (40%)	9 (60%)
Displasia epitelial moderada	0 (0%)	0 (0%)	15 (100%)
Displasia epitelial intensa	0 (0%)	5 (33,3%)	10 (66,7%)
CEL	0 (0%)	9 (60%)	6 (40%)
LN	0 (0%)	1 (20%)	4 (80%)

n = total de casos

QA: Queilite actínica; CEL: Carcinoma epidermoide de lábio; LN: Lábio normal.

Figura 5.5 - Lesão de queilite actínica exibindo marcação fraca das células da camada basal e até metade da camada espinhosa (A). Queilite actínica mostrando forte positividade das células basais e até o final da camada espinhosa. (B). Imuno-histoquímica anti-Jagged1 (400X no original).

Figura 5.6 - Lesão de queilite actínica exibindo forte imunomarcagem da proteína Jagged1 em mastócitos e em vasos sanguíneos. Imuno-histoquímica anti-Jagged1 (400X no original).

6 DISCUSSÃO

A exposição a longo prazo à radiação solar é o fator etiológico no desenvolvimento do carcinoma epidermoide de lábio (CEL), por meio do fenômeno da fotocarcinogênese. Esse tipo de câncer é o mais comum em vermelhão de lábio e, usualmente, o lábio inferior é o local mais afetado, uma vez que essa região recebe consideravelmente mais luz solar direta do que o lábio superior. Acredita-se que todos os casos de CEL desenvolvam-se a partir de lesões precursoras características, as queilites actínicas (QA). Porém, a progressão das lesões é variável e a ação direta da radiação ultravioleta sobre o DNA das células está relacionada à modificações moleculares e nas vias de sinalização das células e tecidos.⁷²

O presente trabalho propôs-se a analisar se a expressão da proteína de dois componentes fundamentais da via de sinalização Notch, ou seja, Notch1 e Jagged1, é alterada pela radiação UV. Para tanto, procedeu-se à análise morfológica e imuno-histoquímica de lesões labiais UV induzidas e também de epitélio de vermelhão de lábio com aspectos usuais de normalidade (LN).

Não são poucos os estudos que destacam a participação da via Notch em uma ampla variedade de processos celulares, incluindo a diferenciação, a proliferação, a angiogênese, a apoptose e as decisões de destino celular, que são de grande importância para a organogênese e homeostase do tecido e que estão envolvidos na carcinogênese.^{51,53,73-77}

Todos os casos de QA deste estudo, independentemente do grau de displasia epitelial, foram positivos para o Notch1. A distribuição da marcação entre as células epiteliais abrangia, apenas, a região basal do epitélio, ou seja, as camadas mais baixas do estrato espinhoso do epitélio de superfície. Dos 15 casos de CEL deste estudo, 9 casos (60%) mostraram-se positivos para a marcação de Notch1, sendo que a localização da proteína foi na camadas mais externas das ilhotas neoplásicas. Todos casos de LN foram positivos para a proteína Notch1 e exibiram um padrão semelhante de marcação em região basal.

Relatos prévios haviam documentado a expressão da proteína Notch1 em ambas as camadas basais e parabasais da pele e do colo do útero, bem como na camada parabasal da córnea.⁷⁸⁻⁸⁰ Outro estudo, no entanto, demonstrou a expressão dominante de Notch1 em células basais do epitélio e suas neoplasias. Tais autores sugeriram, com base no padrão de expressão encontrado, que Notch1 é ativado seletivamente na célula basal quando a célula-irmã se divide apicalmente, e atua de modo a conduzir a célula basal para permanecer como uma célula basal, enquanto que a célula-filha apical, sem o sinal de Notch é conduzida para

diferenciação. Quando a célula-irmã se divide lateralmente, Notch é ativada em ambas as células, direcionando-as para serem células basais. Se sinalização Notch assimétrica é prejudicada, e as células-filhas basais e apicais sofrem ativação de Notch, ambas permaneceriam como células basaloideas, causando a expansão da camada de células basais. As células com expressão reduzida Notch1 podem converter-se em células ativadas que conduzem a um fenótipo hiperplásico. Em ambos os casos, a sinalização deficiente Notch provoca um epitélio imaturo.⁶¹

As nossas observações a cerca do padrão de marcação de Notch1 em região basal em lesões com displasia epitelial e em epitélio labial com aspectos usuais de normalidade, bem como nas células mais externas das ilhotas neoplásicas sugerem que esta proteína é um marcador de queratinócitos basais, entretanto alterações moleculares imperceptíveis à técnica imuno-histoquímica podem causar os diferentes comportamentos clínicos das amostras. O fenótipo maligno e mais agressivo das lesões de CEL podem estar relacionados à ausência de Notch1 em queratinócitos neoplásicos.

Para o ligante Jagged1, obtivemos uma expressão positiva em todos os casos de QA, CEL e também nos casos de LN. No entanto, o padrão de marcação nas células epiteliais diferiu entre os casos. Para os casos de QA, independente do grau de displasia epitelial, dois padrões de marcação para a proteína Jagged1 foram evidenciados: o primeiro, e mais prevalente, no qual a positividade foi observada desde a camada basal até a metade do epitélio. O segundo padrão mostrou positividade desde a camada basal até o final da camada espinhosa, deixando livres de marcação as camadas granulosa e córnea. Da mesma forma que para a QA, foram observados dois padrões de marcação para as amostras de CEL: o primeiro, presente em 60% dos casos, revelou apenas as camadas mais externas das ilhotas positivas; enquanto o segundo, revelou positividade desde a camada mais externa até a camada mais interna das ilhotas neoplásicas. Já o grupo LN, todos os casos foram positivos para a proteína Jagged1 e exibiram um único padrão de marcação das camadas epiteliais, o qual evidenciava a positividade nas células da camada basal até a metade do epitélio.

Apesar de exibir dois padrões distintos de marcação, o ligante Jagged1 foi expresso proeminentemente nas camadas parabasais do epitélio de todas as amostras, o que sugere, com base no exposto anteriormente, que o sinal da via Notch é transmitido a partir de uma célula apical para uma célula basal devido a localização das células que expressam o ligante (Jagged1) e das que expressam o receptor (Notch1). No entanto, Jagged1 também foi expresso em células basais, e o significado da coexpressão do receptor (Notch1) e do ligante (Jagged1) nas células basais está ainda a ser elucidado. Algumas evidências indicam que os

ligantes canônicos de Notch, assim como Jagged1, possam agir também como um supressor celular autônomo da sinalização de Notch, sugerindo que a expressão Jagged1 nas células basais podem inibir a sinalização.⁸¹⁻⁸⁶

O padrão de marcação das células epiteliais de amostras de QA e de LN sugere que o ligante Jagged1 está relacionado com o grau de diferenciação das células, embora sua expressão em células basais tenha sido presente em todas as amostras. A presença da proteína Notch1 em células basais pode, em parte, estar relacionada a um comportamento biológico mais agressivo, uma vez que foi predominante expressa nas células mais externas dos casos de CEL.

Em relação a intensidade da marcação, o receptor Notch1 foi fortemente expresso em 8 casos (53,3%) de QA com displasia epitelial discreta e em 13 casos (86,7%) de QA com displasia epitelial moderada. Para os casos de QA com displasia epitelial intensa, 53,3% (8 casos) exibiram marcação fraca. Nas amostras de CEL, 40% (6 casos) foram negativos para a expressão da proteína Notch1, enquanto dos casos positivos, 7 casos (46,7%) exibiram marcação forte. No grupo LN, 80% dos casos mostraram fraca positividade para o receptor Nocth1.

Recentemente, os mecanismos subjacentes às propriedades de desenvolvimento do câncer de pele em células Notch1 deficiente foram analisados em ratos. Resultados desta investigação, obtidos pela exclusão de Notch1, indicam que a perda de Notch1 não é importante para o evento inicial do desenvolvimento do câncer de pele.^{87,88} No entanto, foi demonstrado que a perda de Notch1 atua como um evento no desenvolvimento do câncer de pele. Acredita-se que principal efeito da perda de Notch1 no desenvolvimento do câncer de pele é apoiar as células iniciadas com um sinal proliferativo para promover o crescimento do tumor e proceder ao câncer de pele invasivo.⁵³ Tem sido especulado que este sinal proliferativo está relacionado à perda de Notch1 e pode ser liberado de dentro das células iniciadas, apoiando o papel de Notch1 como um supressor de tumor nos queratinócitos epidérmicos.⁶³ Como uma via alternativa, foi levantada a hipótese de que este sinal pode ser enviado pelo microambiente da pele para reagir com a perda de Notch1 na epiderme.⁸⁹⁻⁹² Estes resultados ressaltam a importância do microambiente como um contribuinte ativo para o desenvolvimento do tumor, demonstrando que este pode ser a principal fonte de sinais de proliferação para células iniciadas.⁹³ Isto sugere que a regulação negativa da expressão de Notch1 é um mecanismo inerente para comutar o epitélio a partir de um estado normal e maduro para um estado ativado e imaturo.

Os resultados sugerem, por fim, que as funções de Notch1 estejam relacionadas à regulação do equilíbrio entre populações de células basais e células diferenciadas no epitélio normal e em condições patológicas, tais como no câncer, a sua expressão é reduzida, o que converte as células a um estado ativado e imaturo.

A intensidade da marcação da reação de imuno-histoquímica para o ligante Jagged1 em lesões de QA foi predominantemente forte em todas as amostras, independente do grau de displasia epitelial. Para os casos de CEL, 60% (9 casos) mostraram marcação fraca para a proteína Jagged1. Nos casos de LN, 4 casos (80%) foram fortemente marcados para o ligante Jagged1.

A predominância de fraca expressão do ligante Jagged1 em lesões de CEL, como um sugestivo da quantidade de proteína, apoiam que a expressão reduzida de Jagged1 está relacionada a um fenótipo mais agressivo das lesões epiteliais.

Como observado em estudo prévio, Notch1 foi fracamente expresso nas células endoteliais vasculares em todas as amostras, incluindo os casos controle.⁶¹ Já o ligante Jagged1 foi intensamente marcado em vasos sanguíneos de todas as amostras, incluindo os casos controle. Sabe-se que o desenvolvimento e remodelação vascular envolve uma série de processos complexos, e a via de sinalização Notch tem demonstrado ser decisiva nesse processo por meio da expressão proeminente nos vasos sanguíneos de dois ligantes canônicos, Jagged1 e Delta 4.^{67,68}

Já foi demonstrado que proteínas Notch1 e Notch2 são constitutivamente expressas na superfície de mastócitos murinos durante o processo de desenvolvimento. Já a proteína do ligante Jagged1 também é expressa em mastócitos de rato, porém restrita, principalmente, à células em fase final de maturação.⁶⁹ A partir de nossas análises, notou-se expressão de Notch1 em mastócitos em 100% dos casos de QA. O mesmo foi encontrado para o ligante Jagged1.

Nossos resultados parecem demonstrar a importância da via de sinalização Notch para as características de crescimento de queratinócitos humanos não malignos e malignos a partir dos padrões distintos de expressão da proteína Notch1 e do seu ligante Jagged1 em queratinócitos epiteliais e neoplásicos. Entretanto, os nossos resultados não apontam a uma regulação diferencial da intensidade de expressão das proteínas Notch1 e Jagged1 em lesões UV induzidas e em lábio normal. Logo, nossos achados laboratoriais não suportam a hipótese de que a expressão alterada de Notch1 ou Jagged1 pode estar envolvida na fotocarcinogênese de lábio ou podem ser importante para as características de desenvolvimento destas lesões.

Nossos resultados não permitem uma conclusão definitiva sobre o papel de Notch1 ou Jagged1 para fotocarcinogênese de lábio. Outros fatores importantes que influenciam o papel da sinalização Notch para fotocarcinogênese, incluindo a relevância do microambiente como um contribuinte ativo para o desenvolvimento do tumor por representar a principal fonte de sinais de proliferação de células iniciadas.

7 CONCLUSÕES

- A ausência de marcação de Notch1 nos queratinócitos de 40% dos carcinomas epidermóides de lábio, sugerem que a expressão reduzida de Notch1 pode converter os queratinócitos a um estado ativado e imaturo;
- A diferença nos padrões de marcação de Nocth1 e Jagged1 sugerem que o sinal da via Notch seja transmitido a partir de uma célula apical para uma célula basal devido a localização das células que expressam o receptor e das que expressam o ligante. No entanto, o significado da co-expressão de Nocth1 e Jagged1 nas células basais ainda deve ser esclarecido;
- Os resultados imuno-histoquímicos não apontam a uma regulação diferencial da expressão da proteína Notch1 e Jagged1 em lesões UV induzidas.

REFERÊNCIAS¹

1. Fartasch M, Diepgen TL, Schmitt J, Drexler H. The relationship between occupational sun exposure and non-melanoma skin cancer: clinical basics, epidemiology, occupational disease evaluation, and prevention. *Dtsch Arztebl Int.* 2012;109(43):715-20.
2. Lowe, N.J. An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. *Dermatol. Clin.* 2006;24(1):9–17.
3. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):12222-48.
4. Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet.* 2002;3(3):199-209.
5. Madison KC. Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 2003;121(2):231-41.
6. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008;17(12):1063-72.
7. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009;15(6):388-99.
8. Camisasca DR, Silami MA, Honorato J, Dias FL, de Faria PA, Lourenço S de Q. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with and without recurrence. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2011;73(3):170-6.
9. Troeltzsch M, Knösel T, Eichinger C, Probst F, Troeltzsch M, Woodlock T, et al. Clinicopathologic Features of Oral Squamous Cell Carcinoma: Do They Vary in Different Age Groups? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; pii: S0278-2391(14):00101-3.
10. Douglass CW, Gammon MD. Reassessing the epidemiology of lip cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984;57(6):631-42.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

11. Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis.* 1999;5(3):185-95.
12. Vieira RA, Minicucci EM, Marques ME, Marques SA. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *An Bras Dermatol.* 2012;87(1):105-14.
13. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and bucomaxillofacial pathology. 2 nd ed. Philadelphia: WB Saunder; 2004.
14. Nagata GS. Avaliação dasatípias epiteliais, graduação das displasias e presença da proteína p53 mutada no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides de lábio [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2011.
15. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. p. 254.
16. Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Collini M. Treatment of lower lip cancer: an experience of 48 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(1):27-32.
17. Gutiérrez-Pascual M, Vicente-Martín FJ, Fernández-Álvarez JG, Martín-López R, Pinedo-Moraleda F, López-Estebananz JL. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26(9):1116-21.
18. Korde VR, Bonnema GT, Xu W, Krishnamurthy C, Ranger-Moore J, Saboda K, et al. Using optical coherence tomography to evaluate skin sun damage and precancer. *Lasers Surg Med.* 2007;39(9):687-95.
19. Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(2 Pt 1):255-64.
20. Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66(3): 498-503.
21. Martins MT. Queilite actínica: avaliação das alterações teciduais e graduação histológica em 458 casos [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2011.

22. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: a treatment review. *Int J Dermatol*. 2010;49(11):1225-34.
23. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004;10(4):212-6.
24. 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.
25. Schuch AP, Garcia CCM, Makita K, Menck CFM. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(8):1259-72.
26. McKenzie RL, Aucamp PJ, Bais AF, Björn LO, Ilyas M, Madronich S. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(2):182-98.
27. Aucamp PJ, Björn LO, Lucas R. Questions and answers about the environmental effects of ozone depletion and its interactions with climate change: 2010 assessment. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(2):301-16.
28. Caldwell MM, Bornman JF, Ballare CL, Flint SD, Kulandaivelu G. Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobiol Sci*. 2007;6(3):252-66.
29. Ballare CL, Caldwell MM, Flint SD, Robinson SA, Bornman JF. Effects of solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. Patterns, mechanisms, and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(2):226-41.
30. Häder DP, Helbling EW, Williamson CE, Worrest RC. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(2):242-60.
31. Peak MJ, Peak JG, Moehring P, Webb RB. Ultraviolet action spectra for DNA dimer induction, lethality and mutagenesis in *Escherichia coli* with emphasis on the UVB region. *Photochem Photobiol*. 1984;40(5):613-20.
32. Ito S, Wakamatsu K, Ozeki H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. *Pigment Cell Res*. 2000;13(8):103-9.
33. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol*. 1988;124(6):869-71.

34. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, Lo J, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*. 2012;491(7424):449-53.
35. Sinha RP, Häder DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(4):225-36.
36. Douki T. The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(8):1286-302.
37. Dupont E, Gomez J, Bilodeau D. Beyond UV radiation: a skin under challenge. *Int J Cosmet Sci*. 2013;35(3):224-32.
38. Kripke ML. Immunologic mechanisms in UV-radiation carcinogenesis. *Adv. Cancer Res*. 1981; 34: 69-106.
39. Streilein JW, Taylor JR, Vincek V et al. Immune surveillance and sunlight-induced skin cancer. *Immunol. Today* 1994; 15(4):174-9.
40. Hart PH, Grimbaldston MA, Finlay-Jones JJ. Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28(1-2):1-8.
41. Guidolin D, Nico B, Crivellato E, Marzullo A, Vacca A, Ribatti D. Tumoral mast cells exhibit a common spatial distribution. *Cancer Lett*. 2009;273(1):80-5.
42. Souza Freitas V, de Andrade Santos PP, de Almeida Freitas R, Pereira Pinto L, de Souza LB. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(3):342-8.
43. Hart PH, Grimbaldston MA, Swift GJ, Jaksic A, Noonan FP, Finlay-Jones JJ. Dermal mast cells determine susceptibility to ultraviolet B-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *J Exp Med*. 1998;187(12):2045-53.
44. Fuchs E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*. 1990;111(6 Pt 2):2807-14.
45. Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. *J Dermatol Sci*. 2008;49(3):187-94.

46. Morgan TH. The theory of the gene. *Am Nat.* 1917;51(609):513-44.
47. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell.* 1997;90(2):281-91.
48. Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, et al. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8108-12.
49. Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(9):678-89.
50. Huenniger K, Krämer A, Soom M, Chang I, Köhler M, Depping R, et al. Notch1 signaling is mediated by importins alpha 3, 4, and 7. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(18):3187-96.
51. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284(5415):770-6.
52. Hansson EM, Lendahl U, Chapman G. Notch signaling in development and disease. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(5):320-8.
53. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, et al. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* 2001;20(13):3427-36.
54. Blanpain C, Lowry WE, Pasolli HA, Fuchs E. Canonical notch signaling functions as a commitment switch in the epidermal lineage. *Genes Dev.* 2006;20(21):3022-35.
55. Lowell S, Jones P, Le Roux I, Dunne J, Watt FM. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol.* 2000;10(9):491-500.
56. Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bonish B, Miele L. Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kappaB and PPARgamma. *Cell Death Differ.* 2002;9(8):842-55.

57. Favier B, Fliniaux I, Thélou J, Viallet JP, Demarchez M, Jahoda CA, et al. Localisation of members of the notch system and the differentiation of vibrissa hair follicles: receptors, ligands, and fringe modulators. *Dev Dyn*. 2000;218(3):426-37.
58. Pan Y, Lin MH, Tian X, Cheng HT, Gridley T, Shen J, et al. Gamma-secretase functions through Notch signaling to maintain skin appendages but is not required for their patterning or initial morphogenesis. *Dev Cell*. 2004;7(5):731-43.
59. Watt FM, Estrach S, Ambler CA. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(2):171-9.
60. Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, Tommasi di Vignano A, Lioumi M, et al. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell*. 2004;6(4):551-62.
61. Sakamoto K, Fujii T, Kawachi H, Miki Y, Omura K, Morita K, et al. Reduction of NOTCH1 expression pertains to maturation abnormalities of keratinocytes in squamous neoplasms. *Lab Invest*. 2012;92(5):688-702.
62. Miele L, Golde T, Osborne B. Notch signaling in cancer. *Curr Mol Med*. 2006;6(8):905-1.
63. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet*. 2003;33(3):416-21.
64. Thélou J, Rossio P, Favier B. Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing. *BMC Dermatol*. 2002;2:7.
65. Sarchio SN, Kok LF, O'Sullivan C, Halliday GM, Byrne SN. Dermal mast cells affect the development of sunlight-induced skin tumours. *Exp Dermatol*. 2012;21(4):241-8.
66. Schweintzger NA, Bambach I, Reginato E, Mayer G, Limón-Flores AY, Ullrich SE, et al. Mast cells are required for phototolerance induction and scratching abatement. *Exp Dermatol*. 2015;24(7):491-6.
67. High FA1, Lu MM, Pear WS, Loomes KM, Kaestner KH, Epstein JA. Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(6):1955-9.
68. Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE. Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2000;28(5):527-34.

69. Nakano N, Nishiyama C, Yagita H, Koyanagi A, Akiba H, Chiba S, et al. Notch signaling confers antigen-presenting cell functions on mast cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(1):74-81.
70. Panelos J, Tarantini F, Paglierani M, Di Serio C, Maio V, Pellerito S, et al. Photoexposure discriminates Notch 1 expression in human cutaneous squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2008;21(3):316-25.
71. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J, et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization classification of tumours—pathology and genetics of head and neck tumours.* Lyon: IARC Press; 2005. p. 143-53.
72. Czerninski R, Zini A, Sgan-Cohen HD. Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. *Br J Dermatol.* 2010;162(5):1103-9.
73. Kolev V, Mandinova A, Guinea-Viniegra J, Hu B, Lefort K, Lambertini C, et al. EGFR signalling as a negative regulator of Notch1 gene transcription and function in proliferating keratinocytes and cancer. *Nat Cell Biol.* 2008;10(8):902-11.
74. Moriyama M, Durham AD, Moriyama H, Hasegawa K, Nishikawa S, Radtke F, et al. Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell.* 2008;14(4):594-604.
75. Lefort K, Dotto GP. Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(5):374-86.
76. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004;131(5):965-73.
77. Kadesch T. Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(5):506-12.
78. Veeraraghavalu K, Pett M, Kumar RV, et al. Papillomavirus-mediated neoplastic progression is associated with reciprocal changes in JAGGED1 and manic fringe expression linked to notch activation. *J Virol.* 2004;78(16):8687-700.
79. Zagouras P, Stifani S, Blaumueller CM, et al. Alterations in Notch signaling in neoplastic lesions of the human cervix. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(14):6414-8.

80. Ma A, Boulton M, Zhao B, et al. A role for notch signaling in human corneal epithelial cell differentiation and proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(8):3576-85.
81. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, et al. Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Dev Biol*. 2002;241(2):313-26.
82. del Alamo D, Schweisguth F. Notch signalling: receptor cis-inhibition to achieve directionality. *Curr Biol*. 2009;19(16):R683-4.
83. Klein T, Brennan K, Arias AM. An intrinsic dominant negative activity of serrate that is modulated during wing development in *Drosophila*. *Dev Biol*. 1997;189(1):123-34.
84. Li Y, Baker NE. The roles of cis-inactivation by Notch ligands and of neuralized during eye and bristle patterning in *Drosophila*. *BMC Dev Biol*. 2004;4:5.
85. Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS. The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development*. 1997;124(8):1485-95.
86. Miller AC, Lyons EL, Herman TG. cis-Inhibition of Notch by endogenous Delta biases the outcome of lateral inhibition. *Curr Biol*. 2009;19(16):1378-83.
87. Demehri S, Turkoz A, Kopan R. Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment. *Cancer Cell*. 2009;16(1):55-66.
88. Zoumpourlis V, Solakidi S, Papathoma A, Papaevangelidou D. Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2003;24(7):1159-65.
89. Lee J, Basak JM, Demehri S, Kopan R. Bi-compartmental communication contributes to the opposite proliferative behavior of Notch1-deficient hair follicle and epidermal keratinocytes. *Development*. 2007;134(15):2795-806.
90. Orimo A, Weinberg RA. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006;5(15):1597-601.

91. Vauclair S, Majo F, Durham AD, Ghyselinck NB, Barrandon Y, Radtke F. Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by Notch1 signaling via the regulation of vitamin A metabolism. *Dev Cell*. 2007;13(2):242-53.
92. Watt FM, Estrach S, Ambler CA. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(2):171-9.
93. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001;1(1):46-54.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Participação da via Notch no processo de transição epitélio-mesênquima na carcinogênese e na fotocarcinogênese oral

Pesquisador: Marília Trierveiler Martins

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43200115.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.070.732

Data da Relatoria: 20/05/2015

Apresentação do Projeto:

A redução da expressão de Notch1 está relacionada com diferenciação aberrante de queratinócitos e sugere uma função essencial desta proteína na manutenção da integridade do epitélio normal. Assim, o objetivo do presente trabalho é investigar se a sinalização de Notch1 está relacionada ao processo de carcinogênese oral por meio da diferenciação de queratinócitos das lesões cancerizáveis e de carcinoma epidermoide oral. Para isso, serão selecionados casos com diagnóstico histológico de carcinoma epidermoide, tanto de lábio quanto intraoral, queilite actínica e casos com diagnóstico clínico de leucoplasia oral e diagnóstico histológico de hiperqueratose com algum grau de displasia epitelial. Será analisada a maturação dos queratinócitos das lesões de lábio e mucosa oral por meio da expressão imuno-histoquímica de Notch1 e seu ligante Jagged1, comparadas com as marcações de CK6 e p63, e, por meio da expressão de vimentina, serão verificadas propriedades mesenquimais nas células epiteliais, a fim de investigar se a sinalização de Notch1 está relacionada ao processo de transição epitélio-mesênquima e qual a sua participação na carcinogênese e fotocarcinogênese oral.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a expressão imuno-histoquímica de Notch1 e Jagged1 no epitélio de queilites actínicas, de leucoplasias orais e de carcinomas epidermóides intraorais

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.070.732

e de lábio; Avaliar a imunomarcagem das proteínas CK6 e p63 nas células do epitélio das lesões precursoras e dos carcinomas orais; Analisar, nas células epiteliais da queilite actínica, da leucoplasia e dos carcinomas de mucosa oral e de lábio, a expressão imuno-histoquímica de vimentina; Comparar a imunomarcagem dos anticorpos Notch1, Jagged1, CK6, p63 e vimentina entre as lesões intraorais e de lábio.

Objetivo Secundário: Avaliar a expressão imuno-histoquímica de Notch1 e Jagged1 no epitélio de queilites actínicas, de leucoplasias orais e de carcinomas epidermóides

intraorais e de lábio; Avaliar a imunomarcagem das proteínas CK6 e p63 nas células do epitélio das lesões precursoras e dos carcinomas orais; Analisar, nas células epiteliais da queilite actínica, da leucoplasia e dos carcinomas de mucosa oral e de lábio, a expressão imunohistoquímica de vimentina; Comparar a imunomarcagem dos anticorpos Notch1, Jagged1, CK6, p63 e vimentina entre as lesões intraorais e de lábio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco direto aos sujeitos da pesquisa, uma vez que serão utilizados blocos de parafina e lâminas de histológico provenientes de arquivo de Serviço de Patologia Cirúrgica.

Benefícios: Não há benefício direto aos sujeitos da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Como controle normal, serão selecionadas 10 amostras de outras lesões que contenham epitélio de mucosa oral e do vermelhão do lábio sem alterações morfológicas (com aspectos usuais de normalidade, o que totaliza 190 sujeitos da pesquisa. Pesquisa laboratorial com metodologia específica bem detalhada e estruturada, com resultados que deverão apresentar relevantes benefícios para a área de conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não requer TCLE. Apresenta carta de autorização do Prof. Responsável Pelo Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP para utilização do arquivo, com compromisso de sigilo e não haverá retenção de amostras.

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: cepto@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.070.732

objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não existem pendências ou inadequações a serem apontadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 20 de Maio de 2015

Assinado por:

**Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)**