# LARA CRISTINA OLIVER GIMENEZ



Leucoplasia verrucosa proliferativa, análise de biomarcadores presentes na progressão da lesão

São Paulo 2018

## LARA CRISTINA OLIVER GIMENEZ

# Leucoplasia verrucosa proliferativa, análise de biomarcadores presentes na progressão da lesão

Versão Original

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

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa.

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

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

Gimenez, Lara Cristina Oliver.

Leucoplasia verrucosa proliferativa, análise de biomarcadores presentes na progressão da lesão / Lara Cristina Oliver Gimenez ; orientadora Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2018. 112 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. --Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Versão corrigida

1. Leucoplasia bucal. 2. Carcinogênese bucal. 3. Imuno-histoquímica. 4. Proliferação celular. I. Sousa, Suzana Cantanhede Orsini Machado de. II. Título.

Gimenez LCO. Leucoplasia verrucosa proliferativa, análise de biomarcadores presentes na progressão da lesão. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2018

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)		
Instituição:	Julgamento:	

Prof(a). Dr(a)		
Instituição:	Julgamento:	

Prof(a). Dr(a)		
Instituição:	Julgamento:	

Aos meus avós...

Laura Garcia Gimenez e

André Gimenez Martins (in memoriam).

# Agradecimentos Especiais

 $\hat{A}$  querida orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, minha profunda gratidão por me guiar no sentido da concretização do presente trabalho. Agradeço pela paciência, presteza e por todo o conhecimento transmitido;

Ao Prof. Dr. Decio dos Santos Pinto Júnior, meu orientador de Mestrado, que propiciou e se fez presente ao longo de toda esta trajetória acadêmica. Agradeço o apoio e a confiança;

 $\mathbf A$  vocês, meu carinho e admiração.

# Agradecimentos

Aos funcionários do Departamento e da Faculdade de Odontologia da USP;

Aos professores do Departamento e da Disciplina de Patologia Bucal;

Aos colegas e colaboradores de pós-graduação;

A CAPES;

Aos amigos;

Ao meu namorado Rodolfo Oliveira Cantieri;

 ${
m \AA}$  família e, em especial, ao meu irmão  ${
m A}$ rthur Oliver Gimenez e meus amados pais...

 ${f M}$ arilene Oliver Gimenez e  ${f A}$ parecido Gimenez Garcia

Muito obrigada!

"This thing we do.. Rain or shine or stormy weather..

It's louder than words.. With world-weary grace Louder than words"

Pink Floyd

" $R_{un}$ , rabbit run! Dig that hole, forget the sun.

And when at last the work is done Don't sit down, it's time to dig Another one"

Pink Floyd

#### RESUMO

Gimenez LCO. Leucoplasia verrucosa proliferativa, análise de biomarcadores presentes na progressão da lesão [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Múltiplas lesões orais que progridem em um curso irreversível lento mediante expansão de áreas afetadas, no sentido de um pior prognóstico, caracterizam a leucoplasia verrucosa proliferativa. A referida lesão apresenta perfil agressivo circunstanciando indeterminado número de recidivas e alto potencial de transformação neoplásica. A tal fato, se atribui a frequente incidência em carcinoma verrucoso bem como em carcinoma espinocelular de boca invasivo e potencialmente metastático, inserindo-se este em índices de maior prevalência quando comparado ao carcinoma verrucoso em pacientes com leucoplasia verrucosa proliferativa. Vincula-se ao contexto supracitado, o envolvimento de vias de sinalização celular ocasionando o desarranjo de um complexo sistema o qual abarca atividade de oncogenes, inibição de genes supressores de tumor e alteração de reguladores do sistema de reparo do DNA, encerrando-se, por sua vez, em diversos fatores favoráveis à carcinogênese, dentro os quais a regulação negativa de cascatas próapoptóticas e estímulo à proliferação celular desordenada. A este processo se pode relacionar o desconcerto da via PI3K/Akt/mTOR e de um membro do complexo de pré-replicação, o MCM3. Para tanto, a análise pormenorizada do perfil evolutivo da lesão por meio do rol de diagnósticos pregressos, bem como por meio do cruzamento de dados epidemiológicos, além da caracterização de neoplasias malignas provenientes da leucoplasia verrucosa proliferativa por meio da expressão dos biomarcadores pAkt, pmTOR e MCM3, vêm a explanar aspectos ainda pouco estudados desta intrigante entidade clinicopatológica. Neste sentido, o presente trabalho analisou o histórico diagnóstico de 28 pacientes com leucoplasia verrucosa proliferativa submetendo à análise imuno-histoquímica para as supracitadas proteínas, o montante de 34 amostras dos mesmos pacientes, integrando estas, 28 de leucoplasia verrucosa proliferativa, 4 de carcinoma verrucoso e 2 de carcinoma espinocelular. Dos resultados obtidos, foi possível depreender a prevalência de lesões em mucosa jugal, rebordo alveolar e língua confirmando ainda seu perfil

evolutivo em face às múltiplas lesões com alto potencial recidivante e latente insurgir do carcinoma espinocelular, este podendo ainda ser embasado por expressiva marcação de pmTOR, pAkt e MCM3.

Palavras-chave: Leucoplasia verrucosa proliferativa, carcinogênese, pmTOR, pAkt, MCM3.

#### ABSTRACT

Gimenez LCO. Proliferative verrucous leukoplakia, analysis of biomarkers present in lesion progression [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Multiple oral lesions that progress in a slow irreversible course by expansion of affected areas, in the sense of a worse prognosis, characterize proliferative verrucous leukoplakia. The said lesion presents an aggressive profile, with an indeterminate number of recurrences and a high potential for neoplastic transformation. To this fact, it is attributed to frequent incidence in verrucous carcinoma as well as invasive and potentially metastatic invasive mouth squamous cell carcinoma, inserting itself in indices of higher prevalence when compared to verrucous carcinoma in patients with proliferative verrucous leukoplakia. It is linked to the aforementioned context, the involvement of cell signaling pathways, causing the disruption of a complex system which encompasses oncogenes activity, inhibition of tumor suppressor genes and alteration of DNA repair system regulators, ending in several factors favorable to carcinogenesis, in which negative regulation of proapoptotic cascades and stimulation to disordered cell proliferation. To this process one may relate the dissatisfaction of the PI3K / Akt / mTOR pathway and a member of the pre-replication complex, MCM3. Thus, the detailed analysis of the evolutionary lesion profile through the role of previous diagnoses and the cross-referencing of epidemiological data, as well as the characterization of malignant neoplasms from proliferative verrucous leukoplakia by the expression of the biomarkers pAkt, pmTOR and MCM3, come to clarify aspects that have not yet been studied in this intriguing clinicopathological entity. Thus, the present study analyzed the historical diagnosis of 28 patients with proliferative verrucous leukoplakia submitting to immunohistochemical analysis for the aforementioned proteins, the amount of 34 samples from the same patients, comprising 28 of proliferative verrucous leukoplakia, 4 of verrucous carcinoma and 2 of squamous cell carcinoma. From the results obtained, it was possible to detect the prevalence of lesions in the buccal mucosa, alveolar ridge and tongue, and the confirmation of its evolutionary profile in the face of the multiple lesions with high recurrent and latent insurgent potential of squamous

cell carcinoma, which may be supported by a significant mark of pmTOR, pAkt and MCM3.

Keywords: Proliferative verrucous leukoplakia, carcinogenesis, pmTOR, pAkt, MCM3.

### LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Atuação da via PI3K/Akt/mTOR na carcinogênese de câncer de cabeça e pescoço (Broek <i>et al.,</i> 2015)
Figura 2.2 – Representação esquemática da via PI3K/Akt/mTOR e sua atuação no avanço da carcinogênese (Yap et al., 2018)41
Figura 5.1 – Reação imuno-histoquímica em amostra de LVP para o anticorpo pmTOR: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)64
Figura 5.2 – Reação imuno-histoquímica em amostra de CV para o anticorpo pmTOR: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)Figura67
Figura 5.3 – Reação imuno-histoquímica em amostra de CEB para o anticorpo pmTOR: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)69
Figura 5.4 – Reação imuno-histoquímica em amostra de LVP para o anticorpo pAkt: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)74
Figura 5.5 – Reação imuno-histoquímica em amostra de CV para o anticorpo pAkt: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)76
Figura 5.6 – Reação imuno-histoquímica em amostra de CEB para o anticorpo pAkt: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)
Figura 5.7 – Reação imuno-histoquímica em amostras de LVP para o anticorpo MCM3: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)
Figura 5.8 – Reação imuno-histoquímica em amostras de CV para o anticorpo MCM3: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)

Figura	5.9 –	Reação	imuno-histo	química	em	amostras	de	CEB	para	0	anticorpo
	MC	CM3: Obje	etiva 10x (A);	objetiva	140x	с (В)					86

# LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Distribuição do número de pacientes por tipo diagnóstico59
Gráfico 5.2 – Distribuição do número de pacientes por tipo diagnóstico: Aspectos mais incidentes no diagnóstico final60
Gráfico 5.3 – Distribuição do número de pacientes por tipo diagnóstico: LVP e lesões de desfecho na progressão, CV e CEB+CEBSI60
Gráfico 5.4 – Distribuição do número de biópsias com diagnósticos correlatos à LVP por sítio anatômico62
Gráfico 5.5 – Distribuição do número de biópsias com diagnósticos de CV e CEB+CEBSI por sítio anatômico
Gráfico 5.6 – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em LVP considerando a proporção de células positivas classificadas por escores
Gráfico 5.7 – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em LVP considerando o segmento epitelial (camada espinhosa e camadas germinativas)
Gráfico 5.8 – Distribuição de marcação imuno-histoquímica para pmTOR em CV de pacientes também diagnosticados com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores
Gráfico 5.9 – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em CV

#### LISTA DE TABELAS

 Tabela 4.2 – Graduação em escores da positividade imuno-histoquímica nos casos

 sob análise
 53

Tabela 5.2 – Indicação das correlações realizadas entre os dados contidos nas colunas (C1) e (C2) ......61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4EBP1	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
AB	Assoalho bucal
AC	Acantose
AT	Atipia
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica "B-cell lymphoma 2"
Bcl-x	Proteína anti-apoptótica "B-cell lymphoma-extra"
CDC6	Proteína de divisão celular no ciclo 6
CDT1	Fator de replicação do DNA codificado pelo gene CDT1
CEB	Carcinoma espinocelular de boca
CEBSI	Carcinoma espinocelular de boca superficialmente invasivo
CA	Candidíase
CAH	Candidíase hiperplásica
CV	Carcinoma verrucoso
DED	Displasia epitelial discreta
DEI	Displasia epitelial intensa
DEM	Displasia epitelial moderada
DEM-I	Displasia epitelial moderada a intensa
DNA	Deoxyribonucleic acid
DQ	Disqueratose
EBP1	Proteína de ligação a ErbB3 1 (PA2G4)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERRα	Receptor nuclear receptor alfa relacionado ao estrogênio
FasL	Proteína trans-membrânica "Fas ligand" (CD95L)
FKHR	Forkhead box protein O1 (FOXO1)
FS	Fundo de sulco
G2	Intervalo de tempo (Gap 2) - preparação da divisão celular
GβL	Proteína G como subunidade beta
GSK3	Proteína glicogênio sintase quinase 3
GV	Gengiva
H&E	Hematoxilina e eosina

HI	Hiperplasia
HQ	Hiperqueratose
HP	Hiperparaqueratose
HV	Verrucosa
lgG1	Subclasse G1 da imunoglobulina G
IL6	Interleucina-6
Ki67	Proteína de proliferação celular codificada pelo gene MK167
LB	Lábio
LG	Língua
LNI	Local não informado
LPO	Líquen plano oral
LVP	Leucoplasia verrucosa proliferativa
Μ	Fase de mitose celular
MC	Mucosite
MCI	Mucosite de interface
MCM	Mini chromosome mainteinance
MDM2	Proteína "murine doble minute 2"
MIB1	Anticorpo monoclonal recombinante para Ki67
MJ	Mucosa jugal
MLST8	Alvo da subunidade LST8 do complexo de rapamicina
MRNA	RNA mensageiro
MTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTORC1	Complexo 1 de mTOR
MTORC2	Complexo 2 de mTOR
NaCl	Cloreto de sódio
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OPN	Glicoproteína osteopontina
P53	Proteína p53
PA	Papiloma
PAb 240	Anticorpo monoclonal da p53 mutada
PAkt	Forma fosforilada da proteína kinase B
PDK1	Proteína quinase 1
PDK2	Proteína quinase 2
PH	Potencial hidrogeniônico

PKB	Proteína quinase B, ou Akt
PKi67	Proteína Ki67
РІЗК	Enzima fosfatidilinositol 3-quinase / fosfoinositídeo 3-quinase
PICI	Processo inflamatório crônico inespecífico
PIP2	Fosfatidilinositol bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol trifosfato
PL	Papilomatose
PmTOR	Forma fosforilada da proteína alvo da rapamicina em mamíferos
PT	Palato
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensinas
RA	Rebordo Alveolar
Raptor	Proteína KIAA1303 associada ao mTORC1
Rictor	Acompanhante insensível à rapamicina de mTOR
S	Fase de síntese-replicação do material genético celular
S6	Proteína ribossomal S6
S6K	Proteína ribossomal S6 quinase
S6K1	Proteína ribossomal S6 quinase beta 1
S/d	Sugestivo de
Ser473	Serina 473
Sin1	Subunidade de mTORC2
Thr308	Treonina 308
TQ	Tampão de queratina
TP53	Gene codificador da proteína tumoral p53
TR	Trígono retromolar
Tris	Trisaminometano
TSC1	Proteína 1 de esclerose tuberosa (Hamartina)
TSC2	Proteína 2 de esclerose tuberosa (Tuberina)
UL	Ulceração

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇAO	33
2 REVISÃO DE LITERATURA	35
2.1 Leucoplasia verrucosa proliferativa	35
2.2 Carcinogênese e vias envolvidas	37
2.2.1 PmTOR / pAkt	38
2.2.2 MCM3	43
3 PROPOSIÇÃO	47
3.1 Proposições específicas	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Material	49
4.1.1 Casos e amostras teciduais	49
4.2 Métodos	50
4.2.1 Dados epidemiológicos	50
4.2.2 Imuno-histoquímica	50
4.2.3 Análise da imunomarcação	52
5 RESULTADOS	55
5.1 Casuística e aspectos clínicos	55
5.2 Resultados imuno-histoquímicos	63
5.2.1 PmTOR	64
5.2.2 PAkt	73
5.2.3 MCM3	83
6 DISCUSSÃO	91
7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99
ANEXO A	109
5.2.1 PmTOR 5.2.2 PAkt. 5.2.3 MCM3. 6 DISCUSSÃO 7 CONCLUSÕES REFERÊNCIAS ANEXO A	

### 1 INTRODUÇÃO

Ano de 1985, Hansen descreve uma lesão leucoplásica oral de crescimento lento, contínuo e irreversível que se inicia como simples hiperqueratose e progride para envolvimento multifocal com alto potencial de transformação neoplásica e maior prevalência em pacientes do sexo feminino. A esta designou "leucoplasia verrucosa proliferativa" (LVP). O referido diagnóstico compõe hoje parte dos laudos emitidos nas inúmeras biópsias às quais se submetem os pacientes acometidos por este quadro e todo o contexto que o mesmo comporta ao qual se somam múltiplas lesões, profusas recidivas e meticuloso, tanto quanto extenso, acompanhamento.

Em face à descrita conjuntura, todos os esforços voltados para uma maior precisão diagnóstica bem como superior compreensão do comportamento biológico da lesão, se fazem pertinentes em face ao grande potencial de transformação maligna que apresenta a LVP, o que se observa em uma estimativa de 70% dos casos com progressão para carcinoma nos sítios anatômicos previamente acometidos pela referida lesão, vindo a incorrer em carcinoma verrucoso (CV) ou, de maneira mais prevalente e mais drástica, em carcinoma espinocelular de boca (CEB).

A definição de marcadores moleculares que possam apontar de maneira confiável este processo de transformação é uma necessidade que se complementa à análise histopatológica pormenorizada bem como às investigações clínicas, a fim de melhor aclarar a progressão neoplásica em lesões de LVP. Para tanto, o presente ensaio reuniu três biomarcadores, pmTOR, pAkt e MCM3, objetivando a verificação de seu potencial carcinogênico anti-apoptótico e de proliferação celular.
# 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os tópicos subsequentes abrangem as principais temáticas do presente ensaio, estas distribuídas de maneira segmentada, mas congruente, trazendo aspectos relevantes consistentes da literatura científica para os seguintes enunciados: leucoplasia verrucosa proliferativa, carcinogênese e vias envolvidas, pmTOR, pAkt, e, por fim, MCM3.

#### 2.1 Leucoplasia verrucosa proliferativa

Leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) foi descrita inicialmente por Hansen et al. em 1985 e reconhecida como entidade clinicopatológica distinta das leucoplasias orais pela Organização Mundial da Saúde em 2005. Apresenta perfil agressivo com acometimento multifocal, grande potencial de recidiva e alto risco de transformação maligna (1–7).

Com acentuada predileção pelo sexo feminino (1,2,6–9) em uma faixa etária mais avançada, girando em torno da sexta década de vida (1,2,8,10), a LVP não apresenta predileção racial (10). Outra característica notadamente atribuída a esta lesão é seu surgimento, evolução e recidiva sem qualquer correlação com o tabagismo (2,7,9,11) ou com o consumo de álcool (7,11), permanecendo sua etiologia ainda indefinida (1,2).

Em sua fase inicial a lesão pode apresentar, clinicamente, aspecto plano, esbranquiçado e homogêneo, vindo a exibir superfície exofítica verrucosa com progressão em dimensão, acometendo ainda, novos sítios anatômicos da cavidade oral com possíveis áreas de eritroleucoplasia em um curso evolutivo lento e irreversível (1,2,9,11,12). Considerando ainda que existe todo um processo evolutivo lento compreendendo ampla gama de possibilidades com relação ao aspecto clínico, lesões iniciais em placa de margens pouco definidas ou mesmo com áreas eritematosas em acometimento bilateral podem levar à suspeita de uma lesão auto-imune, o líquen plano oral. Somando-se tais aspectos a um resultado histopatológico

inespecífico ou baseado em áreas não representativas da lesão, eleva-se a possibilidade de incorrer em equívocos diagnósticos. Para tanto, estes pacientes avaliados de criterioso е devem ser modo complementar clínica е histopatologicamente. Um estudo recente chamou a atenção por relacionar a LVP ao líquen plano oral, como sendo este um possível precursor de LVP, relatando ainda casos de transformação em carcinoma espinocelular de boca (CEB) e carcinoma verrucoso (CV) (13).

Áreas gengivais e rebordo alveolar são os sítios anatômicos mais comumente acometidos pela LVP (3,5,9,11), seguidos por mucosa jugal em mulheres e língua em homens (2,9). Ressalta-se, por oportuno, uma correlação entre local de acometimento e maior prevalência de transformação maligna, sendo estes gengiva e língua (11).

Da mesma forma que se observa progressão clínica, como mencionado anteriormente, em uma análise histopatológica a lesão pode consistir inicialmente, em simples hiperqueratose ou hiperparaqueratose vindo, subsequentemente, a apresentar áreas de acantose epitelial (8,11,14), grande parte das vezes com a ocorrência de projeções em gota no sentido da lâmina própria (15), diferentes graus de displasia e até, chama-se atenção ao fato, CV ou CEB, exibindo variações histopatológicas entre pacientes bem como entre sítios anatômicos distintos de um mesmo paciente (2,5). Cabe ressaltar que, apesar da displasia epitelial ser largamente relacionada à severidade da lesão, o desenvolvimento de neoplasias pode não ser precedido pela ocorrência de displasia intensa (7), ainda assim, gradações histopatológicas de progressão foram propostas, como a de 1985, seguindo a sequência que compreende hiperqueratose, diferentes graus de displasia epitelial, CV e CEB (1), e a gradação de 1999, partindo de hiperqueratose sem displasia epitelial, hiperplasia verrucosa irreversível que, invariavelmente precederia o CV e, por fim, CEB (16).

O diagnóstico da LVP é essencialmente retrospectivo sendo, para tanto, de grande importância a história de lesões brancas proliferativas anteriormente examinadas. Devido a esta condição diagnóstica, que se deve ao perfil progressivo inerente da lesão e que, por sua vez, requer acompanhamento e tratamento agressivo com remoção cirúrgica e amplas margens (1–3,8,10), estudos prévios apontaram no sentido de melhor elucidar possíveis critérios diagnósticos, como uma revisão de literatura que classificou tais critérios em *major* e *minor*, sendo suficiente

a soma de três critérios *major* para indicar LVP, dentre estes, presença de lesões leucoplásicas em pelo menos dois locais distintos da mucosa oral, área verrucosa, espalhamento dessas áreas no desenvolvimento da lesão, recidiva em áreas previamente tratadas e alteração histopatológica podendo variar entre simples hiperqueratose e carcinoma espinocelular. E os critérios *minor* compreendendo presença de, no mínimo três centímetros de lesão leucoplásica considerando todas as lesões presentes, sexo feminino, não tabagista e evolução da lesão de cinco anos (17).

A correlação entre LVP e níveis aumentados de IL-6 foi observada com enfoque para as áreas verrucosas da lesão, se mostrando aumentada ainda com relação a amostras controle e diminuída quando comparada ao CEB (18).

#### 2.2 Carcinogênese e vias envolvidas

O surgimento do câncer, de uma maneira geral, baseia-se na exposição do DNA celular a fatores intrínsecos e extrínsecos que podem levar a erros na replicação e consequentes mutações de forma cumulativa ao longo da vida do indivíduo. Agentes mutagênicos tais como tabaco, que pode ter seu efeito potencializado pelo álcool, raios ultravioleta, bem como algumas infecções virais são, muitas vezes, responsáveis por danos no material genético celular (19,20). As mutações não corrigidas são passadas para células filhas que, através de sucessivas expansões clonais somadas ao surgimento de novas mutações vantajosas a essas células, culminam na origem e desenvolvimento de um câncer que é constitutivamente heterogêneo (20).

A progressão neoplásica, outro fator intrínseco à carcinogênese, passa pelas células tronco tumorais e seu mecanismo de auto renovação, bem como por sua capacidade de gerar novas linhagens celulares neoplásicas (21). Além disso, o crescimento desordenado de células neoplásicas refratárias à extinção, é ocasionado pelo aumento no potencial de proliferação celular concomitante com a inibição da apoptose, processo de morte celular programada (22).

2.2.1 PmTOR e pAkt

Dentre as vias de sinalização celular afetadas pelo processo descrito anteriormente, está a via PI3K/Akt/mTOR, por meio da qual se desencadeia um complexo sistema que abarca angiogênese, sobrevivência de célula alterada, capacidade de invasão e metástase, resultando seu desajuste em um aumento no potencial de desenvolvimento neoplásico (23).

A referida via, envolve o gene mTOR, este codifica a proteína alvo quinase da rapamicina em mamíferos (mTOR/S6), componente crítico no desarranjo de vias celulares envolvidas no processo carcinogênico (24). MTOR age regulando a progressão do ciclo celular, também desempenhando um importante papel na inibição da apoptose. A capacidade da célula de se manter viva evitando a morte celular programada é basilar para o avanço neoplásico, sendo representada não só por mTOR mas também pela proteína de mesma via Kinase B (PKB), ou pAkt para a forma fosforilada (25–29).

Por outro lado, a inibição de mTOR se mostra bastante positiva resultando não só na indução apoptótica das células neoplásicas como também na ativação da proteína supressora de tumor p53, codificada pelo gene de mesmo nome. Um modo de se observar a expressão de mTOR é identificando a expressão da proteína ribossomal S6K1, uma vez que mTOR modula a fosforilação dos principais reguladores de tradução proteica: S6K e a proteína de ligação 4EBP1 (25,30,31).

O proto-oncogene anteriormente citado, serina/treonina Akt, juntamente com mTOR, atua na inibição de fatores pró-apoptóticos e ativação de proteínas antiapoptóticas, controlando ainda, mecanismos críticos para o crescimento tumoral como crescimento celular, proliferação, sobrevivência, angiogênese, invasão tumoral e resistência a tratamentos rádio e quimioterápicos (25–29,32,33).

A ativação de Akt resulta de sua fosforilação por PDK1 em Thr308 ou PDK2, mTOR-RICTOR em Ser473 (34,35), e sua superexpressão tem sido amplamente observada em estudos de amostras oriundas de câncer. Uma vez fosforilada, pAKT atua na sobrevivência celular (36–38). Sua forma ativada foi previamente relacionada a um processo oncogênico de transição epitélio-mesequimal em linhagens de carcinoma espinocelular por meio do qual queratinócitos neoplásicos passam a adquirir propriedades naturais de fibroblastos apresentando ainda aumento no potencial invasivo por perda da adesão intercelular (39).

Na Figura 2.1 subsequente, pode ser observada a atuação de mTOR em seu complexo 2, mTORC2 (insensível à rapamicina e integrado por mTOR, Rictor, mLST8/GβL e Sin1) na ativação de Akt e consequente ativação de MDM2 culminando na supressão da proteína p53 (regulada pelo gene supressor de tumor TP53, também conhecido como "guardião do genoma"). A forma ativada de Akt remete ainda a um importante papel desempenhado por este, que se perfaz na supressão do heterodímero supressor de tumor TSC, predominantemente em citoplasma (40), e ativação de mTOR em seu complexo 1, mTORC1 (sensível à rapamicina e composto por mTOR, Raptor e mLST8/GβL), este, regulando negativamente 4EBP1 (supressor da transcrição de mRNA) e, positivamente S6K (regulador positivo da transcrição de mRNA) e S6 (23,38,41,42).

Cabe ressaltar, por oportuno, a regulação positiva do fator de transcrição NFκB exercida por Akt, bem como por mTOR/mTORC1, tal como exibe a cascata de moduladores ilustrada abaixo, culminando em um contexto favorável à proliferação celular, a um estado anti-apoptótico, inflamatório e congruente à angiogênese (23). O supracitado mTORC1, também já foi alvo de análise em CEB contribuindo para o desenvolvimento deste por meio da ativação do receptor nuclear ERRα (potencial ativador do processo de transcrição por sua ligação ao DNA) e seu gene alvo OPN, diferente de mTORC2. OPN, por sua vez, se mostrou forte indicador do avanço neoplásico por seus níveis aumentados em condições de metástases, exibindo ainda superexpressão em casos de CEB (43,44). **Figura 2.1** – Atuação da via PI3K/Akt/mTOR na gênese do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (*Broek et al.*, 2015)



Mantendo-se ainda no contexto da via de sinalização celular PI3K/Akt/mTOR, a Figura 2.2 nos permite atentar para a atuação, em membrana celular, de PI3K na produção de PIP3 por meio de PIP2, aquela, responsável pela ativação de Akt em decorrência da fosforilação em seu domínios Thr308 e Ser473, possibilitando, para tanto, a correlação entre Akt e a inibição da apoptose por meio da regulação negativa de Caspase 9 e sua cascata pró-apoptótica subsequente, supressão ainda de FKHR com consequente bloqueio de Fas Ligand (FasL) e modulação negativa de Bad desencadeando a ativação de Bcl-2 e Bcl-x (45).

A imagem ilustra ainda a ativação da Ciclina D1 por meio do silenciamento de um supressor de tumor, GSK3, resultando no estímulo à proliferação celular (45). A supracitada ativação de Akt por PIP3 em seus domínios ligados a PDK1 e PDK2 por meio da fosforilação, permite que pAkt deixe a membrana celular podendo alocar-se em citoplasma ou núcleo (46). Note que a reversão de todo o processo aqui descrito se faz exequível no pináculo da via por meio da modulação negativa efetivada por PTEN (45).



Figura 2.2 – Representação esquemática da via PI3K/Akt/mTOR e sua atuação no avanço da carcinogênese (Yap *et al.*, 2018)

Akt pode ser encontrada tanto em citoplasma quanto em núcleo (37,47) em virtude de sua capacidade de fosforilação que abrange milhares de proteínas originárias de ambos os sítios celulares (38), independente da atividade quinase ou fosforilação de seus segmentos Thr308 e Ser473 (37). Estudos apontam ainda maiores níveis de atividade em citoplasma celular quando comparado à sua dinâmica nuclear (38,40). Por conseguinte, sua concentração neste pode advir de translocação mediada por processo ativo utilizando-se de ligação a outras proteínas nucleares (37). Apesar de estudos anteriores apontarem para a não ativação direta

de pAkt quando intranúcleo sugerindo tratar-se de um resultado restrito ao referido processo de translocação, sendo, para tanto, o pAkt nuclear originário de citoplasma (48–50), existem demonstrações que corroboram com seu processo de fosforilação já no interior nuclear (37).

Análise dos efeitos de Akt especificamente em núcleo aponta para uma interação, quando fosforilada, com a proteína Ebp1, esta também localizada em nucléolo e citoplasma (51,52), aumentando sua ação anti-apoptótica (36). Ressaltase ainda, o aumento na concentração de Akt em núcleo, frequentemente observado em células neoplásicas em respaldo a este contexto pró-carcinogênico, alertando para o núcleo como local decisivo na transformação celular, sobrevivência e migração (37). Por outro lado, intensa proliferação celular relacionada à hiperatividade de Akt relaciona-se a uma maior concentração de tuberina em citoplasma celular, uma vez que esta se encontra regulada negativamente em núcleo quando em franca atividade o Akt (40).

A expressão de mTOR e pAkt em sua forma fosforilada, foi previamente analisada em amostras de CEB, tecido com displasia epitelial e mucosa oral normal, evidenciando notadamente marcação em todos os casos de carcinoma, e em parte dos casos de displasia, sem que, no entanto, viesse a esboçar positividade em amostras de tecido normal, o que também pôde ser observado para pAkt, com positividade crescente para amostras de displasia epitelial e CEB, respectivamente, indicando maior expressão desses marcadores no processo da carcinogênese (53).

A progressão neoplásica em CEB por meio da disseminação de células alteradas a linfonodos cervicais tendo como regulador chave a proteína GSK3β, foi também observada mediante atuação de Akt/mTOR (54). A modulação positiva da mesma via, também em amostras de CEB, foi corroborada por um estudo que avaliou sua expressão comparativamente ao CV e espécimes de tecido não neoplásico, obtendo diferenças de coloração entre as variáveis em questão com positividade para CV e CEB em maior intensidade para o último (55).

Estudos da via que integra Akt e mTOR, apontam sua regulação como promitente alvo no avanço de tratamentos para o câncer (33,39,43,54,56), salientando, à vista disso, a regulação da circunscrição celular de Akt em núcleo como possível fator terapêutico (37). Corroborando com tais indicações terapêuticas, a eficácia no tratamento de CEB por meio da supressão de mTORC1 e mTORC2/Akt mediante aplicação de um competidor molecular de ATP, AZD2014, foi previamente

observada, implicando em radiossensibilidade pelas células neoplásicas (57).

#### 2.2.2 MCM3

Alterações do ciclo celular com significativo e desordenado processo de proliferação, compreendem a um dos pilares responsáveis pela cadeia da progressão neoplásica. Para tanto, marcadores imuno-histoquímicos como Ki67 e MCMs, que estão diretamente relacionados à atividade proliferativa da célula, permitem avaliar amostras de lesões com potencial de transformação ou já neoplásicas, visando corroborar com o prognóstico das mesmas.

Dos marcadores de proliferação citados, o Ki67 é o mais utilizado, tratando-se de um anticorpo da classe IgG1 que se liga a uma proteína (pKi67), e esta, por sua vez, reage com antígeno nucleolar de células em proliferação, localizando-se em áreas distintas conforme a fase do ciclo celular (58–63). A família de MCMs, por sua vez, consiste em um grupo proteico de manutenção minicromossomal, constituindo-se em um heteroexâmero que, uma vez ativado, desempenha importante papel no iniciar da síntese de DNA. Tal processo é desencadeado por sua ação enzimática de helicase, também denominada DNA-helicase, promovendo a abertura da hélice do ácido desoxiribonucleico em duas fitas simples para subsequente replicação (64,65).

O referido processo é desencadeado em circunscrição intranuclear quando ainda em fase G1 do ciclo celular mediante o acoplamento dos fatores de replicação CDT1 e CDC-6 ao complexo de reconhecimento de origem ORC, estando este aposto à cromatina. Ligados os referidos fatores de replicação ao ORC, somando-se ainda um composto globular inativo de MCMs, a tal conjunto denomina-se "complexo de pré-replicação", ou Pre-RC, este, responsável pela progressão do ciclo celular para a fase subsequente (65).

Na fase S, com a dissociação do Pre-RC, o heteroexâmero de MCMs ainda em núcleo, mas não mais ligado à cromatina, passa por um processo de fosforilação por meio de CDK2 tornando-se ativo, ao passo que CDC-6 é transladado para citoplasma e CDT1 destina-se à proteólise ficando eventuais remanescentes deste, alocados à geminina a fim de se evitar que novos processos de replicação sejam iniciados durante as fases S, G2 e M (65). A anteriormente descrita dinâmica de replicação do material genético celular abarca uma série de estudos na tentativa de aclarar seu papel na proliferação celular de lesões potencialmente malignas, bem como de neoplasias já estabelecidas. Destarte, a marcação imuno-histoquímica, por meio do MIB1, anticorpo monoclonal produzido pelos recombinantes do Ki67, pôde ser observada na camada basal e em áreas consideradas de microinvasão em amostras de CV (66–68) mostrando positividade pouco significativa em LVP quando comparada às proteínas MCM2 e MCM5 (11,69). Além disso, amostras examinadas para MCM2 evidenciaram marcação positiva em células das camadas basal e parabasal do epitélio ao passo que o Ki67 só pode ser observado em camada parabasal (7).

Melhores resultados obtidos por meio do complexo MCM, que regula a replicação do DNA por meio dos fatores CDT1 e CDC6, são possíveis pela ancoragem que estes promovem entre as subunidades MCMs 2-7 e a cromatina, formando um complexo de pré-replicação que permite o início da fase S do ciclo celular seguida pelas fases G2 e M. Este mecanismo permite que sejam diferenciadas células quiescentes de células proliferativas pois, uma vez iniciado, os MCMs mostram-se presentes em todo o ciclo de divisão celular e início da fase de diferenciação, ou seja, seu tempo de meia vida é prolongado, quando comparado ao marcador de atividade proliferativa mais utilizado, o Ki67 (70).

Outro componente do complexo MCM e aqui estudado MCM3, também correlacionado aos altos índices proliferativos, mostrou maior intensidade de expressão em amostras de CEB, quando comparado ao Ki67, ao passo que este, por sua vez, se fez mais significativo em amostras com processo inflamatório ativo, podendo indicar a inexistência de influencia inflamatória na imunopositividade de MCM3 (71).

Ainda em análise de CEB, displasia epitelial e grupo controle representado por mucosa oral íntegra, a expressão de MCM3 restringiu-se à camada basal desta, apresentando escassas células marcadas em camada suprabasal, ao passo que sua imunopositividade passou a abranger todo o terço inferior epitelial em amostras de displasia epitelial moderada abarcando todos os segmentos epiteliais quando em displasia intensa. Já os casos de CEB bem diferenciados apresentaram células não marcadas adjacentes às pérolas córneas, destoando do CEB indiferenciado, no qual se mostrou disseminada a imunomarcação (72). Muito embora o MCM2, assim como os MCMs 4, 5 e 6, já tenham sido amplamente relacionados à agressividade de neoplasias malignas, o MCM3 ainda é pouco mencionado podendo mostrar-se um importante biomarcador celular para o estudo da carcinogênese com o potencial de melhorar a eficácia diagnóstica, e, por conseguinte, o prognóstico e a avaliação de resposta ao tratamento para lesões prémalignas e carcinomas (73–77).

# 3 PROPOSIÇÃO

O presente ensaio trás em seu escopo o objetivo de perscrutar o perfil progressivo da leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) de acordo com o grau de displasia epitelial por meio da expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores pmTOR, pAkt e MCM3, recuperando ainda, dados diagnósticos dos pacientes inseridos na análise a fim de se verificar a existência de correlação entre o diagnóstico da lesão de estudo, demais alterações epiteliais correlatas, carcinoma verrucoso (CV) e carcinoma espinocelular de boca (CEB).

## 3.1 Proposições específicas

- Verificar comparativamente dados epidemiológicos referentes aos pacientes com LVP considerando resultados diagnósticos de biopsias registradas para estes pacientes, dentre eles CV, CEB e demais alterações epiteliais tais como hiperqueratose (HQ), hiperparaqueratose (HP) e displasias epiteliais em seus diferentes níveis, bem como correlacionar diagnóstico, sítio anatômico e espaço de tempo entre biópsias a fim de se elucidar o processo de progressão da lesão;
- Submeter amostras de lesões epiteliais provenientes de pacientes diagnosticados com leucoplasia verrucosa proliferativa em seus diferentes graus de displasia epitelial (discreta, moderada e intensa) à reação imuno-histoquímica para os biomarcadores pmTOR, pAkt e MCM3, avaliando os resultados obtidos de modo convergente à constatação de diagnósticos de enfermidades correlatas de maior potencial lesivo como o CEB.

# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob o parecer de número 1.774.957/2016 (Anexo A).

#### 4.1 Material

Compuseram recursos para efetivação do estudo aqui disposto, dados epidemiológicos e amostras teciduais oriundos do Serviço de Patologia Cirúrgica integrado ao Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP).

4.1.1 Casos e amostras teciduais

Integram o presente ensaio, 28 pacientes diagnosticados com leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) originários de um total de 141 biópsias registradas no mesmo Serviço de Patologia Cirúrgica, sendo, destas, 130 distribuídas entre LVP, carcinoma verrucoso (CV), carcinoma espinocelular de boca (CEB), e demais alterações epiteliais correlatas, entenda-se lesões de LVP que receberam diagnóstico descritivo. Os 11 remanescentes consistiram em diagnósticos alheios à LVP.

Compondo a amostragem pertinente às reações imuno-histoquímicas, espécimes teciduais previamente fixados em formol a 10% em blocos de parafina dos 28 casos com diagnóstico de LVP, foram somados a 4 amostras com diagnóstico de CV e 2 de CEB, totalizando, para tanto, 34 blocos, todos oriundos dos pacientes aqui computados.

#### 4.2 Métodos

Os tópicos subsequentes versam sobre a coleta e verificação dos dados epidemiológicos, processo imuno-histoquímico para os anticorpos pmTOR, pAkt, MCM3 e devido exame de seus produtos, bem como sobre a análise estatística dos resultados obtidos.

## 4.2.1 Dados epidemiológicos

Os 28 pacientes inseridos no estudo, tiveram seus dados clínicos coletados por meio do banco de dados do referido Serviço, compondo estes, informações acerca dos aspectos sequentes: idade, sexo, cor da pele, tabagismo, etilismo, sintomatologia e sítios anatômicos acometidos. Foram levantados ainda, para cada paciente, todos os registros pregressos de biópsias constantes em nossos arquivos. Estes foram tabulados e analisados de modo a se estabelecer correlações com o diagnóstico aqui evidenciado, a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP).

O espaço de tempo compreendido entre o primeiro diagnóstico de LVP, ou lesão correlata, e o último registrado também foi averiguado de modo a possibilitar inferências acerca do número de biópsias, em média, as quais são submetidos os pacientes de LVP, bem como o tempo para ocorrência e confirmação de neoplasia maligna. Somam-se ainda às análises, possíveis correlações entre os carcinomas originários de quadros de LVP e o sexo dos pacientes, sítios anatômicos acometidos e os tipos de alterações epiteliais antecedentes, tais como hiperqueratose (HQ), hiperparaqueratose (HP) e displasias epiteliais em suas diferentes intensidades.

4.2.2 Imuno-histoquímica

Para proceder às reações imuno-histoquímicas, foram efetuados cortes de 3 µm nas amostras emblocadas em parafina, sendo estes estendidos em lâminas

previamente tratadas pelo agente de adesão 3-aminopropyltriethoxysilane (organosilano da marca SIGMA), e posteriormente mantidas em estufa a 60°C overnight.

O efetivo processo imuno-histoquímico iniciou-se com a desparafinização por meio do xilol em um primeiro banho de 30 minutos em estufa a 60°C. Novo banho em xilol por mais 15 minutos em temperatura ambiente precedeu à reidratação em cadeia descendente de etanóis quanto à concentração, partindo de banhos em etanol absoluto até etanol 80%, finalizando com banho em água destilada.

Recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 98°C por 30 minutos, com imersão das lâminas em ácido cítrico pH 6,0. Após banho em água destilada procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena tecidual por meio da imersão em solução de metanol e peróxido de hidrogênio 6% na proporção de 1/1 por duas vezes de quinze minutos. As lâminas foram imersas por três vezes de 5 minutos na solução tampão empregada, esta composta por Tris 50mM e NaCl 150 mM em pH 7,6, possibilitando a incubação dos anticorpos primários, tal como seguem especificados na tabela subsequente, bem como dos anticorpos secundários utilizados na amplificação do sinal oriundo da reação antígeno-anticorpo.

ANTICORPO	TICORPO Anti-pmTOR		Anti-MCM3
CLONE	Ser2448	Thr308	101
TITULAÇÃO	1:50	1:25	1:50
	Sistema	Sistema	Sistema
AWFLIFICAÇAU	Envision	Envision	Advance
	Ácido cítrico (PM	Ácido cítrico (PM	Ácido cítrico (PM
PEC	192,12) pH 6,0	192,12) pH 6,0	192,12) pH 6,0
	em banho úmido	em banho úmido	em banho úmido
ANTIGENICA	aquecido a 95ºC	aquecido a 95ºC	aquecido a 95ºC
	30 minutos	30 minutos	30 minutos
∆ INCUBAÇÃO	18h - 4ºC	18h - 4ºC	18h - 4⁰C
	Cell Signaling	Santa Cruz	Dako
MARCA	Technology	Biotechnology	Carpinteria
	MA, USA	CA, USA	CA, USA

Tabela4.1–Relação entre anticorpos e respectivos sistemas deamplificação, recuperação antigênica e tempo de incubação

Com a finalidade de amplificar o sinal da reação antígeno-anticorpo, foram realizadas incubações dos anticorpos de ligação e complexo terciário por meio dos kits EnVision® + System-HRP (DAKO, K4004, Carpinteria, CA, USA) para os

anticorpos Anti-pAkt e Anti-pmTOR, por 40 minutos, e ADVANCE<sup>™</sup> HRP Link (DAKO, Produktionsvej, Denmark), 45 minutos, e ADVANCE<sup>™</sup> HRP Enzyme, mais 45 minutos, para o anticorpo Anti-MCM3.

Após incubação e novo tamponamento, as reações foram reveladas por meio da diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA) em um espaço de tempo de 10 minutos. Uma vez lavados para remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por 1 minuto e deixados sob discreta queda de água corrente por 5 minutos.

Finalizando o processo, os cortes foram gradualmente desidratados por meio da sequencia ascendente de etanóis em concentrações de 70 a 100%, e diafanizados em xilol para montagem com lamínulas de proteção.

4.2.3 Análise da Imunomarcação

A imunopositividade para os anticorpos testados foi considerada mediante ocorrência de coloração acastanhada celular. No caso dos anticorpos pmTOR e pAkt foram verificadas marcações citoplasmáticas e nucleares. Para o anticorpo MCM3 foram consideradas positivas as marcações nucleares, apenas.

Para pmTOR e pAkt foram realizadas verificações de marcação em áreas de camada espinhosa e camadas germinativas (compreendendo esta última as camadas basal e parabasal), bem como classificação semi-quantitaiva de positividade distribuída por escores de 0 a 3. Tal classificação, também efetuada para MCM3, diferiu neste pelo emprego de análise quantitativa, qual seja: determinação do número exato de células imunorreativas permitindo a referida classificação em escores, tal como indicado na Tabela 4.2, em congruência com a metodologia aplicada em estudos anteriores (11,78).

ESCORES	Intervalo percentual de células imunorreativas
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

Tabela 4.2 – Graduação em escores da positividade imuno-histoquímica nos casos sob análise

Para esta análise, foram capturadas quatro imagens por amostra de campos mais corados (*hot spot*) em aumento de 400x utilizando-se de microscópio óptico (Axio Imager A2, Zeiss, Oberkochen, Germany) acoplado a vídeo-câmera de alta resolução (Axio Cam HRc-Zeiss®) por meio de software específico (Axio Vision, Zeiss).

Das imagens selecionadas, utilizando-se do software WCIF ImageJ (Wright Cell Imaging Facility), foram contadas um mínimo de 500 células/lâmina, dividindo o total de células marcadas pelo montante de células contadas e multiplicado por 100 para a obtenção da porcentagem de marcação e posterior distribuição em escores conforme indicado anteriormente na Tabela 4.2.

#### 5 RESULTADOS

Os dados obtidos no presente ensaio foram organizados em banco de dados, submetidos a análises estatísticas efetuadas por meio do software BioEstat 5.3 e seguem distribuídos entre os tópicos "Casuística e aspectos clínicos" e "Resultados imuno-histoquímicos".

#### 5.1 Casuística e aspectos clínicos

Dos 28 pacientes que compuseram o estudo, 26 eram mulheres correspondendo a 93% dos pacientes, restando somente 2 do sexo masculino (7%), com média de idade de 71,28 ± 10,24 (média ± desvio padrão) sendo mínima de 43 e máxima de 87. Vinte e um pacientes eram leucodermas (88%), 2 xantodermas (8%) e 1 melanoderma (4%). Dezessete pacientes não tabagistas (94%) para 1 tabagista (6%). Da mesma maneira, apenas 1 paciente apresentava referência a etilismo (6%) o contrário de outros 16 (94%). Parte dos dados componentes das variáveis tabagismo, etilismo e cor da pele não puderam ser obtidos.

Foram recuperados todos os diagnósticos emitidos aos pacientes com LVP inseridos no presente estudo, totalizando 141 resultados, quais sejam: carcinoma espinocelular de boca (CEB), processo inflamatório crônico inespecífico (PICI), papiloma (PA), hiperqueratose (HQ), acantose (AC), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), displasia epitelial de moderada a intensa (DEM-I), mucosite (MC), displasia epitelial discreta (DED), mucosite de interface (MCI), líquen plano oral (LPO), hiperqueratose (HP), candidíase (CA), carcinoma verrucoso (CV), carcinoma espinocelular de boca superficialmente invasivo (CEBSI), candidíase hiperplásica (CAH), papilomatose (PL), displasia epitelial intensa (DEI), tampão de queratina (TQ), hiperplasia (HI), disqueratose (DQ), atipia (AT), hiperplasia verrucosa (HV), ulceração (UL), e displasia epitelial intensa (DEI), como se pode observar na Tabela 5.1, juntamente com o tempo entre biópsias e sítios anatômicos que seguem aqui

assinalados: fundo de sulco (FS), mucosa jugal (MJ), rebordo alveolar (RA), língua (LG), assoalho de boca (AB), trígono retromolar (TR), gengiva (GV), lábio (LB), local não informado (LNI) e palato (PT). Destes, 130 correspondendo a resultados diagnósticos correlatos à LVP, ou seja, lesões deste quadro diagnóstico de pacientes já diagnosticados com LVP que receberam resultados descritivos variados devido a sua natureza de curso progressivo que implica em diagnóstico retrospectivo. Os outros 11 resultados corresponderam a diagnósticos diversos não relacionados ao quadro de LVP.

(N)	PACIENTE	BIÓPSIA	DIAGNÓSTICO	L	OCALIZAÇÃO
1	Pac. 1	1(1)	CEB		FS
	Pac. 1	1(2)	PICI	*	MJ
	Pac. 1	1(3)	PA	*	MJ
	Pac. 1	1(4)	HQ		RA
	Pac. 1	1(5)	HQ / AC		FS
	Pac. 1	1(6)	LVP		MJ
	Pac. 1	1(7)	LVP		MJ
	Pac. 1	1(8)	LVP		MJ
2	Pac. 2	2(1)	HQ / DEM-I		MJ
	Pac. 2	2(2)	HQ / <i>MC</i>		LG
	Pac. 2	2(3)	HQ / DED		LG
	Pac. 2	2(4)	HQ / <i>M</i> C		AB
	Pac. 2	2(5)	HQ / DEM-I		RA
	Pac. 2	2(6)	MCI S/d LPO	*	LG
	Pac. 2	2(7)	MCI S/d LPO	*	LG
	Pac. 2	2(8)	HP / AC / <i>MC</i>		RA
	Pac. 2	2(9)	HQ / AC		AB
	Pac. 2	2(10)	HQ / AC / DEM		RA
	Pac. 2	2(11)	LVP / CA		RA
	Pac. 2	2(12)	LVP		RA
	Pac. 2	2(13)	DED		RA
	Pac. 2	2(14)	LVP		RA
	Pac. 2	2(15)	HQ / AC / DEM		LG
	Pac. 2	2(16)	LVP		TR
	Pac. 2	2(17)	LVP		RA
	Pac. 2	2(18)	HQ / <i>MCI</i>		LG
	Pac. 2	2(19)	LVP		LG
	Pac. 2	2(20)	HQ / AC / DED		RA
	Pac. 2	2(21)	HQ / AC		RA
	Pac. 2	2(22)	CV		RA
	Pac. 2	2(23)	HP / AC		RA
	Pac. 2	2(24)	LVP		LG
	Pac. 2	2(25)	LVP		LG

**Tabela 5.1** – Número de casos, especificação de paciente, números de biópsias, diagnósticos e respectivos sítios anatômicos

56

	Pac. 2	2(26)	LVP		LG
	Pac. 2	2(27)	PICI / UL	*	LG
	Pac. 2	2(28)	AC / DED / <i>CA</i> / <i>MC</i>		RA
	Pac. 2	2(29)	HQ / AC / <i>CA / MC</i>		MJ
	Pac. 2	2(30)	HQ / AC		TR
	Pac. 2	2(31)	HQ / AC / DEM		RA
3	Pac.3	3(1)	CEB		RA
	Pac.3	3(2)	LVP		MJ
4	Pac.4	4(1)	LVP		GV
	Pac.4	4(2)	CEBSI		LG
5	Pac.5	5(1)	LVP		LG
6	Pac.6	6(1)	LVP		MJ
7	Pac.7	7(1)	CEBSI		PT
	Pac.7	7(2)	CAH		MJ
	Pac.7	7(3)	HP / PL / AC		MJ
	Pac.7	7(4)	HP / PL / AC		MJ
	Pac.7	7(5)	LVP		MJ
	Pac.7	7(6)	HQ / DEI		LB
	Pac.7	7(7)	LVP		MJ
	Pac.7	7(8)	CV		LB
	Pac.7	7(9)	LVP		MJ
8	Pac.8	8(1)	HQ / AC		LG
	Pac.8	8(2)	HQ / AC / <i>M</i> C		LG
	Pac.8	8(3)	LVP		LG
9	Pac.9	9(1)	PICI / UL		RA
	Pac.9	9(2)	LVP		RA
10	Pac.10	10(1)	LVP		LG
	Pac.10	10(2)	CEB		LG
11	Pac.11	11(1)	LVP		RA
12	Pac.12	12(1)	LVP		RA
13	Pac.13	13(1)	LVP		MJ
	Pac.13	13(2)	LVP		RA
	Pac.13	13(3)	LVP		PT
14	Pac.14	14(1)	LVP		GV
	Pac.14	14(2)	LVP		GV
	Pac.14	14(3)	LVP		RA
15	Pac.15	15(1)	HP / DEM		MJ
	Pac.15	15(2)	LVP / CA		MJ
	Pac.15	15(3)	LPO	*	MJ
	Pac.15	15(4)	HQ / DEM		LB
	Pac.15	15(5)	LVP / CA		LNI
	Pac.15	15(6)	HP / <i>MC</i>		MJ
	Pac.15	15(7)	HQ / DED		LB
16	Pac.16	16(1)	LVP		MJ
	Pac.16	16(2)	HQ / AC		GV
	Pac.16	16(3)	HQ / AC / DED		LG
17	Pac.17	17(1)	LVP		MJ
	Pac.17	17(2)	LVP		RA
18	Pac.18	18(1)	HQ		MJ
	Pac.18	18(2)	HQ		LB
	Pac.18	18(3)	HP / DED		LG

	Pac.18	18(4)	HP / DED		MJ
	Pac.18	18(5)	HP / AC / <i>MC</i> / <i>CA</i>		MJ
	Pac.18	18(6)	HP / AC / <i>MC</i> / <i>CA</i>		MJ
	Pac.18	18(7)	HP / DEM		MJ
	Pac.18	18(8)	LVP		MJ
	Pac.18	18(9)	CEB		MJ
19	Pac.19	19(1)	HP / AC		RA
	Pac.19	19(2)	CEBSI		LG
	Pac.19	19(3)	HP		RA
	Pac.19	19(4)	LVP		PT
	Pac.19	19(5)	AC / TQ		LG
20	Pac.20	20(1)	HI / PI		MJ
	Pac.20	20(2)	DQ / AT		RA
	Pac.20	20(3)			MJ
21	Pac.21	21(1)	CV		M.J
	Pac.21	21(2)			RA
	Pac.21	21(3)			RA
	Pac 21	21(0)			RA
22	Pac 22	27(4)			RA
22	Pac 23	22(1)			RA RA
25	Pac 23	23(2)			MI
24	Pac 24	24(1)			MI
27	Pac 2/	24(1)			
	Pac 2/	24(2)			F
	Dac 24	24(3)			1 G M I
25	Dac 25	24(4)			MI
25	Pac.25	25(1)			
	Pac.25	25(2)			
26	Pac.25	25(3)	CEB		
20	Pac.20	20(1)	CV CV		
	Pac.20	20(2)			
	Pac.20	20(3)			
	Pac.20	20(4)			
	Pac.20	20(3)			
	Fac.20	20(0)			
	Pac.20	20(7)			
	Fac.20	20(8)		*	
	Pac.20	20(9)		*	
	Pac.20	20(10)	PA	*	
	Pac.20	20(11)			
	Pac.20	26(12)	CEBSI		LG
	Pac.20	20(13)			LG
	Pac.20	26(14)			LG
	Pac.20	26(15)			LG
	Pac.20	20(10)	HP / DEM-I		LG
	Pac.26	20(17)	HP / DEM		LG
	Pac.26	∠b(18)	LVP		LG
	Pac.26	∠b(19)	LVP		LG
27	Pac.2/	27(1)	HQ		IVIJ
	Pac.27	27(2)	LVP		MJ
	Pac.27	27(3)	LVP		MJ
	Pac.27	27(4)	HQ / AC / UL		MJ

	Pac.27	27(5)	HQ / AC / <i>MC</i>		MJ
	Pac.27	27(6)	HQ / <i>MC</i>		LNI
	Pac.27	27(7)	CEB		LG
28	Pac.28	28(1)	CA	*	MJ
	Pac.28	28(2)	LVP		LG
	Pac.28	28(3)	DEI		LG

\* Dados não contabilizados pra efeito de análises quantitativas ou qualitativas

Para as próximas análises foram desconsiderados resultados diagnósticos repetidos para cada paciente o que nos deu um montante de 87 para efeitos de análises quantitativas e qualitativas, ou seja, computou-se a frequência de tipos diagnósticos de LVP e correlatos por paciente, ou seja, desconsiderando resultados diagnósticos reincidentes para cada caso como mostra o Gráfico 5.1. Neste, se observa o total de pacientes (28) todos diagnosticados com LVP, 4 diagnosticados também com CV, 11 com CEB e/ou CEBSI, 9 que receberam diagnóstico de HQ, 6 de HP, 4 de DED, 4 de DEM, 2 de DEM-I, 3 de DEI, 9 de AC, 2 de PL, 1 TQ, 1 HI, 1 DQ, 1 AT e 1 HV.



Gráfico 5.1 - Distribuição do número de pacientes por tipo diagnóstico

No Gráfico 5.2 destacam-se os principais resultados diagnósticos recebidos pelo pacientes de LVP, haja vista tratar-se de quadro progressivo em que pesem sejam observados quadros de lesões brancas por HQ ou HP (com a presença ou não de PL), diferentes níveis de displasia epitelial e ocorrências de transformação maligna para CV ou

CEB, como melhor se nota no Gráfico 5.3.



**Gráfico 5.2** – Distribuição do número de pacientes por tipo diagnóstico: Aspectos mais incidentes no diagnóstico final

**Gráfico 5.3** – Distribuição do número de pacientes por tipo diagnóstico: LVP e lesões de desfecho na progressão, CV e CEB+CEBSI



As amostras, estas paramétricas de dados quantitativos categóricos, mostraram distribuição não-Gaussaniana como obtido por meio do teste de Shapiro-Wilkis. Para tanto, foi executado o teste Exato de Fisher a fim de se determinar maior correlação entre a progressão da LVP para CV ou CEB, adotando-se como nível de significância Alpha p valor < 0,05 para aceite da hipótese alternativa e rejeição da hipótese de nulidade. O número de ocorrências do CEB, somado aos resultados diagnósticos de carcinoma espinocelular de boca *in situ* (CEBSI) se mostrou mais prevalente que o CV, confirmado pelo p = 0,041 obtido por meio do teste exato de Fisher.

Comparações múltiplas (post-hoc) foram realizadas entre as variáveis HQ e os diferentes graus de displasia epitelial, quais sejam, DED, DEM, DEM-I e DEI, por meio do teste Kruskal-Wallis que nos remeteu o valor de p = 0,098 com graus de liberdade 4. Da mesma maneira, a HP foi verificada cruzando-se os dados com os graus de displasia epitelial gerando valor p = 0,612 com graus de liberdade 4. Ambos não estatisticamente significantes, não permitindo, para tanto, inferir maior correlação entre a ocorrência de uma ou outra especificação de camada córnea a algum grau de displasia epitelial em particular.

Os diagnósticos recebidos pelos pacientes de CEB e/ou CEBSI também foram correlacionados aos diagnósticos recebidos de DED, DEM, DEM-I e DEI por meio do teste Kruskal-Wallis indicando a inexistência de padrão estatisticamente significante, o que também foi constatado cruzando-se os dados de displasia com o CV.

(C1)		(C2)	P	(C1)		(C2)	Р
LVP	$\rightarrow$	CEB+CEBSI	p 0,041ª	DED	$\rightarrow$	CEB+CEBSI	(ns) <sup>b</sup>
LVP	$\rightarrow$	CV		DEM	$\rightarrow$	CEB+CEBSI	
				DEM-I	$\rightarrow$	CEB+CEBSI	
HQ	$\rightarrow$	DED	р 0,098 <sup>ь</sup>	DEI	$\rightarrow$	CEB+CEBSI	
HQ	$\rightarrow$	DEM					
HQ	$\rightarrow$	DEM-1		DED	$\rightarrow$	CV	р 0,900 <sup>ь</sup>
HQ	$\rightarrow$	DEI		DEM	$\rightarrow$	CV	
				DEM-I	$\rightarrow$	CV	
HP	$\rightarrow$	DED	р 0,612 <sup>ь</sup>	DEI	$\rightarrow$	CV	
HP	$\rightarrow$	DEM					
HP	$\rightarrow$	DEM-1					
HP	$\rightarrow$	DEI					
-							

Tabela 5.2 - Indicação das correlações realizadas entre os dados contidos nas colunas (C1) e (C2)

<sup>a</sup> Teste exato de Fisher. <sup>b</sup> Teste Kruskal-Wallis

A sintomatologia, dado este que, em tese, acompanha as informações enviadas conjuntamente a cada biópsia, foi recuperada dos casos aqui inseridos o que nos remeteu a um percentual de 75% para lesões assintomáticas e 25% para lesões consideradas sintomáticas.

Considerando o número de biópsias relacionadas, foram contabilizados os

sítios anatômicos afetados por lesões de LVP em seus diversos aspectos e diagnósticos desconsiderando os casos correspondentes às lesões malignas. Os resultados obtidos mostraram maior prevalência no acometimento de MJ (n=32), LG (n=30) e RA (n=30) conforme representado pelo Gráfico 5.4.



**Gráfico 5.4** – Distribuição do número de biópsias com diagnósticos correlatos à LVP por sítio anatômico

Com o intuito ainda de se correlacionar sítios anatômicos com o desenvolvimento neoplásico, foram contabilizadas as biópsias diagnosticadas com CV e CEB e/ou CEBSI para cada sítio anatômico. Para CV, se observou maior prevalência no acometimento de língua (n=3) e a ocorrência também em RA (n=1), MJ (n=1) e lábio (n=1). Também no CEB e ou/CEBSI, a LG apresentou maior prevalência no acometimento (n=5), seguida por MJ (n=3), PT (n=2), FS (n=2) e RA (n=1), como evidencia o Gráfico 5.5.

**Gráfico 5.5** – Distribuição do número de biópsias com diagnósticos de CV e CEB+CEBSI por sítio anatômico



#### 5.2 Resultados imuno-histoquímicos

As amostras submetidas aos processos imuno-histoquímicos consistiram de 28 espécimes de LVP, ou seja, uma amostra para cada paciente diagnosticado, tendo sido estas, diagnosticadas propriamente como a lesão de estudo na emissão dos respectivos laudos. Também integraram tais processos laboratoriais 04 amostras de CV e 02 de CEB, todos diagnosticados com LVP.

Em uma primeira análise, foi obtida a proporção de casos com positividade citoplasmática e/ou nuclear para os anticorpos pmTOR e pAkt distribuídos por escores (0, 1, 2 e 3) se utilizando de análise semiquantitativa. Por conseguinte, as marcações imuno-histoquímicas foram classificadas por presença ou ausência (variáveis dicotômicas) nas camadas epiteliais espinhosa e germinativas, quais sejam, estratos basal e parabasal.

Para o reagente MCM3, foram considerados positivos os casos apresentando marcação acastanhada nuclear, resultados estes obtidos pela contagem do total de células marcadas e divisão pelo total de células marcadas e não marcadas presentes no campo capturado, considerando um mínimo de 500, e sequente multiplicação por 100 permitindo, para tanto, a então classificação por escores (análise quantitativa). Outra verificação permitiu determinar áreas de abrangência

imunopositiva considerando a seguinte divisão: terço epitelial inferior (voltado para a membrana basal), terço médio e terço superior (voltado para a camada córnea).

### 5.2.1 PmTOR

Positividade para o reagente pmTOR, pôde ser observada por marcação acastanhada de maior intensidade em camadas altas do estrato espinhoso epitelial abrangendo tanto área de citoplasma celular quanto área de núcleo (Figura 5.1A), neste último caso evidenciando ainda células mitóticas tal como mostra a Figura 5.1B.

Figura 5.1 – Reação imuno-histoquímica em amostra de LVP para o anticorpo pmTOR: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Os resultados obtidos apontaram uma ampla marcação citoplasmática pelo reagente pmTOR em amostras de LVP, para a qual 100% (n=28) dos casos ficou contido nas searas dos escores 3 (86%), 2(11%) e 1(4%). Complementando estes, verificou-se ainda uma parcela de casos positivos apresentando marcação nuclear de 21% (n=6), estes, classificados em escore 3 (14%, n=4) e escore 1 (7%, n=2). O esboço taxativo dos resultados acima descritos pode ser observado na Tabela 5.3.

Em análise por segmentos epiteliais, todos os casos apresentaram marcação em camada espinhosa quando analisada em citoplasma, e os 21% (n=6) de

imunopositividade nuclear mencionados anteriormente, também se fez presente no referido extrato epitelial.

Já as camadas germinativas compuseram alvo de marcação citoplasmática em 57% (n=16) dos casos e de marcação nuclear em 7% (n=2) destes. Esta última, marcação nuclear em camadas germinativas, foi verificada em amostras de pacientes que também apresentaram diagnósticos de neoplasia, quais sejam: Pac.7 (CV em LB e CEBSI em PT) e Pac.18 (CEB em MJ). Compuseram ainda os 4 casos de positividade nuclear restrita à camada espinhosa: Pac.1 com CEB em FS, Pac.16 sem diagnóstico de neoplasias, Pac.24 com CEB em PT, CEB em FS, e CEB em MJ e Pac.27 apresentando CEB em LG.

**Tabela 5.3** – Marcação imuno-histoquímica para pmTOR em LVP distribuída em escores e segmentos epiteliais (camada espinhosa e camadas germinativas)

pmTOR/LVP	(+) Citoplasmática	%	(+) Nuclear	%
Esc(3)	24	86%	4	14%
Esc(2)	3	11%	0	0%
Esc(1)	1	4%	2	7%
Esc(0)	0	0%	22	79%
C.Espinhosa(+)	28	100%	6	21%
C.Espinhosa(-)	0	0%	22	79%
C.Germinativas(+)	16	57%	2	7%
C.Germinativas(-)	12	43%	26	93%
Total (+)	28	100%	6	21%

Vislumbra-se, no Gráfico 5.6, a distribuição por escores considerando tanto marcação citoplasmática quanto nuclear para o reagente pmTOR em lâminas de LVP. Neste, é possível notar a grande incidência em escore 3 para marcação citoplasmática bem como em escore 0 para marcação nuclear.





O Gráfico 5.7, por seu turno, exibe a especificidade de marcação (citoplasmática e nuclear) por camadas epiteliais para pmTOR em lesões de LVP, por meio do qual se observa que tanto a camada espinhosa quanto as camadas germinativas, são frequentemente positivas para marcação citoplasmática, ao contrário do que ocorre quando se analisa a positividade nuclear. Nota-se ainda moderado predomínio de marcação em camada espinhosa quando comparado às camadas germinativas.





A Figura 5.2 A-B subsequente, traz o resultado imuno-histoquímico de pMTOR em amostra de CV, pela qual se pode observar marcação acastanhada a exemplificar sua maior prevalência em citoplasma de células centrais.

**Figura 5.2** – Reação imuno-histoquímica em amostra de CV para o anticorpo pmTOR: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Todos os casos de CV oriundos de pacientes diagnosticados com LVP, quando submetidos ao reagente pmTOR, mostraram positividade citoplasmática ficando dentro dos escores 3 e 2 com 75% (n=3) e 25% (n=1), respectivamente. Considerando ainda a marcação citoplasmática, esta se mostrou evidente apenas em camada espinhosa epitelial, não ocorrendo de maneira significativa em camadas basal e parabasal, como se observa expressamente na Tabela 5.4. Por outro lado, apenas 1 caso (25%) apresentou marcação nuclear e esta se fez evidente tanto em camada espinhosa quanto em camadas germinativas, sendo este originário do Pac.21 em cujos diagnósticos, constou-se apenas CV em MJ e LVP em RA.

pmTOR/CV	(+) Citoplasmática	%	(+) Nuclear	%
Esc(3)	3	75%	1	25%
Esc(2)	1	25%	0	0%
Esc(1)	0	0%	0	0%
Esc(0)	0	0%	3	75%
C.Espinhosa(+)	4	100%	1	25%
C.Espinhosa(-)	0	0%	3	75%
C.Germinativas(+)	3	75%	1	25%
C.Germinativas(-)	1	25%	3	75%
Total (+)	4	100%	1	25%

**Tabela 5.4** – Marcação imuno-histoquímica para pmTOR em CV de pacientes também diagnosticados com LVP, distribuída em escores e segmentos epiteliais (camada espinhosa e camadas germinativas)

Por meio do Gráfico 5.8, se nota a concentração de casos positivos em escore 3 em marcação citoplasmática e em escore 0 para marcação nuclear.

**Gráfico 5.8** – Distribuição de marcação imuno-histoquímica para pmTOR em CV de pacientes também diagnosticados com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



A distribuição de células marcadas por estratos epiteliais pode ser visualizada no Gráfico 5.9, no qual se evidencia homogeneidade de marcação entre as camadas espinhosa e germinativa para ambos os tipos de positividade (citoplasmática e nuclear). **Gráfico 5.9** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em CV de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando o segmento epitelial (camada espinhosa e camadas germinativas)



Na sequência, se verifica a reação para o mesmo anticorpo em amostras neoplásicas de CEB originárias de pacientes diagnosticados com LVP, como se verifica na Figura 5.3 A-B, na qual acastanhada pigmentação distribui-se amplamente por citoplasma e eventuais núcleos celulares.

**Figura 5.3** – Reação imuno-histoquímica em amostra de CEB para o anticorpo pmTOR: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Amostras de CEB de pacientes com LVP submetidas à reação imunohistoquímica para pmTOR, como mostra a Tabela 5.5, resultaram em proporção de marcação citoplasmática compatível com escore 3 em seus 2 casos (100%), ficando em 50% (n=1) a ocorrência de marcação nuclear de amostra oriunda do Pac.18, esta também em escore 3 e o outro caso (Pac.24) em escore 0 para positividade em núcleo. Ambos os casos de CEB (100%, n=2) tiveram sua marcação citoplasmática localizada tanto em camada espinhosa quanto em camadas germinativas, da mesma maneira, o caso de marcação nuclear abrangeu ambos os estratos epiteliais.

**Tabela 5.5** – Marcação imuno-histoquímica para pmTOR em CEB de pacientes também diagnosticados com LVP, distribuída em escores e segmentos epiteliais (camada espinhosa e camadas germinativas)

pmTOR/CEB	(+) Citoplasmática	%	(+) Nuclear	%
Esc(3)	2	100%	1	50%
Esc(2)	0	0%	0	0%
Esc(1)	0	0%	0	0%
Esc(0)	0	0%	1	50%
C.Espinhosa(+)	2	100%	1	50%
C.Espinhosa(-)	0	0%	1	50%
C.Germinativas(+)	2	100%	1	50%
C.Germinativas(-)	0	0%	1	50%
Total (+)	2	100%	1	50%

Na sequência se nota a expressão gráfica da distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR nos casos de CEB (Gráfico 5.10) com prevalência de escore 3 para positividade em citoplasma e divisão entre escore 3 e 0 para positividade nuclear.
**Gráfico 5.10** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em CEB de pacientes também diagnosticados com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



No Gráfico 5.11 é possível notar distribuição homogênea de positividade para pmTOR por camadas epiteliais espinhosa e germinativas.

**Gráfico 5.11** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em CEB de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando o segmento epitelial (camada espinhosa e camadas germinativas)



Em análise gráfica inclusiva para amostras de LVP, CV e CEB (total n=34) submetidas à reação imuno-histoquímica para o anticorpo pmTOR, se pode observar ampla prevalência de resultados escore 3 com 85% (n=29) dos casos em marcação citoplasmática. Em contrapartida, ao se verificar a classificação em

escores para a marcação nuclear, esta se mostrou pouco incidente nas lesões estudadas, ficando em 76% (n=26) a taxa de escore 0, ou seja, de 0-5% o total de células positivas, como delineado no Gráfico 5.12.

**Gráfico 5.12** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pmTOR em LVP, CV e CEB, ambas neoplasias de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



Contrapondo ainda os resultados do reagente pmTOR para as lesões analisadas, LVP, CV e CEB por meio do Gráfico 5.13, é possível depreender que existe uma distribuição equivalente entre positividade de camada espinhosa e germinativas para as amostras de neoplasia (CV e CEB) ao passo que a marcação em camada espinhosa se faz preponderante com relação às camadas germinativas em amostras de LVP.



**Gráfico 5.13** – Distribuição de marcação para pmTOR considerando camadas epiteliais (espinhosa e germinativas) em LVP, CV e CEB, ambas neoplasias de pacientes diagnosticados também com LVP

5.2.2 PAkt

Pigmentação acastanhada por reação ao anti-pAkt em amostras de LVP, se mostrou difusa cobrindo porções inferior, média e superior da camada espinhosa epitelial com maior intensidade de marcação nas duas últimas, como exibe a Figura 5.4 A-B, abarcando, ainda, estratos germinativos. Tanto citoplasma quanto núcleo se mostraram positivos para o referido anticorpo em proporções díspares. Ademais, proeminente marcação melhor ilustrada pela Figura 5.4 B, foi observada em figuras de mitose, tal como anteriormente verificado em amostras submetidas ao anti-pmTOR.

**Figura 5.4** – Reação imuno-histoquímica em amostra de LVP para o anticorpo pAkt: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Todos os casos de LVP (n=28) submetidos à reação imuno-histoquímica para o anticorpo pAkt mostraram positividade, ainda que em diferentes graus de marcação. Tal distribuição se mostrou inclinada ao escore 3 com 86% (n=24) dos casos de positividade citoplasmática e 68% (n=19) dos casos de positividade nuclear, como esboça a Tabela 5.6. A marcação nuclear se mostrou prevalente para pAkt, sendo a menor parcela composta por 18% (n=5) dos casos de escore 0, estes originários dos seguintes pacientes: Pac.7 (também diagnosticado com CV em LB e CEBSI em PT), Pac.10 (com CEB em LG), Pac.11 (sem neoplasias), Pac.19 (CEBSI em LB) e Pac.22 (sem neoplasias).

Analisando esta marcação por segmento epitelial, pode ser observada positividade citoplasmática em camada espinhosa para 96% (n=27) dos casos e em camadas germinativas para 71% (n=20). Ainda considerando a localização de marcação, positividade nuclear em camada espinhosa ocorreu em 75% (n=21) das amostras e em camadas germinativas ficou em 57% (n=16).

pAkt/LVP	(+) Citoplasmática	%	(+) Nuclear	%
Esc(3)	24	86%	19	68%
Esc(2)	3	11%	4	14%
Esc(1)	1	4%	0	0%
Esc(0)	0	0%	5	18%
C.Espinhosa(+)	27	96%	21	75%
C.Espinhosa(-)	1	4%	7	25%
C.Germinativas(+)	20	71%	16	57%
C.Germinativas(-)	8	29%	12	43%
Total (+)	28	100%	23	82%

**Tabela 5.6** – Marcação imuno-histoquímica para pAkt em LVP distribuída em escores e segmentos epiteliais (camada espinhosa e camadas germinativas)

Por meio do Gráfico 5.14 se nota a prevalência de escore 3, tanto para marcação citoplasmática quanto nuclear, ao passo que no escore 0 se enquadra apenas a categoria marcação nuclear.

**Gráfico 5.14** – Distribuição de marcação imuno-histoquímica para pAkt em LVP considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



Destoando do observado para o reagente pmTOR, nos resultados obtidos por meio da utilização do pAkt em lesões de LVP, é possível notar certa tendência à paridade tanto entre as ocorrências de positividade em área de camada espinhosa e camadas germinativas, bem como entre marcações de cunho citoplasmático e nuclear, tal como indica o Gráfico 5.15, destacando-se a frequência desta última.

**Gráfico 5.15** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pAkt em LVP considerando o segmento epitelial (camada espinhosa e camadas germinativas)



Núcleos bem marcados além de coloração acastanhada levemente esmaecida em citoplasma celular podem ser observados por todos os estratos epiteliais da amostra de CV que vem ilustrar a reação desta neoplasia ao antipAkt, tal como ilustrado por meio da Figura 5.5 A-B.

**Figura 5.5** – Reação imuno-histoquímica em amostra de CV para o anticorpo pAkt: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Da mesma maneira que o observado em lesões de LVP, todas as amostras de CV (n=4) foram positivas para pAkt integrando em todos os casos escore 3 para positividade citoplasmática. Já a marcação de núcleo dividiu-se em escore 3 com

75% (n=3) dos casos e escore 0 com uma fatia de 25% (n=1), este proveniente do Pac.2, associado ao registro de inúmeras biópsias sendo destas apenas uma de neoplasia, o referido CV.

O montante das amostras (100%, n=4) também exibiu marcação citoplasmática em camadas germinativas, porém 50% (n=2), apenas, revelou positividade nuclear para as mesmas, conforme exposto na Tabela 5.7. Pacientes de cujos resultados apontaram positividade nuclear em camadas germinativas foram: Pac.21 (além do analisado CV de MJ, somente LVP) e Pac.26 (3 CVs em LG e CEBSI também em LG). Os outros 2 resultados negativos para marcação nuclear em camadas basal e parabasal foram: o Pac.2 supracitado e o Pac.7 (diagnosticado com o CV de LB aqui analisado, além de CEBSI em PT).

pAkt/CV	(+) Citoplasmática	%	(+) Nuclear	%
Esc(3)	4	100%	3	75%
Esc(2)	0	0%	0	0%
Esc(1)	0	0%	0	0%
Esc(0)	0	0%	1	25%
C.Espinhosa(+)	4	100%	3	75%
C.Espinhosa(-)	0	0%	1	25%
C.Germinativas(+)	4	100%	2	50%
C.Germinativas(-)	0	0%	2	50%
Total (+)	4	100%	3	75%

**Tabela 5.7** – Marcação imuno-histoquímica para pAkt em CV de pacientes diagnosticados também com LVP, distribuída em escores e segmentos epiteliais (camada espinhosa e camadas germinativas)

Por meio do Gráfico 5.16, é possível perceber a predominância de escore 3 para marcação nuclear e citoplasmática de pAkt em amostras de CV tal como o observado em amostras de LVP.

**Gráfico 5.16** – Distribuição de marcação imuno-histoquímica para pAkt em CV de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



Expressão esquemática dos resultados para o referido anticorpo em amostras de CV quando considerado o segmento epitelial envolvido pela reação, é exibida no Gráfico 5.17 subsequente, no qual se observa certo equilíbrio entre as variáveis camada espinhosa e germinativas enquanto ocorre desnível entre as variáveis marcação citoplasmática e nuclear com menor predominância desta.

**Gráfico 5.17** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pAkt em CV de pacientes também diagnosticados com LVP, considerando o segmento epitelial (camada espinhosa e camadas germinativas)





Exuberante e amplamente disseminada marcação tanto citoplasmática quanto nuclear pode ser vista em amostras de CEB submetidas ao reagente pAkt, como demonstrado na Figura 5.6 A-B.

**Figura 5.6** – Reação imuno-histoquímica em amostra de CEB para o anticorpo pAkt: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Resultados obtidos pela exposição de amostras teciduais de CEB originários de pacientes com LVP, ao reagente pAkt integraram em sua totalidade (100%, n=2) escore 3 tanto em marcação citoplasmática quanto nuclear, como indicado na Tabela 5.8.

Também compuseram integralmente (100%, n=2) os resultados de positividade citoplasmática e nuclear em camada espinhosa, bem como resultados de marcação citoplasmática em camadas germinativas, ficando em 50% (n=1) a porção de marcação nuclear destas.

Quando nos remetemos aos pacientes dos quais foram obtidas as amostras em análise, ao se considerar a ocorrência de positividade tanto nuclear quanto citoplasmática em camadas espinhosa e germinativas, tais resultados advieram do Pac.18 (diagnóstico de neoplasia: apenas o CEB de MJ aqui em análise), ficando o Pac.24 (CEB em PT e o CEB em FS aqui estudado) com ausência especificamente de positividade nuclear em camadas germinativas.

pAkt/CEB	(+) Citoplasmática	%	(+) Nuclear	%
Esc(3)	2	100%	2	100%
Esc(2)	0	0%	0	0%
Esc(1)	0	0%	0	0%
Esc(0)	0	0%	0	0%
C.Espinhosa(+)	2	100%	2	100%
C.Espinhosa(-)	0	0%	0	0%
C.Germinativas(+)	2	100%	1	50%
C.Germinativas(-)	0	0%	1	50%
Total (+)	2	100%	2	100%

**Tabela 5.8** – Marcação imuno-histoquímica para pAkt em CEB de pacientes diagnosticados também com LVP, distribuída em escores e segmentos epiteliais (camada espinhosa e camadas germinativas)

O Gráfico 5.18 disposto abaixo, ilustra a concentração dos casos de CEB em grau máximo de marcação indicado pelo escore 3.

**Gráfico 5.18** – Distribuição de marcação imuno-histoquímica para pAkt em CEB de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



Camada espinhosa e camadas germinativas neoplásicas de CEB foram igualmente afetadas pela reação ao pAkt quando considerado o citoplasma celular, tal como ilustra o Gráfico 5.19, ficando a marcação nuclear em déficit quando em análise os estratos basal e parabasal.

**Gráfico 5.19** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pAkt em CEB de pacientes também diagnosticados com LVP, considerando o segmento epitelial (camada espinhosa e camadas germinativas)



Por meio do Gráfico 5.20 é possível visualizar em paralelo a distribuição de marcação para o reagente pAkt em amostras de LVP, CV e CEB (total n=34), bem como sua expressiva prevalência em escore 3, ficando em 88% (n=30) por positividade citoplasmática, e 71% (n=24) quando considerada marcação nuclear. A prevalência em escore 2, segunda maior observada somando-se marcação nuclear e citoplasmática, foi composta apenas e tão somente por amostras de LVP (n=7). Em terceira posição aloca-se escore 0 com marcação nuclear em LVP (n=5) e em CV (n=1), totalizando 6 casos com 0-5% de células positivas.

**Gráfico 5.20** – Distribuição de marcação citoplasmática e nuclear para pAkt em LVP, CV e CEB, ambas neoplasias de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



Ainda dispostos de maneira comparativa, os dados obtidos pela utilização do reagente pAkt em LVP, CV e CEB, exibem proporções relativamente equivalentes entre si para positividade em camada espinhosa e camadas germinativas (Gráfico 5.21).



**Gráfico 5.21** – Distribuição de marcação para pAkt considerando camadas epiteliais (espinhosa e germinativas) em LVP, CV e CEB, ambas neoplasias de pacientes diagnosticados também com LVP

5.2.3 MCM3

Marcações acastanhadas com especificidade nuclear foram observadas em amostras submetidas à reação imuno-histoquímica mediante aplicação do reagente anti-MCM3, como ilustra as Figuras 5.7 A-B, 5.8 A-B e 5.9 A-B em espécimes de LVP, CV e CEB, respectivamente. Como se nota nas imagens referenciais, a imunopositividade para o assinalado anticorpo tende a concentrar-se no terço inferior do epitélio, no sentido da membrana basal, passando a se mostrar presente também nos terços médio e superior de maneira diretamente proporcional ao comprometimento tecidual. Importa salientar que os casos observados com marcação em terço superior, apresentaram também, naturalmente, positividade em terços médio e inferior.

Figura 5.7 – Reação imuno-histoquímica em amostras de LVP para o anticorpo MCM3: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



O total de espécimes positivos para MCM3 em lesões de LVP ficou em 96% (n=27). Na distribuição por escores de imunomarcação, observou-se predominância de escore 2 com 46% (n=13) dos casos e escore 3 com 32% (n=9), ficando em 18% (n=5) o escore 1 e 4% (n=1) o escore 0, assim como exibe a Tabela 5.9.

Ao se analisar a abrangência de tal marcação pelos segmentos epiteliais, foram considerados terço inferior (adjacente à membrana basal), terço médio e terço superior (adjacente à camada córnea), ficando o primeiro com 96% (n=27) dos casos, ou seja, todos os casos de LVP que foram positivos para MCM3 abarcaram as camadas mais baixas do tecido epitelial. Estendendo-se ainda para terço médio, a marcação de 25% (n=7) dos casos se fez evidente. Por fim, apenas e tão somente 7% (n=2) dos casos mostraram também imunopositividade em terço superior epitelial.

Os pacientes que apresentaram imunopositividade em terço inferior e médio epitelial foram os que seguem: Pac.6, Pac.9, Pac.20, Pac.22 e Pac.28, todos sem diagnóstico de neoplasias; Pac.10 com CEB em LG e Pac.25 com CEB em MJ. Integraram ainda o grupo de pacientes cujos resultados abrangeram adicionalmente terço superior Pac.10 (CEB em LG) e Pac.20 (sem neoplasias). O resultado descrito, a priori, não permite diferenciar traços de iminente ou não iminente tendência à transformação neoplásica por meio da utilização de MCM3 em amostras de LVP.

MCM3/LVP	(+) Nuclear	%
Esc(3)	9	32%
Esc(2)	13	46%
Esc(1)	5	18%
Esc(0)	1	4%
Terço inferior	27	96%
Terço médio	7	25%
Terço superior	2	7%
Total (+)	27	96%

**Tabela 5.9** – Marcação imuno-histoquímica para MCM3 em LVP, distribuída em escores e segmentos epiteliais (terço inferior, médio e superior)

Amostras de CV submetidas ao reagente MCM3 mostraram positividade núcleo-específica em células basais e parabasais, bem como em células de camada espinhosa, abrangendo área de terços inferior, médio e superior. A Figura 5.8 A-B exibe tal marcação em um dos espécimes analisados.

**Figura 5.8** – Reação imuno-histoquímica em amostras de CV para o anticorpo MCM3: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Todos os casos de CV (n=4) oriundos de pacientes diagnosticados com LVP foram positivos para MCM3, todos classificados em escore 3 como apontado pela Tabela 5.9. Tal marcação, naturalmente, se fez presente em terço inferior epitelial para o mesmo número de casos (100%, n=4), abrangendo ainda terço médio em 50% (n=2) dos casos e alcançando terço superior em 25% (n=1) destes. Até terço médio atingiu a marcação de amostras oriundas do Pac.7 (CEBSI em PT e o CV

analisado em LB) e do Pac.21, este, por sua vez, chegando até terço superior, com diagnóstico unicamente do CV em MJ aqui inserido.

MCM3/CV	(+) Nuclear	%
Esc(3)	4	100%
Esc(2)	0	0%
Esc(1)	0	0%
Esc(0)	0	0%
Terço inferior	4	100%
Terço médio	2	50%
Terço superior	1	25%
Total (+)	4	100%

**Tabela 5.10**– Marcação imuno-histoquímica para MCM3 em CV, distribuída em escores e segmentos epiteliais (terço inferior, médio e superior)

Na sequência, em abordagem aos resultados envolvendo CEB frente ao reagente de proliferação celular MCM3, a Figura 5.9 A-B vem ilustrar tal reação em suas marcações nucleares específicas abarcando os três segmentos epiteliais analisados.

**Figura 5.9**– Reação imuno-histoquímica em amostras de CEB para o anticorpo MCM3: Objetiva 10x (A); objetiva 40x (B)



Os espécimes analisados de CEB de pacientes com LVP também mostraram positividade integral para MCM3 (100%, n=2) classificados em escore 3 (50%, n=1)

e escore 1 (50%, n=1). Estes ainda exibiram positividade em terço inferior para 100% (n=2) dos casos, em terço médio (50%, n=1) e em terço superior (50%, n=1), como se observa na Tabela 5.11. O caso de imunopositividade em abrangência a terços médio e superior foi oriundo do Pac.18 (referido caso de CEB em MJ).

MCM3/CEB	(+) Nuclear	%
Esc(3)	1	50%
Esc(2)	0	0%
Esc(1)	1	50%
Esc(0)	0	0%
Terço inferior	2	100%
Terço médio	1	50%
Terço superior	1	50%
Total (+)	2	100%

**Tabela 5.11** – Marcação imuno-histoquímica para MCM3 em CEB, distribuída em escores e segmentos epiteliais (terço inferior, médio e superior)

Por conseguinte, o Gráfico 5.22 vem esboçar os dados obtidos pela distribuição em escores para o MCM3 em amostras de LVP, CV e CEB (total n=34). Neste, se pode notar predomínio de escore 3 para as três variáveis somadas, totalizando 41% (n=14) dos casos, ainda que os casos de LVP tenham ficado, em sua maioria, dentro do escore 2.

**Gráfico 5.22** – Distribuição de marcação nuclear para MCM3 em LVP, CV e CEB, ambas neoplasias de pacientes diagnosticados também com LVP, considerando a proporção de células positivas classificadas por escores



A abrangência de marcação de terço inferior para médio e superior nos casos de LVP, CV e CEB pode ser visualizada no Gráfico 5.23 pelo qual se pode depreender maior restrição em LVP às camadas baixas epiteliais com uma maior tendência à distribuição uniforme entre os terços epiteliais por lesões de CV e CEB.

**Gráfico 5.23** – Distribuição de marcação para MCM3 considerando segmentos epiteliais (terço inferior, médio e superior) em LVP, CV e CEB, ambas neoplasias de pacientes diagnosticados também com LVP



## 6 DISCUSSÃO

O presente ensaio foi composto por 93% de pacientes do sexo feminino diagnosticadas com leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) em uma proporção de 13:1 mulheres/homens, confirmando a maior prevalência no acometimento de pacientes do sexo feminino como averiguado em estudos anteriores (1,2,6–9). Quanto à faixa etária, esta se mostrou ampla com uma distribuição partindo de 43 a 87 anos de idade, a considerar idade no momento da biópsia inicial, resultando em uma média de idade de 71,28 sendo esta mais avançada que a descrita na literatura, qual seja: sexta década de vida (1,2,8,10). Pacientes leucodermas corresponderam à maior parte dos casos, muito embora não haja que se falar em predileção por cor de pele ou origem (10).

Outro aspecto analisado que pode aqui ser inferido, assentindo com a literatura, é a não correlação entre o tabagismo e o surgimento, evolução e recidiva da LVP, uma vez que os pacientes declarados não tabagistas, assim como não etilistas, compuseram a maior parte da amostragem, divergindo do que notadamente se confirma para leucoplasias orais (2,7,9,11).

No tocante aos apontamentos precípuos da LVP assinalados por Hansen em 1985 (1) e embasados por ensaios posteriores, quais sejam, curso evolutivo com progressão em dimensão e surgimento de novos focos em multiplicidade de acometimento (1,2,9,11,12), destacamos dados que refletem tais circunstâncias inerentes à LVP: dos 28 pacientes estudados, 130 foram as biópsias em cujos resultados se inseriam no contexto da patologia em análise, resultando em uma proporção de 4 biópsias/paciente, com o valor mínimo de 1 biópsia/paciente e valor máximo de 30 biópsias/paciente.

Compuseram diagnósticos não relacionados, ou não diretamente relacionados, à LVP: processo inflamatório crônico inespecífico (PICI), papiloma (PA), mucosite (MC), mucosite de interface (MCI), líquen plano oral (LPO), candidíase (CA), candidíase hiperplásica (CAH) e ulceração (UL). Destes, cabe mencionar incidência do fungo *Candida albicans* em lesões de CA e CAH, de maneira isolada ou, na maioria das vezes, conjunta com a LVP, com maior incidência em mucosa jugal (MJ) neste último caso, como mostram os 9 diagnósticos

distribuídos pela Tabela 5.1.

Acerca ainda dos diagnósticos não correlacionados diretamente à LVP e somados aos diagnósticos descritivos, podemos citar a ocorrência da mucosite (MC), ou seja, a presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear concentrado em áreas justaepiteliais da lâmina própria. Tal condição esteve presente em 17 diagnósticos descritivos correlacionados à LVP, o que nos remete a um dos aspectos histopatológicos que podem estar presentes nos cortes de LVP somando-se às alterações epiteliais.

Também constou em nosso rol diagnóstico a ocorrência de 1 paciente com 1 diagnóstico de líquen plano oral (LPO) em MJ e 1 paciente com 2 diagnósticos de mucosite de interface sugestivo de líquen plano oral (MCI S/d LPO) em língua (LG), o que nos remete a algumas possibilidades tais como a somatória de descrição clínica tendenciosa com material de biópsia em áreas não representativas mais inflamação em banda justaepitelial, ou mesmo um quadro de comprometimento imunológico de LPO concomitante à LVP como correlacionado em um estudo recente (13).

Já os casos com diagnósticos relacionados à LVP, como carcinoma verrucoso (CV), carcinoma espinocelular (CEB), carcinoma espinocelular superficialmente invasivo (CEBSI) e os diagnósticos descritivos inerentes ao respectivo quadro, seguem abordados na sequência. Para estes, se considerou o número de pacientes com determinado resultado a fim de se verificar a frequência de cada tipo diagnóstico, não sendo computados, para tanto, diagnósticos reincidentes por paciente.

Das lesões correlatas, tal como apontado pelo Gráfico 5.1, obtivemos resultados que englobaram hiperqueratose (HQ) e hiperparaqueratose (HP) com prevalência do primeiro, diferentes graus de displasia epitelial, ou seja, displasia epitelial discreta (DED), displasia epitelial moderada (DEM), displasia epitelial de moderada a intensa (DEM-I) e displasia epitelial intensa (DEI), sendo estes, juntamente com a acantose (AC), os principais resultados e de maior incidência nos diagnósticos descritivos (Gráfico 5.2), além de outros, também verificados como papilomatose (PL), tampão de queratina (TQ), hiperplasia (HI), disqueratose (DQ), atipia (AT) e hiperplasia verrucosa (HV). Tais resultados (Gráfico 5.1) consistem em elementares da própria patologia estudada em seu aspecto histopatológico e se fazem inevitáveis em seu perfil descritivo, visto tratar-se de lesão de curso

progressivo e diagnóstico essencialmente retrospectivo (1-3,8,10).

Estima-se que a ocorrência de progressão neoplásica na LVP gire em torno de 70% dos casos. Em nosso ensaio obtivemos um percentual de 14% incidindo em CV e, compondo a maioria dos casos no referido contexto, 39% em CEB e/ou CEBSI (diferença estatisticamente significante com p = 0,041) resultando em um total de 54% dos casos de LVP com transformação maligna, como ilustrado no Gráfico 5.3. Tal contexto ressalta-nos o obscuro prognóstico ao qual aponta a enfermidade em análise por seu alto potencial gerador de CEB (9,11,14), neoplasia maligna tendente a processos metastáticos e óbito.

A maior parte das lesões de LVP foram declaradas assintomáticas e os sítios anatômicos mais acometidos pelas lesões foram MJ, LG e rebordo alveolar (RA) em proporções pouco destoantes entre si e leve predominância da primeira, divergindo parcialmente, no entanto, de estudos que apontam RA e gengiva (GV) como áreas de maior acometimento (3,5,9,11). Para tais variáveis foi considerada ainda, sua relação com os casos de CV, CEB e CEBSI, dados estes os quais ressaltaram uma maior prevalência no envolvimento de LG tanto para CV como para CEB e/ou CEBSI, estando só a LG envolvida no acometimento neoplásico de 42% dos casos, seguida por MJ com 21% dos casos, como indicado pelo Gráfico 5.5, ao passo que encontramos na literatura, além da referência à predominância de LG nestes casos, a prevalência também de GV (11) o que não foi observado em nossa pesquisa, ficando um n=0 para o sítio anatômico em questão.

A análise das proteínas Akt/mTOR por reação imuno-histoquímica se voltou para suas formas ativadas por fosforilação, atuantes na sobrevivência celular, supressão da apoptose e correlação prévia à progressão de displasias epiteliais a CEB (25,26,36–38,79,80). Análise anterior de pmTOR em displasias epiteliais de boca apresentou pequena parcela de positividade nestas (53), em contrapartida, todos os casos de LVP em nosso estudo se mostraram pmTOR-positivos, em congruência com o marcante potencial de transformação neoplásica apresentado pela referida lesão (2,5).

A marcação de pAkt em amostras de LVP, CV e CEB se fez evidente tanto em circunscrição de núcleo quanto em citoplasma celular, todos com alto índice de marcação em escore 3, ao passo que os resultados obtidos para pmTOR ficaram em maior parte contidos no escore 3 apenas por marcação citoplasmática. Os índices de negatividade nuclear para o referido anticorpo se mostraram proporcionalmente decrescentes partindo de LVP à CV e CEB apontando correlação entre marcação de núcleo e maior agravo tecidual. Soma-se a isto a seguinte constatação: amostras de LVP que apresentaram núcleos marcados para pmTOR, em sua expressiva maioria, estiveram relacionados a outros diagnósticos de neoplasia (CEB, CEBSI e CV).

Como apontado anteriormente, a marcação nuclear se fez prevalente para pAkt, diferindo do ocorrido para pmTOR, e sua dupla localização se deve ao grande número de proteínas ligáveis (na casa dos nove mil), estas oriundas de ambos os compartimentos celulares (38). No entanto, apesar da maioria das amostras apresentar imunopositividade em proporções superiores à metade de suas células (escore 3) tanto em núcleo quanto em citoplasma, para este, se mostrou maior a frequência do referido grau de marcação, tal como o esperado devido aos maiores níveis de atividade citoplasmática de Akt (38,40). Por outro lado, a menor, mas ainda frequente positividade nuclear observada foi previamente relacionada aos processos de transformação celular, sobrevivência, potencial migratório e inibição da morte celular programada (36,37).

Quando considerados os pacientes cujos casos de LVP se mostraram pAktnegativos, 3 destes detinham diagnósticos de neoplasia e 2 sem tais diagnósticos, não indicando de imediato potenciais correlações prognósticas, muito embora deva ser considerado o curso evolutivo da LVP e seu acometimento multifocal resultando em possibilidades de biópsias com estágios variados de displasia epitelial e alterações celulares (5).

Tendo em vista ainda a classificação em escores das lesões aqui estudadas, apesar do predomínio de escore 3 para pAkt em LVP, esta variável abarcou sozinha o segundo maior grau de marcação observado, o escore 2, ao passo que as neoplasias, CV e CEB, permaneceram quase que massivamente em escore 3, delineando uma ascensão no grau de marcação conforme o comprometimento epitelial, partindo de diferentes graus de displasia epitelial (diagnóstico de LVP) até as estabelecidas neoplasias (CV e CEB), podendo tal esboço indicar índices diretamente proporcionais ao avanço neoplásico por meio de seus efeitos antiapoptótico, de proliferação e crescimento celular por síntese proteica, tal e qual constatado em estudos anteriores (45,53,55).

Outro método de análise para os resultados imuno-histoquímicos de pAkt e pmTOR compreendeu sua ocorrência por segmento epitelial. As células das camadas basal e parabasal compõem os estratos germinativos do epitélio, apresentando, para tanto, maior potencial proliferativo o que diminui à medida em que estas passam pela camada espinhosa chegando às camadas altas desta e, consecutivamente, à camada córnea, encerrando-se na esfoliação (81). Logo, ao se considerar o comportamento inerente a cada estrato do referido tecido, se faz pertinente a busca por padrões de marcação por segmento epitelial. Neste ínterim, a imunopositividade para pAkt já foi observada em células das camadas basal e parabasal de displasia epitelial de boca (53) ao passo que, no presente ensaio, amostras de LVP CV e CEB apresentaram discreta predominância de imunopositividade em camada espinhosa, porém, sem consideráveis diferenças entre as lesões estudadas, pouco contribuindo com a caracterização das lesões de menor a maior comprometimento epitelial segundo o presente critério.

Ainda no contexto das porções epiteliais marcadas, no tocante ao pmTOR foi observada massiva imunopositividade em camada espinhosa para as três lesões estudadas, por vezes se estendendo tal marcação para as camadas germinativas. Tal ocorrência, por sua vez, se fez relacionar às neoplasias já estabelecidas destoando das lesões de LVP, o que nos sugere uma maior tendência à marcação de camadas basal e parabasal conforme aumenta o comprometimento do tecido afetado.

Passando a abordar análises laboratoriais indicativas de alterações no ciclo celular com propensões proliferativas, seguem dados comentados acerca dos resultados imuno-histoquímicos do marcador MCM3. Nos referidos resultados, pôde ser observada imunopositividade apenas e tão somente por marcação nuclear específica, assim como verificado em estudos pregressos (71,78). A tal fato atribuise a dinâmica pela qual se desencadeia o avanço do ciclo celular partindo da fase S para as fases subsequentes por meio da ligação formada entre o conjunto de MCMs, o complexo ORC e os fatores de replicação CDT1 e CDC-6 acoplados à cromatina, ou seja, em área intranuclear (65).

No presente ensaio, tais resultados tiveram sua análise por duas diferentes perspectivas: número de células marcadas permitindo classificação por escores (tal como efetuado para pAkt e pmTOR) e abrangência de marcação por terço epitelial. Na primeira, se pôde notar predomínio de escore 3 para as amostras de LVP, CV e CEB, conjuntamente, muito embora a LVP tenha mostrado maior índice em escore 2. Por outro lado, a variável CV achou-se integralmente inserida em escore 3 ao passo que CEB dividiu-se entre escores 3 e 1, compondo este, um resultado pouco

contributivo para o comportamento biológico em face ao perfil proliferativo comumente apresentado por estas lesões.

Em segunda análise, a variável LVP se mostrou mais inclinada a exibir positividade para MCM3 em núcleo de células oriundas das camadas baixas do epitélio, ou seja, limitando-se a terço inferior em camadas basal, parabasal e espinhosa adjacente. Da mesma maneira se pôde observar para CV, que, assim como a LVP, apresentou resultados decrescentes de terço inferior à superior, ficando a variável CEB, no entanto, dividida entre um caso de marcação restrita a terço inferior e outro com marcação disseminada por todo o tecido neoplásico. Ainda que mantida tal tendência de marcação decrescente, partindo de basal às adjacências córneas, pertinente se faz salientar que a acentuação de tal padrão apresentou maior inclinação para LVP, ficando os casos de CV e CEB com uma inclinação mais tênue, indicando, para tanto, distribuição de maior equilíbrio entre os terços epiteliais marcados. Soma-se a este entendimento, estudos prévios que apontam maior abrangência de marcação partindo de terço inferior à medida que se tem maior grau de alteração epitelial, ou seja, de mucosa hígida às displasias e CEB (72,78).

Quando resgatado o histórico diagnóstico dos pacientes de LVP que apresentaram imuno-positividade para MCM3 abarcando terços médio e superior epitelial, pouco se pôde estreitar tais achados a um indicativo de maior potencial de transformação neoplásica, visto comporem tais achados, pacientes que, em sua maioria, não apresentaram concomitantes diagnósticos de CV ou CEB. No entanto, apesar de tal afirmação se valer para uma olhar retrospectivo no quadro de lesões já apresentadas por estes pacientes, o mesmo não se pode assegurar para o comportamento biológico futuro a que estão sujeitos estes mesmos pacientes, que podem vir a encerrar lesões neoplásicas em espaços de tempo variáveis.

## 7 CONCLUSÕES

A presente obra enseja em seu escopo as seguintes conclusões: Leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) consiste em um quadro de lesões multifocais e altamente recidivantes que acometem predominantemente mucosa jugal seguida de rebordo alveolar e língua em proporções equivalentes. Tais lesões antecedem, em aproximadamente a metade dos casos, ao carcinoma espinocelular de boca (CEB). Depreende-se, ainda, que marcadores imuno-histoquímicos correlacionados à tendência anti-apoptótica a que se servem células alteradas no sentido da carcinogênse, podem contribuir no traçar prognóstico de lesões oriundas de LVP, tais como os abarcados pelo presente estudo, pmTOR e pAkt, os quais tendem a se mostrar ativos em grande número de células bem como em amplas áreas de tecidual. MCM3, relacionado abrangência Outrossim, 0 reagente а um comportamento biológico de cunho proliferativo, vem a complementar o perfil evolutivo da LVP com marcações que se estendem das camadas germinativas às camadas altas epiteliais.

## **REFERÊNCIAS**<sup>1</sup>

- 1. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. A longterm study of thirty patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1985 Sep;60(3):285–98.
- Silverman S, Gorsky M, Francisco S. Proliferative verrucous leukoplakia A follow-up study of 54 cases. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84:154–7.
- 3. Zakrzewska JM, Lopes V, Speight P HC. Denture adhesive zinc. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996 Jan;82(4):396–401.
- Bagan J V., Jiménez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, Murillo-Cortés J, Sanchis-Bielsa JM, Poveda-Roda R, et al. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: A series of 55 cases. Oral Oncol. 2011;47(8):732–5.
- 5. Klanrit P, Sperandio M, Brown AL, Shirlaw PJ, Challacombe SJ, Morgan PR, et al. DNA ploidy in proliferative verrucous leukoplakia. Oral Oncol. 2007;43(3):310–6.
- 6. Gandolfo S, Castellani R, Pentenero M. Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Potentially Malignant Disorder Involving Periodontal Sites. J Periodontol. 2009;80(2):274–81.
- 7. Gouvêa AF, Santos Silva AR, Speight PM, Hunter K, Carlos R, Vargas PA, et al. High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased Mcm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. Histopathology. 2013;62(4):551–62.
- 8. Cabay RJ, Morton TH Jr EJ. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. J Oral Pathol Med. 2007;36(5):255–61.
- 9. Bagan JV1, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J SC. Proliferative verrucous leukoplakia: High incidence of gingival squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2003;32(7):379–82.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver.

- 10. Ghazali N, Bakri MM, Zain RBM. Aggressive, multifocal oral verrucous leukoplakia: Proliferative verrucous leukoplakia or not? J Oral Pathol Med. 2003;32(7):383–92.
- 11. Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. J Oral Pathol Med. 2010;39(6):447–52.
- 12. van der Waal I, Reichart PA. Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. Oral Oncol. 2008;44(8):719–21.
- 13. Garcia-Pola MJ, Llorente-Pendás S, González-Garcia M, García-Martín JM. The development of proliferative verrucous leukoplakia in oral lichen planus. A preliminary study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2016;21(3):e328–34.
- 14. Fettig A, Pogrel MA, Jr S, Thomas E, Costa D, Regezi JA, et al. Proliferative verrucous leukoplakia of the gingiva. . Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;723–30.
- Gimenez LCO. Leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso: semelhanças e diferenças histopatológicas e na proliferação celular por Ki67. [dissertação] São Paulo. 2014;106.
- 16. Batsakis JG, Suarez P, El-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. Oral Oncol. 1999;35(4):354–9.
- Cerero-Lapiedra R, Baladé-Martínez D, Moreno-López LA, Esparza-Gómez G, Bagán J V. Proliferative verrucous leukoplakia: A proposal for diagnostic criteria. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2010;15(6):839–45.
- Bagan L, Sáez GT, Tormos MC, Labaig-Rueda C, Murillo-Cortes J, Bagan J V. Salivary and serum interleukin-6 levels in proliferative verrucous leukoplakia. Clin Oral Investig. 2016;20(4):737–43.
- 19. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. 2005;5(2):127–35.
- 20. Visvader JE. Cells of origin in cancer. Nature. 2011;469(7330):314–22.

- 21. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. Cancer Res. 2006;66(19):9339–44.
- 22. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. Nat Rev Cancer. 2005;5(11):845–56.
- 23. Broek R Vander, Mohan S, Eytan DF, Chen Z, Waes C Van. The PI3K / Akt / mTOR axis in head and neck cancer : functions , aberrations , cross-talk , and therapies. 2015;53:815–25.
- 24. Guertin D.A. SDM. Defining the Role of mTOR in Cancer. Cancer Cell. 2007;12(1):9–22.
- 25. Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(8):671–88.
- 26. Liao Y-M, Kim C, Yen Y. Mammalian target of rapamycin and head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck Oncol. 2011;3(1):3-22.
- Hassan B, Akcakanat A, Holder AM, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3-Kinase/Akt/mTOR Signaling Pathway. Surg Oncol Clin N Am. 2013;22(4):641– 64.
- Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. J Clin Pathol. 2005;58(11):1199–205.
- 29. Sagatys E, Garrett CR, Boulware D, Kelley S, Malafa M, Cheng JQ, et al. Activation of the serine/threonine protein kinase Akt during the progression of Barrett neoplasia. Hum Pathol. 2007;38(10):1526–31.
- 30. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev. 2002;16(12):1472–87.
- Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): An integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. Oncogene. 2004;23(18):3151–71.

- 32. Pontes HA1, de Aquino Xavier FC, da Silva TS, Fonseca FP, Paiva HB, Pontes FS dos SPDJ. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study.
- 33. Luo J1, Manning BD CL. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. Cancer Cell. 2003;4(October):257–62.
- 34. Freudlsperger C1, Burnett JR, Friedman JA, Kannabiran VR, Chen Z VWC. EGFR-PI3K-AKT-mTOR Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Attractive Targets for Molecular-Oriented Therapy. Expert Opin Ther Targets. 2011;15(1):63–74.
- 35. Vivanco I1 SC. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2(7):489–501.
- Ahn JY1, Liu X, Liu Z, Pereira L, Cheng D, Peng J, Wade PA, Hamburger AW YK. Nuclear Akt associates with PKC-phosphorylated Ebp1, preventing DNA fragmentation by inhibition of caspase-activated DNase. EMBO J. 2006;25(10):2083–95.
- 37. Wang R & Brattain MG. AKT can be activated in the nucleus. Cell Signal. 2006;18:1722–31.
- 38. Rosner M1, Hanneder M, Freilinger A HM. Nuclear/cytoplasmic localization of Akt activity in the cell cycle. Amin Acids. 2007;32(3):341–5.
- Grille SJ1, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tsichlis PN LL. The Protein Kinase Akt Induces Epithelial Mesenchymal Transition and Promotes Enhanced Motility and Invasiveness of Squamous Cell Carcinoma Lines 1. Cancer Res. 2003;63(9):2172–8.
- 40. Rosner M, Freilinger A, Hengstschla M. Akt regulates nuclear / cytoplasmic localization of tuberin. Oncogene. 2007;26(4):521–31.
- 41. Sarbassov DD, Ali SM, Kim D, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-bromage H, et al. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. Curr Biol. 2004;14(14):1296–302.

- 42. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. Cell. 2006;127(1):125–37.
- 43. Gan N, Zou S, Hang W, Yang D, Zhang X, Yin Y. J o u r n a l o f C a n c e r Osteopontin is Critical for Hyperactive mTOR-Induced Tumorigenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. J Cancer. 2017;8(8):1362–70.
- 44. Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ, et al. Estrogen-Related Receptor α1 Functionally Binds as a Monomer to Extended Half-Site Sequences Including Ones Contained within Estrogen-Response Elements. Mol Endocrinol. 1997;11(3):342–52.
- 45. Yap TA1, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS WP. Targeting the PI3K AKT mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. Curr Opin Pharmacol. 2008;8(4):393–412.
- 46. Robbins HL HA. The Pi3K / Akt Pathway in Tumors of endocrine Tissues. Front Endocrinol. 2016;6(January):188.
- 47. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. Review TOR Signaling in Growth and Metabolism. Cell. 2006;124(3):471–84.
- 48. Andjelković M1, Alessi DR, Meier R, Fernandez A, Lamb NJ, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq JM HB. Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B \*. J Biol Chem. 1997;272(50):31515–24.
- 49. Borgatti P, Martelli AM, Tabellini G, Bellacosa A, Capitani S, Neri LM, et al. Threonine 308 Phosphorylated Form of Akt Translocates to the Nucleus of PC12 Cells Under Nerve Growth Factor Stimulation and Associates With the Nuclear Matrix Protein Nucleolin. J Cell Physiol. 2003;88(July 2002):79–88.
- 50. Borgatti P1, Martelli AM, Bellacosa A, Casto R, Massari L, Capitani S NL. Translocation of Akt/PKB to the nucleus of osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. FEBS Lett. 2000;477(1-2):27–32.
- 51. Squatrito M, Mancino M, Donzelli M, Areces LB, Draetta GF. EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. Oncogene. 2004;23(25):4454–65.

- 52. Yoo J, Wang XW, Rishi AK, Lessor T, Xia X, Gustafson TA, et al. Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin. Br J Cancer. 2000;82:683–90.
- 53. Martins F, de Sousa SCOM, dos Santos E, Woo S Bin, Gallottini M. PI3K– AKT–mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. J Oral Pathol Med. 2016;45(10):746–52.
- 54. Matsuo FS, Andrade MF, Loyola AM, José S. Pathologic significance of AKT, mTOR, and GSK3 β proteins in oral squamous cell carcinoma-affected patients. Virchows Arch. 2018;472(6):983-997.
- 55. Chaisuparat R1, Limpiwatana S2, Kongpanitkul S2, Yodsanga S1 JB. The Akt / mTOR pathway is activated in verrucous carcinoma of the oral cavity. J Oral Pathol Med. 2016;45(8):581–5.
- 56. Wang Z, Valera JC, Zhao X, Chen Q, Gutkind JS. mTOR co-targeting strategies for head and neck cancer therapy. 2017;491–502.
- 57. Yu C, Huang H, Hung S, Liao H, Lee C. AZD2014 Radiosensitizes Oral Squamous Cell Carcinoma by Inhibiting AKT / mTOR Axis and Inducing G1 / G2 / M Cell Cycle Arrest. PLoS One. 2016;11(3):1–15.
- 58. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody. J Immunol. 1984;133:1710–5.
- 59. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. J Cell Biol. 1993;123(3):513–22.
- Verheijen R, Kuijpers HJH, Schlingemann RO, Boehmer ALM, Driel R Van, Brakenhoff GJ, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferationrelated antigen I. Intracellular localization during interphase. J Cell Sci. 1989;92(Pt 1):123–30.
- Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferationrelated antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. J Cell Sci. 1989;92 (Pt 4):531–40.

- 62. Isola J, Helin H KO. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferationassociated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. Histochem J. 1990;22(9):498–506.
- 63. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. Cell Prolif. 1992;25(1):31–40.
- 64. Tye B. MCM Proteins in DNA Replication. Annu Rev Biochem. 1999;68:649– 86.
- 65. Gonzalez MA1, Tachibana KE, Laskey RA CN. Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. Nat Rev Cancer. 2005;5(February):135–41.
- 66. Terada T. Verrucous Carcinoma of the Oral Cavity: A Histopathologic Study of 10 Japanese Cases. J Maxillofac Oral Surg. 2011;10(2):148–51.
- Kamath V V, Varma RR, Gadewar DR, Muralidhar M. Oral verrucous carcinoma. An analysis of 37 cases. J Craniomaxillofac Surg [Internet]. 1989;17(7):309–14.
- Drachenberg CB, Blanchaert R, Ioffe OB, Ord RA PJ. Comparative study of invasive squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma of the oral cavity: expression of bcl-2, p53, and Her-2/neu, and indexes of cell turnover. Cancer Detect Prev. 1997;21(6):483–9.
- Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, et al. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. J Oral Pathol Med [Internet]. 2003;32(8):468–74.
- Dimitrova DS, Prokhorova TA, Blow JJ, Todorov IT GD. Mammalian nuclei become licensed for DNA replication during late telophase. J Cell Sci. 2002;115(Pt 1):51–9.
- 71. Valverde LDF, Freitas RD De, Pereira TDA, Resende MF De, Agra IMG, Santos N, et al. MCM3: A Novel Proliferation Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2018;26(2):120–5.

- 72. Rezvani G, Andisheh-tadbir A, Javad M, Amanpour S, Kamali F, Fardisi S. Evaluation of Minichromosome Maintenance-3 (MCM3) in Oral Squamous Cell Carcinoma. J Dent Shiraz Univ Med Sci. 2015;16(2):87–92.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, Chan WC, Connors JM, Campo E, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. Cancer Cell. 2003;3(2):185–97.
- 74. Yu K, Lee CH, Tan PH, Hong GS, Wee SB, Wong CY, et al. A Molecular Signature of the Nottingham Prognostic Index in Breast Cancer A Molecular Signature of the Nottingham Prognostic Index in Breast Cancer. 2004;2962–8.
- 75. Neben K, Korshunov A, Benner A, Wrobel G, Hahn M, Kokocinski F, et al. Microarray-Based Screening for Molecular Markers in Medulloblastoma Revealed STK15 as Independent Predictor for Survival Microarray-Based Screening for Molecular Markers in Medulloblastoma Revealed STK15 as Independent Predictor for Survival. Cancer Res. 2004;64(9):3103–11.
- 76. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002;415(6871):530–6.
- 77. Sotiriou C, Neo S-Y-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(18):10393–8.
- Lameira AG1, Pontes FS, Guimarães DM, Alves AC, de Jesus AS, Pontes HA PDSJ. MCM3 could be a better marker than Ki-67 for evaluation of dysplastic oral lesions: an immunohistochemical study. J Oral Pathol Med. 2014;43(6):427–34.
- 79. Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses 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):4964–74.
- 80. Amornphimoltham P, Patel V, Sodhi A, Nikitakis NG, Sauk JJ, Sausville EA, et al. Mammalian Target of Rapamycin , a Molecular Target in Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. Cancer Res. 2005;1(21):9953–62.

106
81. Katchburian E A V. Histologia e embriologia oral. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2012.

# ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



# PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leucoplasia verrucosa proliferativa, análise de biomarcadores presentes na progressão da lesão.

Pesquisador: Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa Área Temática: Versão: 1 CAAE: 60647416.1.0000.0075 Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

#### Número do Parecer: 1.774.957

### Apresentação do Projeto:

Serão analisadas 151 amostras teciduais em blocos de parafina provenientes de 31 pacientes diagnosticados com leucoplasia verrucosa proliferativa em pelo menos uma das biópsias registradas no Serviço de Patologia Cirúrgica, integrado à disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP. Serão ainda levantados dados desses pacientes como: sexo, idade, cor, tabagismo, sintomatologia, sítio anatômico, diagnóstico e data da biópsia. A partir dessas amostras será feita análise morfológica em cortes histológicos, bem como análise imunohistoquímica utilizando os marcadores: pAKT, pmTOR, p53 mutada e MCM-3.

## Objetivo da Pesquisa:

Traçar o perfil evolutivo da leucoplasia verrucosa proliferativa considerando seus diferentes graus de comprometimento tecidual diferenciando cronologicamente as lesões de cada paciente por meio da análise morfológica e imuno-histoquímica para os biomarcadores pAKT, pmTOR,p53 mutada e MCM3, bem como caracterizar biologicamente carcinomas provenientes da leucoplasia verrucosa proliferativa.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores trabalharão com material biológico armazenado em acervo de diagnóstico

Endereç	o: Av Prof Lineu Preste	s 2227		
Bairro:	Cidade Universitária	CEP:	05.508-900	
UF: SP	Municipio:	SAO PAULO		
Telefone	: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail:	cepfo@usp.br



# FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.774.957

anatomopatológico, não havendo riscos diretos por parte do paciente. Os benefícios indiretos referentes ao conhecimento que será produzido pelo estudo justificam a utilização do material.

### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo prevê a utilização de cortes histológicos provenientes Serviço de Patologia Cirúrgica, integrado à disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP. Não houve a necessidade de TCLE por tratar-se de dados secundários coletados não por ocasião da pesquisa. No entanto, e a utilização desse material deve ser feita de forma a manter o sigilo da identidade dos sujeitos e esclarecido o que será feito após a utilização, pelos pesquisadores, do material arquivado. O cronograma apresentado é condizente com a proposta do estudo e seu início está previsto para dezembro de 2016.

## Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora responsável é responsável pelo serviço, cujos arquivos de cortes histológicos da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia da USP serão utilizados, subentendendo-se portanto, sua anuência com a realização do estudo.

### Recomendações:

Segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011, contudo não cabe ao Sistema CEP/CONEP legislar sobre o acesso e USO DO PRONTUÁRIO médico (entenda-se odontológico também), porém cabe determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 196/96, itens III.1."a" e IV.1."g". O CEP-FOUSP solicita Carta de autorização pelo uso de prontuários do responsável pela Instituição, ressaltando o cumprimento destas normativas.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo apresentado está adequado aos preceitos éticos para sua realização.

Considerações Finais a critério do CEP:

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



# FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.774.957

# Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	01/10/2016		Aceito
do Projeto	ROJETO_783732.pdf	14:11:48		
Projeto Detalhado /	Projeto.pdf	01/10/2016	Lara Gimenez	Aceito
Brochura		14:11:02		
Investigador				
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	01/10/2016	Lara Gimenez	Aceito
		14:08:02		

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 14 de Outubro de 2016

Assinado por: Maria Gabriela Haye Biazevic (Coordenador)

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