FABIANA MARTINS E MARTINS

**Análise comparativa da expressão imuno-histoquímica da via
PI3K-AKT-MTOR em displasias epiteliais, lesões irritativas
e carcinomas espinocelulares**

São Paulo

2013

FABIANA MARTINS E MARTINS

**Análise comparativa da expressão imuno-histoquímica da via
PI3K-AKT-MTOR em displasias epiteliais, lesões irritativas
e carcinomas espinocelulares**

Versão Corrigida

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 Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Marina Gallottini

São Paulo

2013

Martins FM. Análise comparativa da expressão imuno-histoquímica da via PI3K-AKT-MTOR em displasias epiteliais, lesões irritativas e carcinomas espinocelulares. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: /   /2013

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: _____

Quando não tinha nada, eu quis
Quando tudo era ausência, **esperei**
Quando tive frio, tremi
Quando tive coragem, **liguei...**

Quando chegou carta, **abri**
Quando ouvi Prince, dancei
Quando o olho brilhou, **entendi**
Quando criei asas, voei...

Quando me chamou, eu **vim**
Quando dei por mim, tava aqui
Quando lhe achei, me perdi
Quando vi você, me **apaixonei...**
(Chico César)

Para Márcio, o grande amor da minha vida.

Gustavo,

Você é o meu amigão! Sempre estarei disposta a te receber aqui na minha casa para a gente passear, ir no cinema, na Liberdade e outros programas!

Eu gostaria que você me perdoasse por todas as vezes que estive ausente, ocupada, estudando...mas você sabe que sempre temos que cumprir nossas responsabilidades, né?

Saiba que independente do que aconteça na minha vida, sempre serei sua melhor amiga.

Entre todos os presentes que eu quis durante minha infância, você foi o mais desejado. Você é o meu grande amor!

Dedico este trabalho e todos que ainda hei de realizar aos meus pais **Ilza e Walmir**: vocês são meus melhores amigos! Só tenho a agradecer pelo o amor, compreensão, paciência e principalmente pelos valores passados. Espero ter a felicidade de poder transmitir tudo que me foi dado para futuras gerações! Amo muito vocês!

Aos meus familiares queridos, minha tia Valquíria, que mesmo longe esta sempre presente em todos os momentos da minha vida e minha avó Virgínia, que a nossa semelhança não seja somente física, espero ter herdado também a sua bondade e personalidade também!

À minha avó Ilza e meu tios Jorge e Sueli, sempre recordarei sua ótima companhia, com conversas sempre estimulantes!

Aos meus primos, sou fã de todos vocês!

À minha família mais recente, mas não menos importante. Minha sogra Elisabete, meu sogro José e o meu cunhado Maurício. Vocês sempre me receberam com braços abertos, me acolhendo nesta família maravilhosa!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Marina, gostaria de agradecer pelo suporte não somente científico, mas também pela amizade, paciência e confiança que foram depositadas em mim. Posso dizer amadureci tanto como professora, quanto pesquisadora nestes anos de convivência. Você é o meu grande exemplo profissional!

À Prof^a. Karem, você viu algo em mim. Posso dizer que você me “alfabetizou” em termos de pós-graduação. Por causa da sua confiança descobri minha vocação... e serei eternamente grata a você por isso.

À Prof^a. Suzana, obrigada pelas palavras de incentivo e tempo dispensado neste trabalho! A sua dedicação à patologia é realmente inspiradora, te considero um dos meus grandes modelos profissionais.

Aos professores de Harvard Dr. Nathaniel Treister e Dr^a. Sook Bin Woo, pelos ótimos momentos de grande aprendizado e pelas futuras colaborações que ainda estão por vir.

Ao Prof. Décio, agradeço pela ótima convivência e conversas altamente estimulantes, onde conversávamos desde amenidades até a Teoria do Caos.

Aos demais professores da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP: Prof^a. Andrea, Prof^a. Marília e Prof. Fábio pela convivência agradável.

Ao Prof. Paulo Sergio Santos, exemplo de profissionalismo e dedicação

À minha grande amiga Prof^a. Nathalie Rezende, sei que posso contar com você em todos os momentos da minha vida, e saiba que a recíproca é verdadeira! Adoro você!

À minha querida amiga Paula, repito o que já disse anteriormente: Com você foi “amizade à primeira vista”, você foi a melhor coisa que me aconteceu durante o cumprimento dos créditos do mestrado! Mesmo distante geograficamente, você é umas das minhas amigas mais presentes.

Às minhas amigas de infância de hoje e de sempre Alê Geraldini, Alê Ramalho e Aninha. Saudades sempre. Em especial para a Alê, minha afilhada mais amada! Te considerado uma amiga-irmã, amiga de uma vida inteira. Amo você!

Ao prof. Paulo Braz, um dos meus melhores amigos! Adoro sua capacidade de absorção de todos os tipos de cultura, podemos conversar durante horas sobre literatura e arte até a cultura pop dos anos 80!

Às meninas participantes da COPA, Alexandra, Juliana e Thais, considero vocês não somente ótimas pesquisadoras mas também grandes amigas!

Às minhas amigas da especialização em Pacientes Especiais e do CAPE Alexandre Fraige, Cybelle, Fernanda e Janaína, por terem compartilhado comigo a alegria de fazer parte da 1^a turma da especialização, à uma amizade de hoje e de sempre!

Aos meus amigos do programa de medicina oral e patologia bucal de Harvard: Alessandro, Ana, Arwa, Caitlin, Chia-Cheng, Soulafa e Shokoufeh pelos breves, mas preciosos momentos de descontração em meio de tanto trabalho.

Aos meus queridos amigos de laboratório Bianca, Alessandra Camargo, Rita, Elisa e Juvani. Agradeço não somente pela ajuda técnica, mas também pelos ótimos momentos e pela nova amizade que se formou, com certeza vocês tornaram os meus finais de semana no laboratório muito mais agradáveis!

Às incríveis funcionárias do CAPE: Andressa, Bel, Cris, Gil, Jeanne, Leninha e Sandra. Agradeço a vocês todas pela maravilhosa convivência e pelo carinho. Sou muito honrada de fazer parte desta família. Gosto muito de todas vocês!

À todos os meus colegas da pós-graduação da FOU SP, mas em especial à Carol Mussi, Carol Vilela, Cris, Karen, Karin e Talita. Sinto-me muito feliz em acompanhar o crescimento profissional de vocês!

Às funcionárias da Patologia Bucal da FOU SP: Nair, Néia e Zilda. Obrigada pela cordialidade e simpatia!

Às bibliotecárias Glauci e Vânia, pela revisão da formatação da minha tese, vocês acompanharam a evolução tanto minha, quanto à do meu esposo Márcio desde a monografia da especialização até o doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

“The greatest enemy of knowledge is not ignorance, it is the illusion of knowledge.”

Stephen Hawking

Martins FM. Análise comparativa da expressão imuno-histoquímica da via PI3K-AKT-MTOR em displasias epiteliais, lesões irritativas e carcinomas espinocelulares. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão corrigida.

RESUMO

A leucoplasia é a mais comum das lesões potencialmente malignas (LPM) da mucosa bucal acometendo cerca de 2% da população. A via PI3K- AKT-mTOR, tem papel importante na carcinogênese em diversos tumores, incluindo o câncer de cabeça e pescoço e estudos têm apontado os inibidores do mTOR como promissores agentes de avaliação terapêutica. Desta forma, no presente estudo avaliamos a expressão imuno-histoquímica de lesões bucais diagnosticadas clinicamente como leucoplasias, comparando-as com carcinomas espinocelulares (CEC), hiperqueratoses irritativas (HI) e mucosa normal (MN). Foram avaliados 186 casos, divididos em 5 grupos tais como displasia epitelial de alto risco (DAR), displasia epitelial de baixo risco (DBR), CEC, HI e MN. Os casos foram retirados do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. As informações clínicas, relativas ao sexo e idade dos pacientes e localização das lesões foram compiladas. Todas as lesões selecionadas foram observadas ao HE por dois patologistas, ao microscópio de luz para confirmação dos diagnósticos. As proteínas pesquisadas incluíram: pAKT, pmTOR, pS6, e p4EBP1. A marcação dos diversos anticorpos foi quantificada com o auxílio da aquisição de imagens realizada com o uso de um fotomicroscópio. Na imagem capturada (aumento de 400x), foi observada a presença ou ausência de células marcadas, bem como, numa segunda análise, a quantidade percentual das mesmas. Na primeira análise, o padrão de marcação foi classificado em positivo e negativo e, na segunda, foi classificado em graus de “0” a “3”. As variáveis do estudo foram avaliadas pelos testes Qui-quadrado e o teste F, ANOVA e posteriormente foi realizada uma regressão logística univariada. Entre todos os casos de mucosa oral normal, foi encontrada positividade somente para o anticorpo pS6, em 50% dos casos; nas HI houve marcações positivas para a pS6

(em 54,8% dos casos) e p4EBP1 (em 22,6% dos casos). Nas DBR foi observada a imunorreatividade aos anticorpos pS6 (em 67,4% dos casos), pAKT(em 56,2% dos casos), p4EBP1(em 41,7%dos casos) e pmTOR (em 29,2% dos casos), já nas DAR houve positividade para a pS6 (em 74% dos casos), pAKT (em 68% dos casos), p4EBP1 (em 44% dos casos) e pmTOR (em 28% dos casos). Os CECs expressaram pAKT (em 83,3% dos casos), pS6 (em 77,4% dos casos), p4EBP1(em 50% dos casos) e pmTOR (em 50%dos casos). Quando se considerou o resultado da marcação positiva ou negativa, houve diferença estatisticamente significativa, ente os grupos, em relação ao número de casos que expressaram as proteínas pAKT, pmTOR e p4EBP1, sendo que o grupo dos CECs foi o que apresentou maior frequência de imunorreatividade para todos os anticorpos estudados. Comparando-se apenas as lesões de CEC e DEO, observou-se que mais casos de CEC foram positivos para pAKT e pmTOR e não observou-se diferença na expressão do p4EBP1. Logo, podemos concluir que todas as proteínas estudadas, exceto a pS6, representam bons biomarcadores no que se concerne à diferenciação entre MN, HI, DEO e CEC. Entretanto somente as proteínas pAKT e pmTOR podem ser relacionadas à carcinogênese oral .

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Displasia epitelial. Leucoplasia oral. Biomarcadores. mTOR. AKT.

Martins FM. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of PI3K-AKT-mTOR in epithelial dysplasia, irritative lesions and squamous cell carcinomas. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão corrigida.

ABSTRACT

Leukoplakia is the most common potentially malignant lesion (PML) of the oral cavity affecting approximately 2% of the population. PI3K-AKT-mTOR pathway plays an important role in carcinogenesis in many tumors, including head and neck cancer, and several studies have showed mTOR inhibitors as promising therapeutic agents. In this study we evaluated the immunohistochemical expression of oral lesions diagnosed clinically as leukoplakia and squamous cell carcinoma (SCC), comparing them to normal mucosa (NM) and frictional hyperkeratosis (FR). We evaluated 186 cases, divided into 5 groups including high risk dysplasia (HRD), low risk dysplasia (LRD), SCC, NM and FR. The cases were obtained from the archives of the Oral Pathology Laboratory of the School of Dentistry of the University of São Paulo. Clinical information regarding sex, age of the patient and location of the lesions were compiled. The slides (HE staining) were observed by two pathologists and all cases were re-evaluated under light microscope. The proteins investigated were: pAKT, pmTOR, pS6, and p4EBP1. The staining pattern of the antibodies was quantified by acquiring images using a photomicroscope. In the captured image (400x magnification), the total of counted labeled cells, were divided by the total number of cells present in the field captured. The staining pattern was classified into positive and negative and also divided into degrees starting from "0" to "3". The study variables were evaluated by chi-square test, ANOVA F and univariate logistic regression analysis. Among all the cases of MN, positivity was found only for pS6 (50% of cases); in FH cases immunoreactivity was observed in pS6 (54.8% of cases) and 4EBP1 (22.6% of cases). In LRD immunoreactivity was observed in pS6 (67.4% of cases), pAKT (56.2% of cases), p4EBP1 (41.7% of cases) and pmTOR (29.2% of cases), while for HRD cases positivity was found for pS6 (74% of cases), pAKT (68%

of cases), p4EBP1 (44% of cases) and pmTOR (28% of cases). In SCCs cases positivity was found for pAKT (83.3% of cases), PS6 (77.4% of cases), p4EBP1 (50% of cases) and pmTOR (50% of cases). Statistically significant differences were observed in all positive study groups for the proteins pAKT, pmTOR and p4EBP. After the evaluation of SCC and the oral dysplasia groups, there were statistically significant differences for the study groups that showed immunoreactivity for the proteins pAKT and pmTOR. Therefore, we conclude that all the proteins of the study are good biomarkers to differentiate normal tissue from OD and SCC, but only pAKT and pmTOR proteins could be related to carcinogenesis.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Epithelial dysplasia. Oral leukoplakia. Biomarkers. mTOR. AKT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Representação gráfica simplificada da via de sinalização PI3K-AKT-mTOR, demonstrando os efeitos de mTOR sobre a síntese proteica 40

Gráfico 5.1 -Relação da porcentagem de positividade/negatividade das proteínas da via do AKT-mTOR em todas as lesões estudadas.....52

Figura 5.1 - Estimativas da probabilidade de pertencer ao determinado grupo de lesões dado informações sobre pAKT, p4EBP1, pmTOR e idade 57

Gráfico 5.2 - Distribuição de células com marcação citoplasmática para a proteína pAKT, por grupo de lesões.....59

Gráfico 5.3 - Distribuição de células com marcação nuclear para proteína pAKT por grupo de lesões.....59

Gráfico 5.4 - Distribuição de células positivas da proteína pmTOR por grupo de lesões.....61

Gráfico 5.5- Distribuição de células positivas da proteína pS6 por grupo de lesões .62

Gráfico 5.6 - Distribuição de células positivas da proteína p4EBP1 por grupo de lesões.....64

Figura 5.2 - Padrão de imunorreatividade para os anticorpos estudados em CEC...65

Figura 5.3 - Padrão de imunorreatividade para os anticorpos estudados em DAR...66

Figura 5.4 - Padrão de imunorreatividade para os anticorpos estudados em DBR...67

Gráfico 5.7 - Representação gráfica do teste de regressão logística univariada com os intervalos de confiança em todas as lesões estudadas.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Critérios arquiteturais e celulares para diagnóstico e classificação das DEO	33
Tabela 4.1 - Anticorpos utilizados no estudo	47
Tabela 4.2 - Graduação da quantificação da expressão imuno-histoquímica desenvolvida para este estudo	48
Tabela 5.1 - Comparações entre os grupos segundo sexo, idade, cor da pele e sítio	51
Tabela 5.2 - Comparações entre os grupos segundo positividade das proteínas..	53
Tabela 5.3 - Comparações entre os grupos segundo positividade das proteínas em relação às DEO e CEC	54
Tabela 5.4 - Comparações entre positividade para as proteínas das DEO classificada em graus.....	55
Tabela 5.5 - Frequência das combinações de positividade e negatividade observadas para as proteínas nos grupos estudados	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	Proteína de ligação à eif4e
AKT ou PKB	Proteína quinase B
ALA	Ácido aminolevulínico
CDK	Ciclina kinase dependente
CEC	Carcinoma espinocelular
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DAB	Diaminobenzidina
DAR	Displasias de alto risco
DBR	Displasias de baixo risco
DEO	Displasias epiteliais orais
DMBA	7,12-dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Fator de crescimento epidérmico
eiF4E	Fator eucariótico do início da tradução
ErbB2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
FKBP12	Proteína ligante de FK-506
GTPase-GAP	Proteínas ligante do trifosfato de guanossina
HE	Hematoxina - Eosina
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia -1 α
LLLT	Terapia com laser de baixa intensidade

LO	Leucoplasia oral
LPM	Lesões potencialmente malignas
MAPK	Proteínas-quinases ativadas por mitógenos
mTHPC	Meta-tetra hidroxifenil de cloro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Proteína associada a rapamicina de mTOR
mTORC2	Proteína insensível a rapamicina de mTOR
OMS	Organização mundial da saúde
p4EBP1	Forma fosforilada da proteína 4EBP1
pAKT	Forma fosforilada da proteína AKT
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PDK1	Proteína fosfatidilinositol kinase dependente 1
PDT	Terapia fotodinâmica
PI3K	Quinase fosfoinositol -3
PIP2	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
pmTOR	Forma fosforilada da proteína mTOR
pS6	Forma fosforilada da proteína ribossomal S6
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10
RAPTOR	Proteína reguladora associada ao mTOR
Rb	Retinoblastoma
RICTOR	Companheiro de mTOR insensível à rapamicina
Rheb-1	Proteína recombinante ligante de GTP homóloga 1

RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
S6	Proteína ribossomal S6
TGF- α	Fator de transformação do crescimento alfa
TRIS	Tris-hidroximetil aminometano
TSC	Complexo tuberosa esclerose
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Leucoplasia oral	24
2.1.1 Epidemiologia	25
2.1.2 Etiopatogenia	25
2.1.3 Aspectos clínicos	27
2.1.4 Tratamento	28
2.1.5 Diagnóstico diferencial	30
2.2 Displasia epitelial oral	31
2.2.1 Biomarcadores em displasias epiteliais	33
2.3 A via do PI3K-AKT-mTOR: Principais proteínas envolvidas	35
2.3.1 PI3K	35
2.3.2 PTEN	36
2.3.3 AKT	36
2.3.4 mTOR	37
2.4 A via do PI3K-AKT-PTEN no câncer	39
2.5 A expressão da via do PI3K-AKT-mTOR em carcinomas espinocelulares e lesões potencialmente malignas	41
3 PROPOSIÇÃO	44

4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Dados gerais e critérios de inclusão	45
4.2 Imuno-histoquímica	46
4.3 Análise estatística	49
5 RESULTADOS	50
5.1 Análise demográfica	50
5.2 pAKT	58
5.3 pmTOR	60
5.4 pS6	61
5.5 p4EBP1	63
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE	88
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas de boca representam cerca de 3% de todas as neoplasias malignas que acometem o homem, sendo o carcinoma espinocelular (CEC) a mais freqüente delas, representando um importante problema de saúde pública. Por vezes, o CEC é precedido por lesões potencialmente malignas (LPM) das quais destacamos a leucoplasia oral (LO) e a eritroplasia (Eversole, 2009).

A LO é a mais comum das LPM, acometendo de 1 a 2,5% da população mundial (Mehanna et al., 2009). Clinicamente, pode se apresentar como uma lesão branca homogênea, plana, fina e uniforme, ou heterogênea, branca com áreas avermelhadas, superfície irregular, por vezes verrucosa. São lesões não removíveis à raspagem e que não podem ser diagnosticadas, clínica ou histologicamente, como nenhuma condição e nem mesmo associada a nenhum agente causal, exceto ao tabaco e álcool (Van der Waal; Reichart, 2008). O diagnóstico diferencial das LOs inclui especialmente as hiperqueratoses irritativas ou friccionais; candidíase hiperplásica, líquen plano e o carcinoma epinocelular (Natarajan; Woo et al., 2008; Van der Waal, 2010). O seu diagnóstico é, portanto um diagnóstico de exclusão.

Histologicamente, as leucoplasias podem revelar epitélio hiperplásico, hiperqueratótico com ou sem displasia (Van der Waal, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005), as displasias epiteliais orais (DEO) são caracterizadas pela alteração da arquitetura epitelial combinada com atipia celular podendo ser classificada em: discreta, moderada ou intensa. Acredita-se que apenas 50% de lesões clinicamente diagnosticadas como leucoplasia exibem algum grau de displasia (Speight, 2007). Classificação mais recente, baseada na classificação da OMS de 2005, proposta por Kujan e colaboradores em 2006, divide as DEOs em displasias de alto risco (DAR) e displasias de baixo risco (DBR).

Embora existam esses critérios de classificação, as características clínicas e morfológicas não têm se mostrado bons preditores do comportamento das DEOs, em relação ao risco de malignização. Por esta razão muitos pesquisadores têm

buscado estudar alterações moleculares das DEOs, na tentativa de identificarem biomarcadores preditores para a transformação maligna.

A via de sinalização do PI3K-AKT-mTOR tem sido estudada em carcinomas de rim, pulmão, mama e em CECs de região de cabeça e pescoço, mostrando-se desregulada nessas neoplasias (Molinolo et al., 2009). As proteínas pertencentes a esta via têm sido amplamente utilizadas como marcadores imuno-histoquímicos para avaliarem a eficácia de terapia-alvo baseada no uso dos inibidores de mTOR (Hudes et al., 2007; Soria et al., 2009; Baselga et al., 2009).

Pouco se sabe sobre o comportamento destas proteínas em lesões potencialmente malignas. A busca de marcadores que mostrem um processo precoce de transformação maligna ou ainda que sugira maior risco de malignização é de grande interesse para a comunidade científica, não apenas para ajudar nos processos diagnósticos mas também para gerarem informações para terapias-alvo mais eficientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucoplasia oral

Leucoplasia é um termo clínico, provisional e de exclusão, atribuído a lesão branca localizada na superfície da pele ou mucosa, não removível por raspagem, e que não pode ser caracterizada clinicamente como outro tipo de doença (Kramer et al., 1978).

Foi descrito pela primeira pelo húngaro Schimmer, em 1877, para descrever o aspecto clínico de lesões brancas da mucosa oral. Entretanto, o uso deste foi alvo de controvérsias na patologia diagnóstica, por esta razão, o termo leucoplasia foi proposto em 1978 como diagnóstico clínico provisional, sendo utilizado até o presente (Kramer et al., 1978).

Em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou a definição do termo leucoplasia passando a descrevê-la como *“placa branca de questionável risco havendo excluído outras doenças ou condições que não possuem potencial aumentado de transformação maligna”* (Barnes et al., 2005).

A LO é a mais comum das lesões potencialmente malignas (LPM). As LPM são aquelas que apresentam tecido morfológicamente alterado com probabilidade maior de transformação maligna quando comparada com tecido de aparência normal (Kramer et al., 1978; Eversole, 2009).

2.1.1 Epidemiologia

A prevalência mundial das LOs com variações de 0,5 a 2%, entretanto, foram observadas diferenças na incidência nos diversos países estudados, principalmente em relação a distribuição entre gêneros; sendo a prevalência das LOs maior em pacientes do sexo masculino em relação ao sexo feminino em países em desenvolvimento (50-9%), enquanto que em países desenvolvidos a diferença entre os sexos não é significativa (Van der Waal, 2010, Petti, 2003).

Jaber e colaboradores em 2003 avaliaram clinicamente 630 pacientes com LO provenientes da região oeste da Europa, durante o período de 1972 a 1996. As lesões foram posteriormente avaliadas histologicamente e todas exibiam algum grau de displasia epitelial. Lesões do assoalho bucal e borda lateral da língua foram geralmente exibiam displasias intensas, enquanto que lesões localizadas em mucosa bucal foram diagnosticadas como displasias epiteliais discretas. Foi concluído que o diagnóstico clínico não seria suficientemente adequado para se definir o grau de displasias das lesões estudadas (Jaber et al., 2003).

No Brasil, em recente estudo epidemiológico, foram analisados retrospectivamente 9.621 casos de lesões de tecido mole, das quais 173 casos exibiam DEO, o que representou 1,79% de todos os casos. As LOs foram as mais frequentes (56,8% dos casos), seguida das lesões eritroplásicas (17%) e eritroleucoplásicas (12,6%) (Pereira et al., 2011).

2.1.2 Etiopatogenia

Classicamente, hábitos como o tabagismo e etilismo são associados ao desenvolvimento das LPM. Alguns autores revelaram que as LOs são de 6 a 9 vezes

mais frequentes em indivíduos fumantes em relação a não fumantes (Baric et al., 1982; Van der Waal, 2009; Carrard et al., 2011). O alcoolismo foi descrito como fator de risco independente para o desenvolvimento das LPM em pacientes do sexo masculino, independente do tipo e quantidade de bebida ingerida (Maserejian et al., 2006).

A influência destes mesmos hábitos deletérios na etiologia das alterações em mucosa oral foi avaliada em estudo recente onde foram observadas diferenças significativas no grupo de pacientes que apresentaram CEC e LOs com relação aos aspectos demográficos e comportamentais. Metade dos pacientes com LOs eram do sexo masculino, com média de idade de 48 anos de idade e 12,1% etilistas. Os pacientes com CEC eram em sua maioria homens, acima dos 60 anos de idade e etilistas em 29,1% (Matranga et al., 2012).

Em estudo que avaliou 456 pacientes diagnosticados com lesões displásicas orais, foi observado que apesar da grande maioria dos pacientes serem tabagistas e etilistas, 8,1% dos acometidos não possuíam estes hábitos, sugerindo assim outros fatores de risco poderiam contribuir para o aparecimento das DEO (Jaber, 2010).

O papel da infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) no desenvolvimento das LOs é considerado ainda controverso por diversos autores (Van der Waal, 2009). Em revisão sistemática de literatura realizada por Miller e White (1996), foram incluídos dados referentes aos métodos de detecção do HPV, preservação do tecido analisado (fresco, parafinado ou congelado) e informações demográficas e foi observado que em LOs com displasia epitelial o método mais confiável de identificação do HPV-DNA foi a técnica da *polymerase chain reaction* (PCR) em tecidos mantidos a fresco ou congelados e mais frequentes em mulheres do que em homens (2:1) (Miller; White, 1996).

Na revisão sistemática mais recente sobre este assunto, foram analisados 39 estudos transversais que avaliaram a presença do HPV-DNA em lesões de CEC, LPM e líquen plano. Os autores concluíram que o HPV poderia ser considerado um agente causal destas lesões (Syrjänen et al., 2011).

Alguns autores tem estudado outros fatores que talvez possam influenciar o desenvolvimento de LP. Meisel e colaboradores pesquisaram a relação entre a

doença periodontal e o surgimento de LO. Avaliaram 123 pacientes com LO diagnosticadas clinicamente, de acordo com a classificação proposta por Waal, sendo observado um aumento significativo de doença periodontal nestes pacientes. Os autores concluíram que a periodontite aumentaria o risco para a LO, consequentemente aumentando assim as chances para o desenvolvimento de malignidades (Van der Waal et al., 2000; Meisel et al., 2012).

2.1.3 Aspectos clínicos

As LOs podem acometer qualquer sítio da mucosa oral, exibindo aspecto homogêneo, plano, uniformemente branco e leitoso. Ou aspecto não-homogêneo, como lesões brancas com pontos vermelhos ou nódulos de coloração uniforme vermelho e branco (eritroleucoplasias). Existe ainda a forma verrucosa, denominada leucoplasia verrucosa proliferativa. Muitos autores descrevem que por vezes a leucoplasia verrucosa pode ser considerada semelhante ao carcinoma verrucoso, tanto no aspecto clínico, quanto no histopatológico (Van der Waal; Reichart, 2007; Van der Waal, 2009).

A detecção e manuseio das LOs são complexos. Novas tecnologias tem sido desenvolvidas com o intuito de auxiliar na detecção precoce destas lesões (Gillenwater et al., 2006; Awan et al., 2011a).

Um dos sistemas que tem sido estudados é o de autofluorescência (VELscope®), que consiste no princípio da excitação dos fluoróforos presentes nos tecidos por uma luz de comprimento de onda específico (400–460 nm). Acredita-se que o epitélio displásico é visualizado como uma região escura devido a perda da expressão dos fluoróforos (Awan; Morgan, 2011a).

Outro sistema de detecção amplamente discutido na literatura, se baseia na quimiofluorescência, onde os tecidos epiteliais suspeitos previamente enxaguados

com ácido acético e expostos sob uma luz do tipo *light-emitting diode* (LED), revelam uma coloração esbranquiçada distinta (Rethman et al., 2010; Awan et al., 2011b).

Em revisão sistemática da literatura publicada em 2010, foram avaliados os sistemas de detecção adjuvantes para o CEC e LPM mais utilizados nos Estados Unidos, tais como os dispositivos baseados nos princípios de autofluorescência, de reflexão tecidual, dispositivos que combinavam as características dos dois primeiros sistemas e a citologia esfoliativa com a utilização de *citobrush*. Foi concluído que embora os métodos de detecção possam auxiliar na inspeção dos tecidos moles, identificando assim os estágios mais precoces do câncer bucal, não foram encontradas evidências clínicas significativas para que alguma destas técnicas possa substituir o exame clínico convencional (Rethman et al., 2010).

Uma vez que exame clínico não é suficientemente preciso para definir a real natureza das LOs, a biópsia incisional e a avaliação histológica são fundamentais para se discernir desde uma condição benigna ao CEC propriamente dito (Lingen et al., 2011).

2.1.4 Tratamento

Lodi e Porter em 2008, revisaram a literatura mundial com relação ao manejo das LPM e concluíram que a excisão cirúrgica com margem de segurança ainda é considerada o tratamento de escolha para a LO, embora ainda não exista comprovação da eficácia do procedimento cirúrgico frente à possibilidade de transformação maligna (Lodi; Porter, 2008).

Em revisão sistemática com meta-análise realizada em 2009, os autores incluíram na pesquisa estudos com pacientes que apresentavam DEO confirmadas histologicamente, e a relacionaram com a taxa de transformação maligna e o tempo da transformação maligna. Entre os 14 estudos selecionados, 992 pacientes foram

incluídos na análise. Foi concluído que pacientes que não foram submetidos à cirurgia apresentaram índices mais elevados de transformação maligna (14.6% versus 5.4%) quando comparados a outros tratamentos (Mehanna et al., 2009).

Jeong e colaboradores avaliaram em trabalho recente, 22 pacientes com LO localizada na borda lateral da língua. Entre estes pacientes, 15 já possuíam resultados de biópsias incisoriais anteriores (ausência de DEO em 10 casos, presença de DEO em 5 casos). Posteriormente, estes e os demais casos foram submetidos à biópsia excisional. Como resultado, foi observado que 73,3% dos pacientes que foram submetidos somente à biópsia incisória, foram sub-diagnosticados exibindo lesões de CEC e carcinoma verrucoso. Foi concluído que LO em borda lingual é altamente associada à malignidade, sendo recomendadas preferencialmente biópsias excisionais com margens de segurança para que se evite o sub-diagnóstico destas lesões (Jeong et al., 2012).

O tratamento cirúrgico, como o bisturi a frio e elétrico, crioterapia e o laser de alta potência são por vezes considerados o tratamento de escolha em grande parte dos casos. Entretanto, em outros casos de LO alguns fatores como a não cessação do tabagismo, tamanho e localização das lesões podem ser considerados desfavoráveis a esta modalidade terapêutica (Ribeiro et al., 2010; Yang et al., 2010).

Algumas terapias alternativas para LO como a terapia fotodinâmica (PDT), que consiste associação de um fotossensibilizante como o ácido 5- aminolevulínico (ALA) e o laser de baixa potência (LLLT), tem mostrado resultados benéficos nos casos de LO e leucoplasias verrucosas proliferativas (Kvaal; Warloe, 2007).

Jerjes e colaboradores, estudaram os efeitos da associação do LLLT ao ALA e o m-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC). Foram analisados 147 pacientes com LPM, incluindo LOs dos tipos homogêneo e não homogêneo e eritroplasias. Após 5 anos de seguimento dos casos, foram observados que em 81% dos casos houve regressão absoluta das lesões, 8,2% responderam parcialmente ao PDT, 7,5% evoluíram para CEC e 3,4% apresentaram estabilidade das lesões. Os autores concluíram que o 5-ALA-PDT e/ou mTHPC-PDT podem ser considerados tratamentos efetivos para LPM (Jerjes et al., 2011).

Holpuch e colaboradores avaliaram o papel da quimio-prevenção para o tratamento do CEC e LPM. Por meio de revisão de estudos clínicos que avaliam o uso de agentes naturais e/ou químicos na inibição e regressão da transformação maligna das LPM em CECs. As substâncias analisadas consistiam em derivados da vitamina A, inibidores da ciclooxigenase 2 (COX-2) e produtos naturais. Foram observadas vantagens das propriedades farmacológicas dos compostos utilizados na forma tópica, em comparação a medicação sistêmica, e terapias-alvo foram apontadas como agentes promissores em futuros estudos (Holpuch et al., 2011).

Em estudo sobre os efeitos quimiopreventivos da droga experimental GW2974, inibidora do EGFR e ErbB2, foi estudada na mucosa jugal de ratos que receberam a aplicação tópica do carcinógeno DMBA. Após 6 semanas de uso, houve a redução significativa da incidência, número e tamanho dos lesões induzidas, comprovando a eficácia deste agente na prevenção do CEC e LPM (Sun et al., 2008).

2.1.5 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial das leucoplasias orais inclui especialmente as hiperqueratoses irritativas ou friccionais; candidíase pseudomembranosa, líquen plano e o CEC (Natarajan; Woo, 2008; Van der Waal, 2010).

As hiperqueratoses irritativas são caracterizadas por pápulas ou placas esbranquiçadas/acinzentadas pobremente delimitadas que ocorrem em mucosa jugal e labial inferior. Por vezes apresentam aspecto macerado e leucoedemas associados, cujo diagnóstico em grande das vezes baseia-se apenas nas características clínicas. Cerca de 67 a 72% dos casos são observados bilateralmente (Woo; Lin, 2009).

Benign alveolar ridge keratosis ou BARK é descrita como um tipo de hiperqueratose irritativa, mas com características histopatológicas distintas como a

superfície levemente papilomatosa, projeções epiteliais com anastomoses na camada basal, hipergranulose e ausência de inflamação (Natarajan; Woo, 2008).

2.2 Displasia epitelial oral

Histologicamente a LO apresenta hiperqueratose, acompanhada ou não de acantose, infiltrado inflamatório variável, e por vezes, displasia epitelial. O exame histopatológico é necessário para a distinção entre a leucoplasia displásica e não displásica (Natarajan; Woo; 2008; Van der Waal, 2009).

As lesões que não apresentam características histológicas de displasia exibem geralmente hiperplasia e/ou hiperqueratose, enquanto as lesões displásicas têm sido graduadas em três categorias: displasia discreta, moderada ou intensa, de acordo com a extensão de anormalidades arquiteturais e citológicas observadas no epitélio, segundo critérios estabelecidos pela OMS em 2005 (Speight, 2007) (Tabela 2.1).

Diferentes estudos mostram que cerca de 50% das LOs exibem algum grau de displasia (Speight, 2007). A probabilidade de transformação maligna das LOs varia de 0,13 a 25%, conforme mostrado em estudos realizados em diferentes locais do mundo. Tal variação deve-se à inclusão de lesões brancas entre as leucoplasias, de causa irritativa como as hiperqueratoses, bem como variações populacionais. Quando se pretende avaliar os fatores de risco relacionados a uma maior chance de transformação maligna como aspectos clínicos, sexo, idade, localização da lesão, os resultados mostram significativa diferença entre as populações (Napier; Speight, 2008).

Recentemente foi proposto um sistema binário de classificação para as DEO, já testado por alguns autores, mostrando-se mais funcional em predizer o risco de malignização de uma LO (Kujan et al., 2006, Warnakulasuriya et al., 2008, Liu et al., 2010). Neste sistema as lesões são classificadas em displasias de baixo risco (DBR)

e alto risco (DAR) de malignidade: Quando a displasia existente é duvidosa ou discreta, a lesão é considerada de baixo risco e quando da existência de displasia epitelial moderada ou intensa, a lesão é considerada de alto risco (Kujan et al., 2006).

De um modo geral, quando os sistemas de classificação são comparados, se observa um nível de concordância regular, com valores de kappa abaixo de 0,5. Quando o sistema de classificação da OMS é utilizado no diagnóstico das LPM, os valores kappa oscilaram entre 0,5 e 0,6 (Eversole, 2009). Quando o sistema binário proposto por Kujan e cols foi reavaliado e comparado com a classificação da OMS, foi observado que os examinadores apresentaram um nível de concordância variando entre pobre a moderado, independente da classificação utilizada (Kujan et al, 2007; Warnakulasuriya et al., 2008; Eversole, 2009). Entretanto, em estudo que comparou a classificação da OMS com a proposta por Kujan e colaboradores em DEO de cordas vocais, o nível de concordância passou de 0,5 para 0,7 respectivamente (Eversole, 2009).

No estudo de Abbey et al. (1995) foi alcançado um nível de concordância de 80% quando os patologistas avaliaram casos de LO com displasia epitelial e os casos de LO sem displasia. Entretanto, foi concluído que a variação nos critérios de classificação são extremamente controversos, subjetivos e sujeitos a interpretações diversas, mesmo quando entre patologistas experientes (Abbey et al., 1995; Warnakulasuriya et al, 2008; Lingen et al., 2011).

Em 2010, Liu et al avaliaram o risco de progressão maligna de 138 lesões diagnosticadas como DBR e DAR. Após 5 anos de seguimento dos casos observou-se que as DAR exibiram uma chance 4,57 vezes maior de transformação maligna quando comparadas às lesões de DBR, sendo consideradas fator de risco independente de outras variáveis como álcool, fumo e gênero. Também foi apontada a utilidade do sistema binário na classificação de displasias na predição no risco de transformação maligna (Liu et al., 2010).

Tabela 2.1 - Critérios arquiteturais e celulares para diagnóstico e classificação das DEO segundo a OMS

Alterações arquiteturais	Alterações celulares
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose e Anisocitose
Perda de polaridade das células basais	Pleomorfismo nuclear
Papilas dérmicas em forma de gota	Pleomorfismo celular
Aumento no número de mitoses	Aumento relação núcleo/citoplasma
Mitoses superficiais anormais	Aumento nuclear
Disqueratoses	Aumento no número e tamanho dos nucléolos
Pérolas de queratina em papilas conjuntivas	Figuras de mitose atípicas

2.2.1 Biomarcadores em displasias epiteliais

Tabor menciona que os critérios histológicos como alterações arquiteturais e celulares da descrição das LO são subjetivos e geralmente há baixo consenso entre os patologistas. Além disso, a classificação da DEO não tem constante associação com a transformação maligna das LPM. Deste modo, tem sido constante a busca de marcadores moleculares com valor preditivo de malignidade (Tabor et al., 2003).

Diversos marcadores moleculares, usados sozinhos ou combinados, foram reconhecidos como importantes no estudo das DEO e carcinogênese. Estas proteínas estão envolvidas nas vias de sinalização, no ciclo celular, supressoras de tumor, evidenciam a estabilidade genômica, a ocorrência de apoptose, angiogênese e proliferação. Desta forma elas têm potencial para prever a estabilidade, regressão ou a progressão das LPM. Entretanto, apesar da busca constante por marcadores indicativos de potencial transformação maligna não há ainda marcadores moleculares que sozinhos ou em combinação com outros, tenham se

mostrado confiáveis para uso em rotina laboratorial de patologia (Pitiyage et al., 2009).

Os oncogenes são responsáveis pela proliferação celular e diferenciação e são considerados de extrema importância na tumorigênese. O fator de transformação do crescimento alfa (TGF- α) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) participam no crescimento normal e diferenciação dos queratinócitos (Pitiyage et al., 2009). Srinivasan e Jewell compararam estes dois anticorpos e observaram uma expressão significativa do TGF- α , notadamente em camadas basal e parabasal de DEO. Concluíram que o TGF- α poderia ser considerado um marcador precoce do CEC (Srinivasan; Jewell, 2001).

Outro grupo de oncoproteínas amplamente estudadas em CECs e LPM são as ciclinas/ciclinas quinase dependentes (CDK), responsáveis pelo ciclo celular. O complexo molecular formado por quinase-dependente-de-ciclina (CDK4/6) e ciclina D4 são responsáveis pela fosforilação e consequente inativação do gene retinoblastoma (Rb), permitindo o ciclo celular (Hodges; Smoller, 2002).

As ciclinas D1 e a CDK2 também são essenciais para o bom funcionamento do Rb e em conjunto com a CDK4, geram a proteína supressora tumoral 16 (p16) (Hodges; Smoller, 2002). A amplificação da ciclina D1 ou CDK4, ou a perda da atividade de CDK2, aparentemente tem o mesmo efeito da perda do gene Rb (Knudson, 2002).

Soni e colaboradores (2005) avaliaram o papel da ciclina D1, do p16 e da pRb nas DEO e observaram que a perda de expressão da p16 precede as alterações estruturais em mucosa e em contrapartida a superexpressão da ciclina D1 implicaria na progressão maligna (Soni et al., 2005).

A inativação do gene p16, localizado no 9p21, sugere anormalidades genéticas comumente associadas ao câncer. Este gene supressor de tumor foi observado nos casos de DEO e também está sendo considerado como um indicador da infecção pelo papiloma vírus humano em lesões epiteliais (HPV) (Pitiyage et al., 2009).

A proteína c-Jun é conhecida no controle do ciclo celular, atuando como um reguladora positiva do ciclo celular, e através de *crosstalk* com as vias da MAP-quinase e da proteína quinase B (PKB ou AKT), bloqueiam a atividade supressora

de tumor da p27 (Angel et al, 1991; Fillies et al, 2007). Estudos que avaliaram a atividade da c-jun na carcinogênese oral demonstraram que esta proteína é encontrada no citoplasma dos queratinócitos, passando para o núcleo nas áreas displásicas e CECs (Sousa et al., 2002, Turatti et al., 2005).

Outra via de sinalização também muito estudada é a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), PTEN (fosfatase homóloga à tensina deletada no cromossomo 10) e o AKT que estão frequentemente alteradas em diversas neoplasias malignas, incluindo as de cabeça e pescoço (Molinolo et al., 2009).

2.3 A via do PI3K-AKT-mTOR: Principais proteínas envolvidas

2.3.1 PI3K

As PI3Ks pertencem a uma família conservada de quinases lipídicas, classificadas em três classes com múltiplas subunidades e isoformas, sendo a classe I descrita como o grupo de proteínas que estão nitidamente envolvidas na tumorigênese (Vivanco; Sawyers, 2002; Yuan; Cantley, 2008). O PI3K se tornou um dos focos de pesquisa no câncer em meados dos anos 1980, quando foi observado que sua atividade era física e funcionalmente associada a transformação maligna associada a oncogenes virais, como os antígenos T médios do Poliomavirus (Vivanco; Sawyers, 2002).

PI3K é um heterodímero formado pela subunidade regulatória p85 e a subunidade catalítica p110, que fosforila o grupo hidroxil fosfoinosítídeos-3'. O mais bem caracterizado produto desta reação é a transformação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ou PIP3, que recruta o AKT para membrana plasmática, ativando a proliferação, crescimento e sobrevivência celular.

Esta reação é regulada negativamente pela desfosforilação do PTEN. (Faivre et al., 2006; Yuan; Cantley, 2008).

2.3.2 PTEN

O PTEN foi isolado e identificado inicialmente como um gene supressor de tumor no câncer de mama e glioblastomas. Atualmente sabe-se que a expressão do PTEN esta mutada ou perdida tanto em neoplasias de origem hereditárias como em casos espontâneos em variados tipos de câncer (Vivanco; Sawyers, 2002; Yuan; Cantley, 2008).

Mutações germinativas no PTEN podem ocasionar síndromes autossômicas dominantes hamartomatosas, como a síndrome de Cowden. A perda de um alelo do PTEN contribui para o crescimento de tumores, entretanto, experimentos com modelos animais demonstram que o PTEN é funcionalmente haplo-insuficiente, ou seja, a perda de ambos os alelos é incompatível com a vida (Yuan, Cantley, 2008). Uma das funções mais importantes do PTEN, no que se concerne a transformação maligna se dá através da regulação de PIP2/PIP3, sendo que esta fosforilação resultará no recrutamento do AKT para a membrana plasmática (Faivre et al., 2006).

2.3.3 AKT

A serina/treonina quinase B, o AKT ou proteína quinase B (PKB), possui um papel central na sobrevivência celular regulando a proliferação, crescimento, apoptose e funções metabólicas (Yuan; Cantley, 2008). O AKT apresenta 3

isoformas (AKT1, AKT2 e Akt3), que em geral são plenamente expressas. O AKT é ativado por um mecanismo que exige sua translocação até a membrana plasmática e a fosforilação das regiões Thr308 e Ser473 (Yuan; Cantley, 2008).

A forma fosforilada do AKT (pAKT), no câncer, é associada à sobrevivência celular pela interferência em diversos mecanismos de inibição das vias pró-apoptóticas, sendo que sua forma constitutivamente ativa resgata a apoptose PTEN-mediada. O mecanismo pelo qual o AKT atua na sobrevivência celular provavelmente é multifatorial, uma vez que esta proteína fosforila diretamente outras proteínas envolvidas na morte celular (Vivanco; Sawyers, 2002).

O ciclo celular também é influenciado pela participação do pAKT diretamente pela inativação de um inibidor das CDKs, o p21 e indiretamente via inibição do complexo p27/kip1 (Shtilbans et al., 2008).

O AKT em conjunto com a proteína alvo da rapamicina em mamíferos, o mTOR, influenciam profundamente a angiogênese tumor induzida, levando a um aumento dos fatores de transcrição mediadores da angiogênese: o fator induzido por hipóxia -1 α (HIF-1 α) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). A interação do AKT-mTOR e o papel da última no crescimento celular (crescimento da massa celular) são consideradas como algumas das melhores funções conservadas em mamíferos e (Faivre et al., 2006; Manning; Cantley, 2007).

2.3.4 mTOR

A rapamicina foi isolada em uma cultura de *Streptomyces*, por Suren Seghal em 1972, na Ilha de Pascoa (Rapa Nui). As primeiras características farmacológicas encontradas neste macrolídeo foram suas propriedades antifúngicas, mas logo foi observada sua capacidade inibitória na proliferação das células mamárias, incluindo linhagem de células neoplásicas e linfócitos (Dumont ; Bischoff, 2012).

A proteína FK506 ligante 12 (FKBP12), uma proteína endógena participante da família das imunofilinas que quando associada à rapamicina possui efeito inibitório do mTOR (Faivre et al., 2006; Dumont ; Bischoff, 2012).

O mTOR ou FRAP1, é uma serina/treonina quinase que atua como uma “chave mestra” regulando o crescimento celular, síntese proteica, iniciação da transcrição de RNAm e tradução de proteínas de acordo com a disponibilidade de nutrientes, além disso também organiza o citoesqueleto da actina e o tráfego intracelular da membrana (Vivanco; Sawyers, 2002; Faivre et al., 2006).

O mTOR possui dois tipos de complexos, o primeiro é formado pela proteína associada a rapamicina de mTOR (mTORC1) e o segundo pela proteína insensível a rapamicina de mTOR (mTORC2), que possuem proteínas específicas (RAPTOR e RICTOR respectivamente) e funções distintas, sendo que o mTORC1 atua principalmente nas funções metabólicas celulares e o mTORC2 participa na organização do citoesqueleto (Faivre et al., 2006; Dumont; Bischoff, 2012).

Alguns estudos relatam que a FKBP12 em associação a rapamicina inibe diretamente mTORC1, enquanto que em mTORC2 a inibição somente ocorre em tipos específicos de linhagens celulares ou após tratamentos prolongados com a rapamicina (Dumont; Bischoff, 2012; Lamming et al., 2012).

O mTORC1 modula tanto a síntese proteica através da ativação da proteína ribossomal S6 quinase (S6), que atua principalmente no estímulo na tradução de RNA mensageiro (RNAm), quanto na inibição da proteína ligante 1 do fator de iniciação eucariótica 4E(4EBP1/ eIF4E), um repressor da tradução do RNAm, a fosforilação destes substratos resultam no aumento significativo na tradução de um grupo de genes necessários para o crescimento celular (Vivanco; Sawyers, 2002; Manning; Cantley, 2007; Molinolo et al., 2007).

2.4 A via do PI3K-AKT-PTEN no câncer

Resumidamente, podemos dizer que fatores de crescimento (como o VEGF, por exemplo) e hormônios ativam a via PI3K-AKT-mTOR através da PI3K, que através das suas subunidades p85 e p110 recrutam o PI3K para a membrana celular, onde ocorre a conversão do PIP2 em PIP3. Em células normais, o PTEN fosforila o PIP3 mantendo concentrações constantes de PIP2 (Faivre et al., 2006).

Em células neoplásicas, podem ocorrer alterações que inativam o PTEN (perda de heterozigose, mutação ou perda de expressão, por exemplo) levando ao aumento das concentrações de PIP3, ativando as proteínas fosfatidilinositol kinase dependente 1 (PDK-1), que leva à fosforilação e ativação do AKT. O pAKT, inativa o complexo supressor de tumor esclerose tuberosa 1/2 (TSC1/2) que em conjunto com as moléculas GTPase-GAP e Rheb1 ativam o mTOR (Vivanco; Sawyers, 2002; Molinolo et al., 2009). O mapa da via de sinalização do PI3K-AKT-mTOR esta representado na figura 2.1.

2.5 A expressão da via do PI3K-AKT-mTOR em carcinomas espinocelulares e lesões potencialmente malignas

Atualmente a identificação da via do PI3K-AKT-mTOR através da imuno-histoquímica, é usada para se caracterizar não somente comportamento destas proteínas frente em diferentes tumores, mas também auxiliar na investigação in vitro e in vivo das possíveis terapias-alvo a serem desenvolvidas no tratamento do câncer. A utilização de marcadores imuno-histoquímicos em diferentes neoplasias malignas tem sido amplamente utilizados no monitoramento de pacientes envolvidos em estudos clínicos que avaliam eficácia dos inibidores das varias proteínas participantes da via do PI3K-AKT-mTOR (Tabernero et al., 2008; Soria et al., 2009; Baselga et al., 2009, Fang et al., 2011).

Em estudo em que foi avaliada a expressão do AKT nas suas diferentes isoformas, AKT1, AKT2, E AKT3, pAKT, pan-AKT, foi observado que a isoforma 2 (AKT2) e o pAKT apresentaram uma superexpressão nos CECs, sugerindo sua participação na carcinogênese (Iamaroon; Krisanaprakornkit, 2009).

A forma fosforilada do AKT, também foi analisada por Wu et al, 2009, onde foram avaliados pacientes que possuíam como habito de mascar a noz- de-areca e o tabagismo. Entre os 30 casos de CEC, 30 casos de LO e 10 casos de mucosa normal, o padrão de imunorreatividade observado nas camadas basal e parabasal nas lesões displásicas e com células com marcação nuclear e citoplasmática, distribuídas de forma difusa em CECs (Wu et al., 2009).

Na pesquisa onde foram somente analisados espécimes oriundos da língua que exibiam displasia e carcinomas superficialmente invasivos, a expressão do pAKT também foi positiva na camada espinhosa, com expressão em citoplasma e mais amiúde em núcleo. Já o epitélio normal não exibiu imunorreatividade (Watanabe et al., 2009).

Em trabalhos desenvolvidos no laboratório da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, foi estudada a relação da pAKT com outras proteínas participantes da carcinogênese oral como a TWIST. Foram comparados

30 casos de DEO com 20 casos de CEC e 10 casos de MN, provenientes de pacientes exclusivamente tabagistas. A marcação da pAKT nas lesões estudadas foi predominantemente nuclear e restrito à camada basal em MN, presente em todas as camadas em DEO e difuso em CECs, sendo que nestes últimos a marcação era tanto nuclear quanto citoplasmática, foi concluído estas proteínas serviriam como preditoras da transformação maligna (Silva et al., 2012). O mesmo padrão de marcação da pAKT em leões oriundas de pacientes tabagistas foi observado em estudos anteriormente realizados (Pontes et al., 2009; Wu et al., 2009).

A aplicabilidade da reação de imuno-histoquímica na identificação do pAKT em diferentes tumores, incluindo carcinomas de cabeça e pescoço e orais, foi revisada por Shtilbans e colaboradores em 2008, e foi concluído que a marcação positiva para o pAKT teria uma utilidade maior para a individualização de terapia e valor prognóstico do que como ferramenta no diagnóstico diferencial das lesões (Shtilbans et al., 2008).

Em estudo preliminar em que se foi avaliada a expressão imuno-histoquímica do mTOR e seus substratos pS6 e 4EBP1 em CEC foi observada uma marcação predominantemente citoplasmática, com as proteínas mTOR e o pS6 mais expressas em carcinomas indiferenciados, enquanto que a imunorreatividade de 4EBP1 diminuiu nestes tipos de carcinomas (Liu et al., 2007).

As proteínas 4EB-P1, eIF4E e S6K que são reguladas negativamente por mTOR são muitas vezes associadas a transformação maligna. Alguns estudos mostram que a superexpressão da eIF4E em margens cirúrgicas de CECs tidas com margens livres pode ser considerada como maiores taxas de recorrência (Nathan et al., 2007).

Já a forma fosforilada do mTOR (pmTOR), em conjunto com a análise do HIF-1 α e VEGF foram associados não somente a maiores graus de malignidade nos CEC, mas também a maiores taxas de invasão. No entanto, na tentativa de se relacionar o padrão de marcação imuno-histoquímica às taxas de sobrevivência dos pacientes, não foi observada uma associação direta entre estas variáveis (Naruse et al., 2011).

Clark e colaboradores, avaliaram comparativamente a expressão do p-mTOR, p-AKT, p-S6 e p-4EBP1 em 72 casos de tumores de cabeça e pescoço através das técnicas de *western blot* e imuno-histoquímica. Os autores observaram que o p-mTOR e p-AKT podem ser considerados biomarcadores confiáveis em ambas as técnicas, apresentando altos valores de sensibilidade. Outro resultado importante foi uma positividade maior para as proteínas estudadas em zonas juncionais quando comparadas aos tumores, demonstrando quais áreas seriam mais adequadas para avaliação com estes marcadores (Clark et al., 2010).

Entre outras moléculas cuja fosforilação é regulada através do AKT, o mTOR tem sido amplamente estudado como agente terapêutico em diversos tumores, incluindo carcinomas de cabeça e pescoço, exibindo resultados promissores (Raymond et al., 2004; Fury et al., 2012). Além do mTOR controlar o metabolismo celular e angiogênese, o mTOR também tem um profundo impacto sobre a apoptose (Faivre et al., 2006).

Em estudo recente, foram estudadas algumas das proteínas participantes da via do AKT- mTOR e da p16 (proteína preditora da infecção pelo HPV) em *tissue microarrays* oriundos de CECs de cabeça e pescoço, sendo estas comparadas com tumores cervicais. As reações foram validadas em culturas de linhagens dos respectivos tumores e induzidas em modelos animais para a avaliação da tumorigênese e resposta a terapia com inibidores de mTOR. A expressão significativa das proteínas p-AKT e p-S6 foram observadas nas amostras positivas para o HPV e após o tratamento dos animais com os inibidores de mTOR, houve uma diminuição destes tumores, sugerindo que estes fármacos poderão ser considerados no tratamento de carcinomas associados ao HPV (Molinolo et al., 2012).

O conhecimento das alterações moleculares e papel do p-mTOR e de seus substratos nas LPM pode ser útil no entendimento da transformação dessas lesões em CECs, bem como compreender o estudo de terapias-alvo nestas lesões.

3 PROPOSIÇÃO

Conhecer e comparar o padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas envolvidas na via de sinalização PI3K-AKT-mTOR em DEO de diferentes graus, comparando-as com CECs, hiperqueratoses irritativas e mucosa normal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Dados gerais e critérios de inclusão

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP (CEP-FOUSP: 204/2010, ANEXO A).

Foram selecionados 186 biópsias de mucosa oral, exceto de lábio, provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia Cirúrgica da FOUSP, por meio do nome do diagnóstico emitido pelos patologistas do serviço. Os nomes de diagnósticos procurados foram: “Displasia epitelial”, “Hiperqueratose”, “Hiperqueratose irritativa”, “Carcinoma epidermoide”, “Gengiva”, “Mucosa bucal”.

Como controles foram utilizados espécimes provenientes de carcinomas ductais de mama e CECs.

Foram excluídos os espécimes cujo tamanho do tecido emblocado não fosse suficiente para obtenção de no mínimo 5 cortes histológicos semelhantes. Os casos elegidos foram revistos ao microscópio ótico, pelo autor deste trabalho e por sua orientadora e foram divididos em 5 grupos a saber:

- 34 espécimes de carcinoma espinocelular (grupo CEC)
- 50 espécimes de displasia de alto risco (grupo DAR) (Kujan et al., 2006)
- 48 espécimes de displasia de baixo risco (grupo DBR) (Kujan et al., 2006)
- 33 espécimes de hiperqueratose irritativa (grupo HI)
- 21 espécimes de mucosa normal (grupo MN)

Foram compiladas informações clínicas, relativas a sexo e idade do paciente, localização, aspecto clínico e duração da lesão, por meio da ferramenta de busca do programa de computador Laudo & imagem ®.

Todas as lâminas dos casos de displasia epitelial oral (DEO) selecionados foram revisadas por 2 patologistas que classificaram as displasias em baixo risco (BR) e em alto risco (AR), de acordo com a classificação binária preconizada por Kujan e colaboradores (2006). Os casos considerados divergentes foram discutidos entre os patologistas.

4.2 Imuno-histoquímica

Para a análise imuno-histoquímica, foram obtidos cortes de 4 µm de espessura dos 186 blocos de parafina selecionados. A tabela 4.1 fornece informações dos anticorpos utilizados tais como fabricante, tempo de incubação e tratamento.

Os cortes foram desparafinizados e hidratados em xilol e álcool e tratados em solução de ácido cítrico (pH 6,0) pré-aquecidos em banho-maria a 95°C por 30 minutos, para recuperação antigênica. Em seguida, os cortes foram resfriados até a temperatura ambiente, sendo lavados com água corrente e destilada e imersos em solução de metanol e peróxido de hidrogênio 20 volumes (2 banhos de 15 minutos) para inibição da peroxidase endógena. Após nova lavagem com água destilada, os cortes foram imersos em TRIS (pH 7,6) por 5 minutos e então incubados com os anticorpos designados para o estudo (Tabela 4.2). Para os cortes cujo anticorpo primário foi o pAKT, a incubação do anticorpo de ligação e do sistema e terciário foram feitas incubações com 30 minutos de duração (Universal LSAB®+ Kit/HRP, DAKO Carpinteria, CA, USA)). Para os demais cortes, foi realizada a incubação com polímero (*EnVision*®+ Dual Link System-HRP, Dako, Carpinteria, CA, USA) durante 30 minutos.

As reações foram reveladas utilizando-se o kit de substrato diaminobenzidina (Liquid Dab+ Substrate - Chromogen System, Dako, Carpinteria, CA, USA) por 10 minutos e lavados com TRIS e depois com água destilada. Por fim as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Meyer por 5 minutos, lavadas em água destilada, desidratadas (bateria álcool 85% - xilol) e montadas em um sistema automatizado de montagem (Tissue-Tek® Film® Coverslipper).

Tabela 4.1 - Anticorpos utilizados no estudo

pAKT 1/2/3 ^(Thr 308)	Fabricante	Diluição	Tratamento			Incubação
p-mTOR ^(Ser2448)	Santa Cruz	1:100	Ácido	cítrico	ph	40 min
			6.0			
pS6 ^(Ser240/244)	Cell	1:100	Ácido	cítrico	ph	60 min
	signaling		6.0			
p4EBP1 ^(Thr37/46)	Cell	1:800	Ácido	cítrico	ph	60 min
	signaling		6.0			
pAKT 1/2/3 ^(Thr 308)	Cell	1:800	Ácido	cítrico	ph	60 min
	signaling		6.0			

A marcação dos diversos anticorpos foi considerada positiva quando as células apresentavam cor acastanhada. Para os anticorpos p-mTOR, pS6 e p4EBP1 foi considerada a imunorreatividade encontrada no citoplasma e/ou na membrana celular. No caso do anticorpo pAKT, foram consideradas as marcações de núcleo, citoplasma e /ou membrana celular (Oh et al., 2012).

A análise semi-quantitativa foi realizada por um pesquisador (FMM) previamente treinado. Duas análises foram realizadas: Uma que considerou os espécimes positivos ou negativos para cada anticorpo usado. A outra análise revelou a porcentagem de células imunorreativas divididas em graus. Neste caso foi

calculada a relação entre células marcadas pela totalidade de células observadas. Imagens de campos da lâmina mais corada (*hot spot*) foram capturadas em microscópio óptico com vídeo-câmera de alta resolução (AxioCam®, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) ao aumento de 400x . As imagens foram visualizadas em um monitor de vídeo de 15 polegadas. Em cada lâmina foram contadas 500 células. A divisão entre o número de células marcadas vezes 100 pelo total de 500 células resultou na porcentagem de células marcadas.

As porcentagens de células marcadas obtidas durante as contagens das lâminas para os diferentes anticorpos foram distribuídas em quatro graus descritos na tabela 4.2:

Tabela 4.2 - Graduação da quantificação de imunorreatividade desenvolvida para este estudo

Grau	Intervalo percentual de células imuno reativas
0	0 - 5% das células positivas
1	> 5% e ≤ 25% das células positivas
2	>25% e ≤ 50% das células positivas
3	>50% das células positivas

4.4 Análise estatística

As variáveis incluídas nesta análise estatística foram:

- a) A presença ou ausência de células imunorreativas para proteínas “pAKT”, “pmTOR”, “pS6” e “p4EBP1” (variáveis dicotômicas)
- b) O grau de porcentagem de células positivas, na forma de escore (0, 1, 2, 3).
- c) Dados demográficos tais como, “cor da pele”, “sexo”, “idade dos pacientes”, e “Sítio”.

Variáveis categóricas (“cor da pele”, “sexo”, “sítio”) foram descritivas através de frequências relativas e absolutas, e as contínuas (“idade dos pacientes”) por meio de médias e desvios padrão. As comparações dessas entre os 5 grupos de lesões foram avaliadas pelos testes Qui-quadrado (Agresti, 2002) e teste F da ANOVA com um fator, que em nosso caso era a positividade para as proteínas do estudo (Neter et al., 1996), respectivamente.

Posteriormente, ajustou-se um modelo de regressão multinomial com ligação log (Venables; Ripley, 2002; Agresti, 2002) para discriminar os grupos segundo as variáveis explicativas (de valores significativos) associadas ao desfecho univariadamente segundo os testes iniciais.

Para as análises, utilizou-se nível de significância de 5% e os resultados foram obtidos com auxílio do software estatístico R 2.15.3 (R Core Team, 2012). Os pacotes ggplot2 (Wickham, 2009), para produção dos gráficos, e nnet (Venables; Ripley, 2002), para ajuste do modelo, foram requeridos além dos pacotes básicos do software.

5 RESULTADOS

5.1 Análise demográfica

As características demográficas de cada grupo estudado, tais como “Sexo”, “Idade” “Sítio”, “Cor da pele” e “local da lesão” estão resumidas na tabela 5.1 De modo geral houve diferença estatisticamente significativa na idade dos pacientes incluídos nos diferentes grupos de estudo, sendo que o grupo de CEC e DAR e DBR tinham pacientes mais idosos.

As características de sexo e cor da pele estavam igualmente distribuídas entre todos os grupos. Em relação ao local das lesões, a língua foi o sítio prevalente em 55% de todos os casos (Tabela 5.1).

Os resultados da análise que considerou os espécimes positivos ou negativos para cada anticorpo usado em todos os grupos de estudo, está ilustrado no gráfico 5.1 e descrito na tabela 5.2. Os valores de p (ou nível descritivo) inferiores a 5% indicam que ao nível de significância pré-estabelecido há associação entre a variável testada e os grupos. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e a presença das proteínas, exceto para a marcação da proteína pS6.

Ao serem avaliados somente os grupos de DBR, DAR e CEC (Tabela 5.3), com relação a positividade às proteínas do estudo, é observado que apenas a pAKT ($p=0,046$) foi considerada significativa neste grupo de lesões.

Gráfico 5.1 - Relação da porcentagem de positividade/negatividade das proteínas da via do AKT-mTOR em todas as lesões estudadas

Tabela 5.3 - Comparações entre os grupos segundo positividade das proteínas em relação às DEO e CEC

Proteína	Positividade	Grupo								Valor p
		CEC (n=34)		DAR (n=50)		DBR (n=48)		Total (n=132)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
pAKT	Sim	25	83,3	34	68	27	56,2	86	67,2	0,046 ²
	D	4	11,8	0	0	0	0	4	3	
pmTOR	Sim	15	50	14	28	14	29,2	43	33,6	0,093 ²
	D	4	11,8	0	0	0	0	4	3	
pS6	Sim	24	77,4	37	74	31	67,4	92	72,4	0,597 ²
	D	3	8,8	0	0	2	4,2	5	3,8	
p4EBP1	Sim	14	50	22	44	20	41,7	56	44,4	0,777 ²
	D	6	17,6	0	0	0	0	6	4,5	

(1) Teste F da ANOVA   (2) Teste Qui-quadrado   D=Desconhecido

O resultado que considerou a porcentagem de células imunorreativas entre os grupos de CEC e DEO divididas em graus está descrita na tabela 5.4. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, graus e a positividade somente para a proteína pmTOR ($p=0,024$). A relação entre a divisão em graus das DEO e a positividade para as proteínas em todos os grupos do estudo esta demonstrado no ANEXO B.

Tabela 5.4 - Comparações entre positividade para as proteínas das DEO e CECs classificada em graus

Proteína	Graus	CEC (n=34)		DAR (n=50)		DBR (n=48)		Total (n=132)		Valor p
		N	%	N	%	N	%	N	%	
pAKTC_	0	12	40	34	68	29	60,5	75	58,6	0,227 ²
	1	2	6,7	1	2	3	6,2	6	4,7	
	2	3	10	2	4	1	2,1	6	4,7	
	3	13	43,3	13	26	15	31,2	41	32	
	D	4	11,8	0	0	0	0	4	3	
pAKTN_	0	24	80	45	90	45	93,7	114	89	0,359 ²
	1	0	0	1	2	1	2,1	2	1,6	
	2	4	13,3	2	4	1	2,1	7	5,5	
	3	2	6,7	2	4	1	2,1	5	3,9	
	D	4	11,8	0	0	0	0	4	3	
pmTOR	0	15	50,1	38	76	37	77,1	90	70,3	0,024 ²
	1	4	13,3	3	6	6	12,5	13	10,2	
	2	4	13,3	6	12	4	8,3	14	10,9	
	3	7	23,3	3	6	1	2,1	11	8,6	
	D	4	11,8	0	0	0	0	4	3	
pS6_	0	7	22,6	13	26	15	32,6	35	27,6	0,215 ²
	1	1	3,2	0	0	3	6,5	4	3,1	
	2	1	3,2	8	16	4	8,7	13	10,2	
	3	22	71	29	58	24	52,2	75	59,1	
	D	3	8,8	0	0	2	4,2	5	3,8	
p4EBP1_	0	14	50	31	62	30	62,5	75	59,6	0,418 ²
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	5	10	5	10,4	10	7,9	
	3	14	50	14	28	13	27,1	41	32,5	
	D	6	17,6	0	0	0	0	6	4,5	
(1) Teste F da ANOVA					(2) Teste Qui-quadrado				D=Desconhecido	

A análise em graus, da marcação da proteína pS6 mostrou que em casos de CEC, DAR e DBR apresentam em pelo menos 52,2% dos casos a proteína foi identificada em quantidade mais elevada, contra cerca de 30% dos grupos controle.

Ao serem avaliadas as probabilidades dos pacientes de determinada faixa etária apresentarem as lesões estudadas, foram aplicados testes de modelos multinomiais. Foram excluídos desta análise as variáveis não significativas para as lesões como sexo, cor da pele e positividade para a pS6. A figura 5.1 demonstra a probabilidade da ocorrência das lesões, de acordo com a idade e positividade para os anticorpos estudados (Figura 5.1).

Para interpretar o gráfico baixo, fixe uma idade, e a presença de cada proteína e compare as probabilidades de alocação. Por exemplo, indivíduos com 40 anos que não apresentem nenhuma das proteínas tem cerca de 50% de chance de pertencer ao grupo MN, cerca de 30% de pertencer ao grupo H, menos de 1% de probabilidade para o desenvolvimento de CEC.

Figura 5.1 - Estimativas da probabilidade de pertencer ao determinado grupo de lesões dado informações sobre pAKT, p4EBP1, pmTOR e idade

5.2 pAKT

Nos casos positivos para proteína pAKT, geralmente foi encontrada a imunorreatividade no citoplasma e núcleo. As amostras de MN e HI não apresentaram imunorreatividade significativa para a pAKT.

Foi encontrada imunorreatividade para a pAKT em apenas 1 caso de HI (3,1%) classificado como grau “1”. Os demais casos foram considerados negativos.

Nos casos de DBR onde foram realizadas as reações para a pAKT, verificou-se não somente a positividade citoplasmática (Graus “1” 6,2%, “2” 2,1% e 3 31,2%), como também a imunorreatividade nuclear em 2,1% dos casos graus “2” e “3”. Considerando-se as camadas do epitélio, as mais superficiais foram desprezadas na contagem. As células marcadas positivamente para o pAKT concentrava-se na camada espinhos. Apenas algumas células positivas foram notadas na camada basal (Figura 5.2 A).

Nas DAR, a positividade da pAKT foi observada principalmente no citoplasma, sendo classificada como graus “1” 2%, “2” 4% e “3” 26%. A positividade nuclear foi identificada nos graus “1” 2%, “2” 4% e “3” 4%. Por vezes foi identificada a presença de células esparsas positivas para pAKT na camada basal, notadamente em mitoses (Figura 5.1 A).

Nos CEC, a marcação citoplasmática para o pAKT, foi observada no grau “1” em 6,7% dos casos, “2” em 10% e “3” em 43,3%. Para a marcação nuclear do pAKT notamos que 13,3% dos casos teve marcação grau “2” e 6,7% grau “3”. A expressão da pAKT das células neoplásicas era maneira difusa, com as células marcadas localizadas tanto na periferia quanto no centro de ilhotas epiteliais, com forte imunorreatividade em figuras mitóticas. O gráfico 5.1 apresenta a porcentagem dos casos positivos para a proteína pAKT (Gráfico 5.2) e a relação entre a positividade nuclear e citoplasmática da pAKT esta representada no gráfico 5.3.

Gráfico 5.2 - Distribuição de células com marcação citoplasmática para a proteína pAKT, por grupo de lesões

Gráfico 5.3 - Distribuição de células com marcação nuclear para proteína pAKT por grupo de lesões

5.3 pmTOR

Nenhuma amostra de MN e HI apresentou positividade para a pmTOR.

Nas DBR, a proteína pmTOR foi identificada no citoplasma dos casos graduados como “1” em 12,5%, “2” em 8,3%, “3” em 2,1% dos casos. As células positivas estavam localizadas principalmente na camada espinhosa do epitélio (Figura 5.1 B).

A proteína pmTOR foi identificada no citoplasma e membrana celular dos casos de DAR, graduados como “1” em 6% dos casos, “2” em 12% e 3 em 6% dos casos. Por vezes, foi observada a imunorreatividade para a pmTOR em células esparsas na camada basal (Figura 5.1 B).

Já nos CECs, os casos positivos para a pmTOR foram graduados como “1” em 13,3%, “2” em 13,3%, e “3” em 23,3% dos casos. A expressão em células neoplásicas foi tanto difusa quanto focal. O gráfico 5.4 apresenta a porcentagem dos casos marcados pela pmTOR.

Gráfico 5.4 - Distribuição de células positivas da proteína pmTOR por grupo de lesões

5.4 pS6

Nos casos de MN, os queratinócitos imunorreativos estavam localizados em todas as camadas do epitélio, por vezes exibindo marcação mais forte em regiões adjacentes a intenso infiltrado inflamatório crônico. Na avaliação semi-quantitativa dividida em graus, os casos que foram marcados positivamente para a pS6 foram classificados como grau “3” em 35% dos casos e em grau “2” em 10%.

Nos casos de HI, houve positividade citoplasmática em 22,6% no grau “1” e em 32,3% grau “3”, foi observada geralmente a imunorreatividade em queratinócitos localizados na camada espinhosa e parabasal, sem marcação na camada basal.

As DBR cujas células exibiram positividade citoplasmática para a pS6 foram classificadas como grau “1” em 6,5% dos casos, grau “2” em 8,7% e grau “3” em 52,2% dos casos. As células positivas estavam localizadas principalmente na camada espinhosa, estendendo-se até a camada basal (Figura 5.2 C).

Na análise semi-quantitativa classificada em graus, os casos de DAR que exibiram positividade citoplasmática para a pS6, foram classificadas como grau “2” em 16% e grau “3” em 58% dos casos. As células marcadas estavam distribuídas em todas as camadas do epitélio (Figura 5.3 C).

Os casos de CEC marcados com a pS6, foram graduados como “1” em 3,2%, “2” em 3,2% e “3” em 71% dos casos. A positividade para a pS6 também foi observada em figuras de mitose e pérolas de queratina (Figura 5.4 C). O gráfico 5.2 apresenta a porcentagem dos casos positivos para a proteína pS6 (Gráfico 5.5).

Gráfico 5.5- Distribuição de células positivas da proteína pS6 por grupo de lesões

5.5 p4EBP1

Todos os casos de MN foram negativos para a p4EBP1. Já nos casos de HI os casos positivos foram classificados como graus “1” em 6,7% e em “3” em 16,7% dos casos. A expressão da p4EBP1 foi predominantemente encontrada nas camadas espinhosa e parabasal.

Nos espécimes onde foi observada a imunorreatividade citoplasmática para a p4EBP1 nas DBR, foram classificadas em grau “2”, em 10,4% e em grau “3”, 27,1% dos casos. Não foram identificados casos classificados como grau “1”. Os queratinócitos que apresentaram positividade para 4EBP1 estavam principalmente na camada espinhosa, e esparsos na camada basal (Figura 5.1 D).

Nos espécimes onde foi observada a imunorreatividade citoplasmática para a p4EBP1, as DAR foram classificadas em grau “2” em 10% dos casos e grau “3” em 28%. Não foram identificados casos classificados como grau “1”. Os queratinócitos positivos estavam, na maioria das vezes, situados na camada espinhosa e mais raramente, na camada basal (Figura 5.2 D).

Já nos casos de CEC, a positividade para a proteína p4EBP1 foi classificada somente como grau “3” em 50% dos casos. A marcação também foi positiva em pérolas de queratina. O gráfico 5.6 apresenta a porcentagem dos casos positivos para a proteína p4EBP1 (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 - Distribuição de células positivas da proteína p4EBP1 por grupo de lesões

Figura 5.2 - Padrão de imunorreatividade dos anticorpos estudados em CEC com pAKT (A), pmTOR (B), pS6 (C) e p4EBP1 (D)

Figura 5.3 - Padrão de imunorreatividade dos anticorpos estudados em DAR para pAKT (A), pmTOR (B), pS6 (C) e p4EBP1 (D)

Figura 5.4 - Padrão de imunorreatividade dos anticorpos estudados em DBR para pAKT (A), pmTOR (B), pS6 (C) e p4EBP1 (D)

Ao serem avaliadas as frequências das combinações de positividade dos anticorpos, é observada a maior prevalência da positividade para a pS6 (37%), seguida da relação pS6+ e pAKT+ (20%). A tabela 5.3 demonstra as frequências das combinações entre as proteínas (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 – Frequência das combinações de positividade e negatividade observadas para as proteínas nos grupos estudados

Proteínas				Grupos											
pAKT	pmTOR	pS6	p4EBP1	CEC		DAR		DBR		H		MN		Total	
				N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	Não	Não	Não	0	0,0	4	14,3	3	10,7	11	39,3	10	35,7	28	100
Não	Não	Não	Sim	0	0	1	33,3	1	33,3	1	33,3	0	0	3	100
Não	Não	Sim	Não	2	5,41	6	16,2	7	18,9	13	35,1	9	24,3	37	100
Não	Não	Sim	Sim	1	7,14	4	28,6	6	42,9	3	21,4	0	0	14	100
Não	Sim	Não	Não	1	33,3	1	33,3	1	33,3	0	0	0	0	3	100
Não	Sim	Não	Sim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	100
Não	Sim	Sim	Não	0	0	0	0	2	100	0	0	0	0	2	100
Não	Sim	Sim	Sim	1	50	0	0	1	50	0	0	0	0	2	100
Sim	Não	Não	Não	3	30	2	20	5	50	0	0	0	0	10	100
Sim	Não	Não	Sim	1	20	3	60	0	0	1	20	0	0	5	100
Sim	Não	Sim	Não	4	20	10	50	6	30	0	0	0	0	20	100
Sim	Não	Sim	Sim	1	9,1	6	54,5	4	36,4	0	0	0	0	11	100
Sim	Sim	Não	Não	0	0	1	25	3	75	0	0	0	0	4	100
Sim	Sim	Não	Sim	1	25	1	25	2	50	0	0	0	0	4	100
Sim	Sim	Sim	Não	1	20	4	80	0	0	0	0	0	0	5	100
Sim	Sim	Sim	Sim	4	25	7	43,8	5	31,3	0	0	0	0	16	100

A análise de regressão logística univariada mostrou a relação entre a positividade para as proteínas do estudo entre os grupos de lesões. Assim sendo, todas as proteínas testadas estão de certa forma associadas à presença de câncer e as displasias. O gráfico 5.7 ilustra essa diferença.

Gráfico 5.7 – Representação gráfica do teste de regressão logística univariada com os intervalos de confiança em todas as lesões estudadas (MN=mucosa normal; HI= hiperqueratose irritativa; DBR=displasias de baixo risco; DAR=displasias de alto risco; CEC=carcinoma espinocelular)

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve por objetivo conhecer o padrão da expressão imuno-histoquímica das proteínas envolvidas na via de sinalização PI3K-AKT-mTOR em CEC, DAR, DBR, HI e MN. Apesar de não termos observado um padrão único de marcação dentro de um grupo específico de lesão, houve um predomínio, percebido pelo aumento progressivo de imunorreatividade, de forma que na mucosa normal poucos foram os espécimes marcados pelos anticorpos pAKT, pmTOR, 4EBP1, enquanto que nas hiperqueratoses observamos uma expressão em maior número de casos e assim consecutivamente nas DBRs , DARs, e CECs.

Nos espécimes de MN foi observada positividade somente para a proteína pS6 que foi expresso no citoplasma de 50% dos casos, sendo que por vezes essa marcação era mais notada em regiões próximas a intenso infiltrado inflamatório crônico. O mesmo ocorreu nas HI, com mais da metade dos casos (54,8%) positivos para a pS6.

O papel da expressão da pS6 em lesões reativas é bem demonstrado em trabalhos que avaliam o papel da via do PTEN-AKT-MTOR em pacientes com síndromes hamartomatosas como a Síndrome de Cowden. Esta síndrome é causada pela heterozigose do PTEN, sendo que alterações mucocutâneas clássicas são os fibromas orais, triquelemomas faciais múltiplos e queratoses acrais (Faivre et al., 2006; Oliveira et al., 2010).

No caso clínico descrito por Oliveira e colaboradores, foi observado que as lesões orais em um paciente com Síndrome de Cowden exibiam histologicamente hiperqueratose, acantose e moderado infiltrado inflamatório crônico. Foram realizadas reações imuno-histoquímicas para o PTEN e a pAKT e foi observada a positividade somente para a pAKT, sugerindo a alteração do gene supressor de tumor PTEN, que é comum nesta síndrome (Oliveira et al., 2010).

Squarize et al em 2008, avaliaram o papel da rapamicina na quimioprevenção e tratamento de ratos heterozigóticos para PTEN, foram quantificados através de *Western Blot* e também avaliadas pela técnica da imuno-histoquímica, a pAKT e a

pS6 para se monitorar e eficácia do tratamento. Foi observado clinicamente que as lesões mucocutâneas desapareceram e houve um decréscimo significativo dos marcadores utilizados (Squarize et al., 2008).

Nos casos de HI o padrão de marcação da p4EBP1 observada foi similar ao da pS6, com células positivas localizadas principalmente nas camadas parabasal e espinhosa do epitélio. Em todos os casos de MN e HI que houve alguma marcação, esta ocorreu ou apenas para a proteína pS6 ou para a p4EBP1, nunca simultaneamente.

Degen e colaboradores avaliaram a relação entre a expressão da pS6, p4EBP1 e eIF4E e a via de sinalização da EGFR-MAPK. Foram estudados espécimes de tecidos normais, displásicos e no CEC, através das técnicas de *Western Blot* e imuno-histoquímica. Foi observado que não houve diferenças do percentual de positividade entre todos os grupos de lesões estudadas. Tanto em tecidos normais quanto displásicos, foi notada a expressão predominante da p4EBP1 e da pS6 em camadas parabasais, com esparsas células na camada basal (Degen et al., 2012).

Praticamente não observamos positividade para a pmTOR e pAKT nos grupos de MN e HI. Alguns autores que avaliaram estas proteínas principalmente em DEO e CECs e que utilizaram grupos controle observaram geralmente que em tecidos normais, a imunorreatividade era mínima ou ausente e restrita ao citoplasma e membrana (Watanabe et al., 2009; Naruse et al., 2011).

Nos casos das DBR, observou-se um aumento da imunorreatividade não somente para pS6 (67,4%), mas também para as demais proteínas, com 56,2% para a pAKT, p4EBP1 (41,7%) e pmTOR (29,2%), quando comparado com lesões reativas e mucosa normal. O padrão de marcação nestas lesões é predominantemente citoplasmático, sendo que queratinócitos imunorreativos estavam localizados em grande maioria na camada espinhosa e parabasal, sendo a positividade observada em esparsas células localizadas na camada basal. No casos positivos para a pAKT também foi observada marcação nuclear.

Quando observamos em conjunto o perfil de reatividade às proteínas, dos dois grupos de displasias, DAR e DBR, em comparação ao grupo de CEC notamos aumento consistente da marcação neste último grupo, o que nos permite apoiar o

conhecimento já estabelecido sobre o papel desta via na carcinogênese (Watanabe et al, 2009; Wu et al., 2009; Clark et al., 2010; Naruse et al., 2011; Chaisuparat et al., 2012).

Mais casos de DAR foram imunorreativos que casos de DBR. Essa diferença foi estatisticamente significativa apenas para o pAKT. Nossa metodologia não nos permite concluir que esse diferente perfil corresponda a uma tendência de malignização, mas pode sugerir que estudos prospectivos futuros pesquisem estas proteínas como indicadores de malignização.

Poucos trabalhos na literatura avaliam o papel da via do PI3K-AKT-mTOR nas DEO. Trabalhos prévios, que também estudaram displasias orais verificaram que a pAKT mostrou padrão de marcação similar ao encontrado em nosso estudo, com as células displásicas geralmente localizadas nas camadas basal e parabasal, com imunorreatividade nuclear e citoplasmática (Watanabe et al, 2009; Wu et al., 2009).

Clark e colaboradores, avaliaram a expressão imuno-histoquímica da pmTOR, p4EBP1, pS6 e pAKT em regiões adjacentes a CECs de região de cabeça e pescoço e observaram que a positividade nestas áreas foi maior do que nos tumores com p-AKT (94,1% vs. 72,7%), p-mTOR (81,3% vs. 60,0%), p-S6 (57,9% vs. 38,6%) e p-4EBP1 (52,6% vs. 22,7%) respectivamente, sugerindo o papel destas proteínas na carcinogênese. Os autores sugerem que a invasão tumoral mostra mais marcação (Clark et al., 2010). No entanto, esse resultado não deve ser extrapolado para lesões displásicas.

Em trabalho recente, os autores avaliaram a expressão da pS6 em DEO e CEC, e foi observada que 100% dos casos de DEO foram positivos para a pS6, enquanto que 88,6% foram positivos para o CEC. Foi concluído que a pS6 pode ser utilizada como um marcador precoce da transformação maligna (Chaisuparat et al., 2012). O mesmo ocorreu em nosso estudo, onde a expressão da pS6 em CECs foi estatisticamente igual à expressão da pS6 nas DEO ($p=0,215$). O padrão de marcação da pS6 em CEC e DEO foi predominantemente citoplasmático, de acordo com o que já foi descrito na literatura anteriormente (Molinolo et al., 2012).

Nos casos de CEC incluídos no nosso estudo, a proteína que foi mais identificada, tanto em núcleo como em citoplasma, em todos os 34 casos

analisados, foi a pAKT, em 83,3% deles. Sua expressão foi observada de forma difusa, com as células neoplásicas positivas localizadas tanto na periferia, quanto no centro das ilhotas epiteliais. Sua presença foi considerada estaticamente significativa, não somente nos CECs, mas também nas DBR e DAR. A expressão imuno-histoquímica da pAKT tem sido relacionada a neoplasias de uma maneira geral, incluindo os CEC orais e de cabeça e pescoço e tumores de glândula salivar, e mencionados em trabalhos desenvolvidos na Disciplina de Patologia Bucal (Lima et al., 2009; Molinolo et al., 2009). A pAKT fosforila milhares de substratos que possuem marcação tanto nuclear quanto citoplasmática que estão localizados *downstream* nas vias de sinalização. Por este motivo, a atividade da pAKT pode ser encontrada em citoplasma e núcleo (Rosner et al., 2007).

A expressão positiva para a pAKT tem sido inclusive relacionada a piores prognósticos em pacientes com câncer. Lim e colaboradores, estudaram a relação da pAKT, E-caderina, PCNA e VEGF em 84 espécimes oriundos de pacientes com CEC. Foram analisadas estágio TMN, comprometimento de linfonodos e a expressão dos anticorpos estudados. A imunorreatividade para a pAKT foi considerada um fator independente para um pior prognóstico, sendo assim foi concluído que a pAKT pode ser considerada um bom alvo terapêutico para estas lesões (Lim et al., 2005). Trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram um aumento da imunorreatividade entre os espécimes de MN, DEO e CECs, sugerindo que a expressão da pAKT pode ser um indicador da progressão das DEO para CEC (Pontes et al., 2009; Santos et al., 2012).

Entre as combinações possíveis de positividade para as proteínas usadas neste estudo, em lesões de DBR, DAR e CEC, podemos destacar que a prevalência maior encontrada foi somente para pS6, ou para a associação pS6 e pAKT. Em muitos casos onde o pS6 foi positivo, o pAKT também foi. Esta associação tem sido observada em lesões malignas e pode servir de alerta no acompanhamento das DEOs. Estas proteínas também são frequentemente apontadas como bons marcadores no monitoramento dos efeitos dos inibidores da mTOR em neoplasias de diversas origens (Soria et al., 2009; Tabernero et al., 2009).

O pS6 é um substrato direto da mTOR na via de sinalização, e considerada uma proteína altamente sensível aos inibidores de mTOR, uma vez que com a

inibição da via, ocorre geralmente reduções drásticas da imunorreatividade para a pS6, o mesmo ocorre com a p4EBP1, o tratamento com inibidores de mTOR promove grandes reduções na expressão desta proteína (Molinolo et al., 2009; Czerninski et al., 2009; Degen et al., 2012; Sun et al., 2012). No entanto o fato de uma lesão ser positiva para estes anticorpos não tem um significado relevante nem como preditor e nem como diferenciador de lesão benigna e maligna. Nossos casos de lesões reativas mostraram positividade para ambas as proteínas, assim como para os casos de CEC e DEO.

Naruse e colaboradores analisaram a expressão da pmTOR no CEC. Observaram que o padrão de imunorreatividade citoplasmática variou de forte a fraca, com incidência de positividade de 40% dos casos, resultado semelhante ao nosso estudo, onde foi observada a expressão tanto da pmTOR, quanto da p4EBP1 em 50% dos casos (Naruse et al., 2011). No entanto nós não nos propusemos a avaliar a intensidade da marcação, uma vez que diversos fatores desde a fixação do tecido, processamento, anticorpo utilizado, e subjetividade do observador, podem interferir nessa análise (Fritschy, 2008). Ainda Naruse et al ao avaliarem o papel de pmTOR, VEGF e HIF- 1 α em 120 amostras de CEC, observaram que a positividade das proteínas analisadas estavam associadas ao estadiamento do tumor, metástases e grau de invasão, porém, não houve relação entre esta via de sinalização e taxa de sobrevida dos pacientes. Foi concluído que a inibição da via pmTOR- HIF-1 α não somente predizer a progressão dos CECs mas também pode ser útil em tratamentos individualizados (Naruse et al., 2011).

Por esta razão, diversos autores tem estudado os efeitos da inibição da via do mTOR em tumores de cabeça e pescoço (Fury et al., 2012; Molinolo et al., 2012; Sun et al., 2012), com resultados promissores. Em estudo clínico conduzido por Fury e colaboradores, a ação do inibidor de mTOR everolimus foi avaliada em uma série de pacientes com diferentes tipos de tumores sólidos, incluindo CECs de cabeça e pescoço. Foi observada uma atividade anti-tumoral significativa neste grupo de pacientes, com redução ou estabilidade tumoral (Fury et al., 2012).

Como já foi dito, nossos resultados mostraram que quando consideramos os 5 grupos estudados, o número de casos positivos para as proteínas pAKT, pmTOR e p4EBP1, foi diferente entre os grupos e essa diferença foi estatisticamente

significante. Porém quando analisamos os achados apenas dos grupos CEC, DAR e DBR, desprezando os encontrados na MN e HI, o p4EBP1 passa a marcar os 3 grupos de forma igualitária, enquanto que pAKT ($p=0,046$) e o pmTOR ($p=0,024$) marcam mais casos de CEC, quando comparados aos DAR e quando comparados as DBR.

Desta forma podemos afirmar que as proteínas pAKT, p4EBP1 e pmTOR serviriam para discernir o tecido normal em relação as LPM e CECs, enquanto que somente a pAKT e mTOR serviriam para se diferenciar o grau de displasia epitelial.

Quando comparamos as DEO entre si, não conseguimos detectar diferenças importantes na marcação dos anticorpos usados. O pmTOR e a p4EBP1 foram marcados positivamente nas DBR e DAR em respectivamente 28% e 29,1% dos casos e 41,7% e 44% dos casos. Enquanto que em casos de CEC, ambas as proteínas apresentam uma prevalência de 50% de células positivas.

Lippman e colaboradores, determinaram que para que um biomarcador possa ser considerado uma boa ferramenta diagnóstica, alguns fatores devem ser levados em consideração como a habilidade de se verificar a diferença entre um tecido normal e de alto risco; a possibilidade da identificação do mesmo em amostras com pequena dimensão; a capacidade de se estabelecer graduações ou padrões, e por fim, estudos preliminares clínicos que avaliem a relação destas proteínas com os agentes estudados (Lippman et al., 1990; Lee et al., 1992; Clark et al., 2010).

De acordo com os nossos resultados, e também apoiados pela literatura, podemos considerar que as proteínas aqui estudadas preenchem os requisitos de bons biomarcadores com relação a diagnóstico diferencial entre CECs e hiperqueratoses irritativas e mucosa normal, mesmo essa ferramenta não sendo necessária ou importante na grande maioria dos casos. Já no auxílio do diagnóstico diferencial entre CEC e DEO por meio do uso desses anticorpos não seria eficiente. Mas devemos lembrar que a imuno-histoquímica não é apenas importante na caracterização de uma lesão para fins de diagnóstico mas também na identificação de pacientes que possam se beneficiar das terapias-alvo, prerrogativa das terapias individualizadas para neoplasias malignas.

7 CONCLUSÕES

Todas as proteínas estudadas, exceto a pS6, representam bons biomarcadores no que se concerne à diferenciação entre MN, HI, DEO e CEC.

As proteínas pAKT e pmTOR foram identificadas predominante em DEO e CECS mostrando que provavelmente estão relacionadas a displasia epitelial oral e no carcinoma.

REFERÊNCIAS ¹

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80(2):188-91.

Agresti A. *Categorical Data Analysis*. 2^aed, New York: John Wiley and Sons. 2002;710 p.

Amagasa T, Yamashiro M, Uzawa N. Oral premalignant lesions: from a clinical perspective. *Int J Clin Oncol.* 2011;16(1):5-14.

Amornphimoltham P, Sriuranpong V, Patel V, Benavides F, Conti CJ et al. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res.* 2004;10 (12):4029-37.

Angel P, Karin M. The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1072(2):129-57.

Awan KH, Morgan PR, Warnakulasuriya S. Evaluation of an autofluorescence based imaging system (VELscope™) in the detection of oral potentially malignant disorders and benign keratoses. *Oral Oncol.* 2011b;47(4):274-7.

Awan KH, Morgan PR, Warnakulasuriya S. Utility of chemiluminescence (ViziLite™) in the detection of oral potentially malignant disorders and benign keratoses. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(7):541-4.

Baric JM, Alman JE, Feldman RS, Chauncey HH. Influence of cigarette, pipe, and cigar smoking, removable partial dentures, and age on oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;54(4):424-9.

---

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology of Genetics of head and neck Tumours. IARC Press, Lyon 2005.

Baselga J, Semiglazov V, van Dam P, Manikhas A, Bellet M, Mayordomo J, et al. Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(16): 2630–7.

Benjamin D, Colombi M, Moroni C, Hall MN. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 31;10(11):868-80.

Carrard V, Haas A, Rados P, Filho M, Oppermann R, Albandar J, Susin C. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. *Oral Dis*. 2011;17(2):171-9.

Chaisuparat R, Rojanawatsirivej S, Yodsanga S. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation is Associated with Epithelial Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Pathol Oncol Res*. 2012 Sep 28. [Epub ahead of print]

Clark C, Shah S, Herman-Ferdinandez L, Ekshyyan O, Abreo F, Rong X, McLarty J, Lurie A, Milligan EJ, Nathan CO. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. *Laryngoscope*. 2010;120(6):1159-65.

Czerninski R, Amornphimoltham P, Patel V, Molinolo AA, Gutkind JS. Targeting mammalian target of rapamycin by rapamycin prevents tumor progression in an oral-specific chemical carcinogenesis model *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(1):27-36.

Degen M, Natarajan E, Barron P, Widlund H, Rheinwald JG. MAPK/ERK-dependent translation factor hyperactivation and dysregulated laminin 2 expression in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. *AJP* June 2012;180(6):2462-84.

Dumont FJ, Bischoff P. Disrupting the mTOR signaling network as a potential strategy for the enhancement of cancer radiotherapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2012;12(8):899-924.

Eversole LR. Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. *Head and Neck Pathol.* 2009;3(1):63–68.

Fang L, Wang H, Zhou L, Yu D. Akt-FOXO3a signaling axis dysregulation in human oral squamous cell carcinoma and potent efficacy of FOXO3a-targeted gene therapy. *Oral Oncol.* 2011;47(1):16-21.

Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(8):671-88.

Fillies T, Woltering M, Brandt B, Van Diest JP, Joos U, Buerger H. Cell cycle regulating proteins p21 and p27 in prognosis of oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep.* 2007;17(2):355-9.

Fritschy JM. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci.* 2008 Dec;28(12):2365-70.

Fury M, Sherman E, Haque J, Korte S, Lisa D, Shen R. A phase I study of daily everolimus plus low-dose weekly cisplatin for patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;69(3):591-8.

Gillenwater A, Vali Papadimitrakopoulou, Richards-Kortum R. Oral premalignancy: new methods of detection and treatment. *Curr Oncol Rep.* 2006;8(2):146-154.

Hodges A, Smoller BR. Immunohistochemical comparison of p16 expression in actinic keratoses and squamous cell carcinomas of the skin. *Mod Pathol.* 2002;15(11):1121-5.

Holpuch AS, Desai KG, Schwendeman SP, Mallery SR. Optimizing therapeutic efficacy of chemopreventive agents: A critical review of delivery strategies in oral cancer chemoprevention clinical trials. *J Carcinog.* 2011;10(1):23.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356(22):2271-81.

Iamaroon A, Krisanaprakornkit S. Overexpression and activation of Akt2 protein in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2009;45(10):e175–9.

Jaber MA, Porter SR, Speight P, Eveson JW, Scully C. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. *Oral Oncol.* 2003;39(6):589-96.

Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. *J Oral Sci.* 2010;52(1):13-21.

Jeong WJ, Paik JH, Cho SW, Sung MW, Kim KH, Ahn SH. Excisional biopsy for management of lateral tongue leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(5):384-8.

Jerjes W, Upile T, Hamdoon Z, Mosse CA, Akram S, Hopper C. Photodynamic therapy outcome for oral dysplasia. *Lasers Surg Med.* 2011;43(3):192-9.

Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet.* 2002;111(1):96-102.

Kramer IRH, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46(4):518-39.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006;42(3):987-93.

Kvaal SI, Warloe T. Photodynamic treatment of oral lesions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 2007;26(2):127-33.

Lamming DW, Ye L, Katajisto P, Goncalves MD, Saitoh M, Stevens DM, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science.* 2012;335(6076):1638-43.

Lee JS, Lippman SM, Hong WK, Ro JY, Kim SY, Lotan R, et al. Determination of biomarkers for intermediate end points in chemoprevention trials. *Cancer Res.* 1992;52(9):2707s-2710s.

Lim J, Kim JH, Paeng JY. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol.* 2005;58(3):1199–205.

Lima M, Marques Y, Alves SM, Freitas V, Soares F, Araujo VC et al. MDM2, P53, P21WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiology.* 2009;33(2): 142-6.

Lingen MW, Pinto A, Mendes RA, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne WM, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis.* 2011;17(1):7-22.

Lippman SM, Lee JS, Lotan R, Hittelman W, Wargovich MJ, Hong WK. Biomarkers as intermediate end points in chemoprevention trials. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(7):555-60.

Liu W, Wang Y, Zhou H, Shi P, Zhou Z, Tang G. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer.* 2010;16(10):685.

Liu Y, Hidayat S, Su WH, Deng X, Yu DH, Yu BZ. Expression and activity of mTOR and its substrates in different cell cycle phases and in oral squamous cell carcinomas of different malignant grade. *Cell Biochem Funct.* 2007;25(1):45-53.

Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(2): 63–9.

Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;29;129(7):1261-74.

Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(4):774-81.

Matranga D, Di Fede O, Paderni C, Albanese A, Pizzo G, Magro R, Compilato D, Campisi G. Demographic and behavioural profiles of patients with common oral mucosal lesions by a homogeneity analysis. *Oral Dis.* 2012;18(4):396-401.

Mehanna HM, Rattay T, Smith J, McConkey CC. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck.* 2009;31(12):1600-9.

Meisel P, Holtfreter B, Biffar R, Suemig W, Kocher T. Association of periodontitis with the risk of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2012;48(9):859-63.

Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82(1):57-68.

Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses García A, et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clin Cancer Res.* 2007;13(17):4964-73.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):324-34.

Molinolo AA, Marsh C, El Dinali M, Gangane N, Jennison K, Hewitt S, et al. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(9):2558-68.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(1):1-10.

Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, Mizuno A, Umeda M. Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 α pathway. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4429-37.

Natarajan E, Woo SB. Benign alveolar ridge keratosis (oral lichen simplex chronicus): A distinct clinicopathologic entity. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58(1):151-7.

Nathan, Amirghahari, Xiaohua Rong, et al. Mammalian Target of Rapamycin Inhibitors as Possible Adjuvant Therapy for Microscopic Residual Disease in Head and Neck Squamous Cell Cancer. *Cancer Res*. 2007;67(5):2160-8.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim C, Wasserman W. *Applied Linear Statistical Models*. 4^a ed. U.S.A.: Times Mirror Higher Education Group. 1996;1408 p.

Oh MH, Lee HJ, Yoo SB, Xu X, Choi JS, Kim YH, et al. Clinicopathological correlations of mTOR and pAkt expression in non-small cell lung cancer. *Virchows Arch*. 2012;460(6):601-9.

Oliveira M, Medina J, Xavier F, Magalhães M, Ortega KL. Cowden syndrome. *Dermatol Online J*. 2010;16(1):7.

Pereira JS, Carvalho Mde V, Henriques AC, de Queiroz Camara TH, Miguel MC, et al. Epidemiology and correlation of the clinicopathological features in oral epithelial dysplasia: analysis of 173 cases. *Ann Diagn Pathol*. 2011;15(2):98-102.

Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003;39(8):770-80.

Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(10):737-52.

Pontes HA, de Aquino Xavier FC, da Silva TS, Fonseca FP, Paiva HB, Pontes FS, et al. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(8):644-50.

R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012;Disponível em URL: <http://www.R-project.org/>.

Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Materman E, Boni J et al. Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22(12):2336-47.

Rethman MP, Carpenter W, Cohen EE, Epstein J, Evans CA, Flaitz CM, et al. American Dental Association Council on Scientific Affairs Expert Panel on Screening for Oral Squamous Cell Carcinomas. Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. *J Am Dent Assoc*. 2010;141(5):509-20.

Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent*. 2010; 2010:186018.

Rosner M, Hanneder M, Freilinger A, Hengstschläger M. Nuclear/cytoplasmic localization of Akt activity in the cell cycle. *Amino Acids*. 2007;32(3):341-5.

Shtilbans V, Wu M, Burstein DE. Current overview of the role of Akt in cancer studies via applied immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol*. 2008;12(2):153-60.

Silva BS, Yamamoto FP, Pontes FS, Cury SE, Fonseca FP, Pontes HA, et al. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(1):e29-34.

Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of Rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):314-25.

Soria J, Shepherd F, Douillard J, Wolf J, Giaccone G, Crino L et al: Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1674-81.

Sousa SOM, Mesquita RA, Pinto Jr DS, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *Int J Pathol Med* 2002;31(2):78-81.

Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol.* 2007;1(1):61-6.

Squarize CH, Castilho RM, Gutkind JS. Chemoprevention and treatment of experimental Cowden's disease by mTOR inhibition with rapamycin. *Cancer Res.* 2008;68(17):7066-72.

Srinivasan M, Jewell SD. Evaluation of TGF- α and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. *Oral Oncol.* 2001;61(4):284–92.

Sun Z, Sood S, Li N, Yang P, Newman RA, Yang CS, Chen X. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of a dual inhibitor of epidermal growth factor receptor (EGFR) and ErbB2 tyrosine kinases. *Oral Oncol.* 2008;44(7):652-7.

Sun Z, Zhang L, Hall B, Bian Y, Gutkind S, Kulkarni AB et al. Chemopreventive and chemotherapeutic actions of mTOR inhibitor in genetically defined head and neck squamous cell carcinoma mouse model. *Clin Cancer Res.* 2012;18(19); 1–10.

Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis.* 2011;17(1):58-72.

Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 2008;26(10):1603-10.

Tabor MP, Braakhuis BJM, Van der Waal JE, Van Diest P, Leemans CR, Brakenhoff RH et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J Pathol.* 2003;199(3):354-60.

Turatti E, Neves AC, de Magalhães MH, de Sousa SO. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci* 2005;47(2):71-6.

Van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncol* 2000;36(3):264-6.

Van der Waal I, Reichart PA. Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. *Oral Oncol*. 2007;44(8):719-21.

Van der Waal I, Reichart PA. Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. *Oral Oncol*. 2008;44(5):719-21.

Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):317-23.

Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2010;46(6):423-5.

Venables WN, Ripley B. *Modern Applied Statistics with S*. 4^a ed. Springer. 2002;495p.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(7):489-501.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(3):127-33

Watanabe S, Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane G. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2009;50(3):125-133.

Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 3^a ed. New York Springer;2009.221p.

Woo SB, Lin D. Morsicatio mucosae oris-a chronic oral frictional keratosis, not a leukoplakia. J Oral Maxillofac Surg. 2009;67(1):140-6.

Wu HT, Ko SY, Fong JH, Chang KW, Liu TY, Kao SY. Expression of phosphorylated Akt in oral carcinogenesis and its induction by nicotine and alkaline stimulation. J Oral Pathol Med. 2009;38(2):206-13.

Yang SW, Wu CJ, Lee YS, Chen TA, Tsai CN. Postoperative recurrence as an associated factor of malignant transformation of oral dysplastic leukoplakia. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec. 2010;72(5):280-90.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene. 2008;27(41):5497-510.

Zwierzina H. Biomarkers in drug development. Ann Oncol. 2008;19(5):33–7.

Apêndice A - Análise estatística da frequência de positividade do estudo entre os grupos de estudo segundo proteínas e sítio

Variável	Fator	Grupo												Valor p
		CEC (n=34)		DAR (n=50)		DBR (n=48)		H (n=33)		MN (n=21)		Total (n=186)		
		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Sítio	Assoalho	7	21,2	13	26	5	10,6	2	5,9	0	0	27	15,3	<0,001 ²
	Gengiva	1	3	0	0	1	2,1	2	6,1	9	45	16	7,1	
	Língua	14	42,4	20	40	16	34	5	15,2	0	0	55	30,1	
	Mucosa jugal	0	0	6	12	14	29,8	9	27,3	1	5	30	15,8	
	Outros	0	0	0	0	2	4,3	0	0	2	10	4	2,2	
	Palato	3	9,1	7	14	6	12,8	2	6,1	0	0	18	9,8	
	Rebordo alveolar	6	18,2	4	8	3	6,4	9	27,3	8	40	30	16,4	
	Trígono	2	6,1	0	0	0	0	4	12,1	0	0	6	3,3	
	Ausente	1	2,9	0	0	1	2,1	0	0	1	4,8	3	1,6	
pAKTC grau	0	12	40	34	68	29	60,5	31	96,9	21	100	127	70,1	<0,001 ²
	1	2	6,7	1	2	3	6,2	1	3,1	0	0	7	3,9	
	2	3	10	2	4	1	2,1	0	0	0	0	6	3,3	
	3	13	43,3	13	26	15	31,2	0	0	0	0	41	22,7	
	Ausente	4	11,8	0	0	0	0	1	3	0	0	5	2,7	
pAKTN grau	0	24	80	45	90	45	93,7	32	100	21	100	167	92,2	0,218 ²
	1	0	0	1	2	1	2,1	0	0	0	0	2	1,1	
	2	4	13,3	2	4	1	2,1	0	0	0	0	7	3,9	
	3	2	6,7	2	4	1	2,1	0	0	0	0	5	2,8	
	Ausente	4	11,8	0	0	0	0	1	3	0	0	5	2,7	
pmTOR grau	0	15	50,1	38	76	37	77,1	31	100	20	100	141	78,8	<0,001 ²
	1	4	13,3	3	6	6	12,5	0	0	0	0	13	7,3	
	2	4	13,3	6	12	4	8,3	0	0	0	0	14	7,8	
	3	7	23,3	3	6	1	2,1	0	0	0	0	11	6,1	
	Ausente	4	11,8	0	0	0	0	2	6,1	1	4,8	7	3,8	
pS6 grau	0	7	22,6	13	26	15	32,6	14	45,1	11	55	60	33,7	<0,001 ²
	1	1	3,2	0	0	3	6,5	7	22,6	0	0	11	6,2	
	2	1	3,2	8	16	4	8,7	0	0	2	10	15	8,4	
	3	22	71	29	58	24	52,2	10	32,3	7	35	92	51,7	
	Ausente	3	8,8	0	0	2	4,2	2	6,1	1	4,8	8	4,3	

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo Nº 204/2010
CAAE 0031.0.017.000-10

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Avaliação morfológica e imuno-histoquímica de leucoplasias orais**", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Fabiana Martins sob orientação da Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010.

Profa. Dra. Marcia Turola Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP