



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL

PATRÍCIA DAVIN GOMES PARENTE

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSION DO REG-GAMMA E DA BETA CATENINA EM
QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO
INFERIOR**

NATAL - RN

2019

PATRÍCIA DAVIN GOMES PARENTE

ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DO REG-GAMMA E DA BETA CATENINA EM
QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO
INFERIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Patología Oral da Universidade
Federal do Rio Grande do Norte como parte dos
requisitos para obtenção do Título de Mestre em
Patologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

NATAL - RN

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Alberto Moreira Campos
Departamento de Odontologia

Parente, Patrícia Davin Gomes.

Estudo da imunoexpressão do reg-gamma e da beta catenina em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior / Patrícia Davin Gomes Parente. - Natal, 2019.
96 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Leão Pereira Pinto.

Dissertação (Mestrado em Patologia Oral) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Pós-Graduação em Patologia Oral, Natal, 2019.

1. Carcinoma de células escamosas – Dissertação. 2. Queilite - Dissertação. 3. Beta Catenina - Dissertação. 4. Imuno-histoquímica - Dissertação. I. Pinto, Leão Pereira. II. Título.
RN/UF/BSO

BLACK D65

Dedicatória

Á Deus, por ter me guiado neste caminho e me dado forças, luz e sabedoria durante toda a minha trajetória até aqui.

*Ao meu filho, **Gabriel**, minha fonte inesgotável de amor, que me mostrou o sentido da vida e me deu mais força e coragem para ir além. Tudo que faço em minha vida hoje, é por você!*

*Aos meus pais, **Iara e João Massilon**, minha irmã **Renata** e ao meu marido **Alan**. Vocês são os meus maiores incentivadores. Meus exemplos de pessoas guerreiras e inspiradoras, meu alicerce e minha fortaleza. A vocês dedico todas as minhas conquistas, pois sem vocês ao meu lado, jamais chegaria até aqui.*

Agradecimientos

Ao meu querido orientador, **Dr. Leão Pereira Pinto**, por ter me dado a oportunidade de entrar no mundo da pesquisa científica, desde a minha graduação. Obrigada por sempre confiar e acreditar no meu potencial, obrigada por todos os valiosos ensinamentos que levarei para a vida. O senhor é uma inspiração e exemplo para mim. Levarei o senhor sempre em meu coração.

À querida professora **Dra. Lélia Batista**, por todos os “puxões de orelha” que me colocaram sempre para frente, por ter me apoiado e me ajudado quando mais precisei agilizar a minha pesquisa. Obrigada por tudo professora, essa pesquisa não teria sido realizada sem a sua contribuição.

Aos queridos amigos, **Rodrigo Mafra e Larissa Rolim**, por toda a paciência e por todos os ensinamentos passados. Vocês me orientaram desde a iniciação científica, que sorte a minha! Muito obrigada por toda ajuda que me deram em tantos momentos. Tenho orgulho de ter “irmãos” como vocês e não tenho dúvida do sucesso que farão.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse sonho: Dra. Roseana de Almeida Freitas, Dr. Pedro Paulo Andrade dos Santos, Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz, Dra. Hébel Cavalcanti Galvão, Dr. Antônio de Lisboa Costa Lopes, Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel, Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira, Dra. Ana Miryam Costa de Medeiros, Dra. Patrícia Teixeira de Oliveira, Dr. Bruno César de Vasconcelos Gurgel, Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza e Dr. Kênio Costa Lima

Aos meus queridos colegas de turma (Rani, Afonso, Rodrigo, Nelmara e Camila), pela presença nesses dois anos, compartilhando desafios, renúncias, aprendizados, dificuldades e alegrias. Queridos amigos, que a distância não apague as ótimas lembranças que vivemos. Levarei-os comigo em meu coração.

À minha querida amiga e eterna dupla, **Fernanda Advíncola**, que compartilhou comigo os meus primeiros passos na patologia, me incentivou a fazer a prova do mestrado e sempre acreditou em mim. Amiga, se não fosse você, hoje eu não estaria aqui. Muito obrigada por tudo, por ser um “anjo guia” que Deus colocou em minha vida.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma participaram dessa conquista, o meu muito obrigada!

Resumo

RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente maligna que ocorre principalmente em homens leucodermas com histórico de exposição crônica ao sol. Atualmente, não é possível prever quais os casos de QA progredirão para o Carcinoma de células escamosas (CCE), portanto alguns marcadores biomoleculares têm sido alvo de pesquisas. A β -catenina é uma proteína multifuncional que está envolvida nos processos de adesão célula-célula. A alteração do complexo caderina-catenina tem sido demonstrada no CCE e correlacionada com a invasão tumoral, metástase e com pior prognóstico dos pacientes. O REG γ é um ativador de proteassoma que pode promover a degradação de múltiplas proteínas incluindo p53 e MDM2. Estudos mostram que o REG γ está superexpresso em numerosos tipos de câncer, sugerindo que a superexpressão do REG γ está envolvida na progressão do câncer. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão imuno- histoquímica da β -catenina e do REG γ em casos de QA e Carcinoma de células escamosas de lábio inferior (CCELI), comparando os achados imuno- histoquímicos com os dados clinicopatológicos, afim de averiguar se há uma correlação com a progressão tumoral e se as mesmas atuam de forma sinérgica nesse processo. A imunoexpressão de β -catenina e REG γ foi analisada semi-quantitativamente em 30 casos de QA e 30 casos de CCELI de acordo com os escores: 0 (sem marcação); 1 (1-25% de células positivas); 2 (26-50% de células positivas); 3 (51-75% de células positivas); 4 (> 75% células positivas). Para a análise estatística, foram realizados os testes de Mann-Whitney e de Spearman ($p < 0,05$). Tanto as QAs quanto os CCELI expressaram a proteína β -catenina, sendo evidenciado um aumento da expressão citoplasmática e nuclear nos casos de Displasias moderadas e severas. Nos CCELI a imunoexpressão de β -catenina membranar foi maior nos casos de baixo grau de malignidade. Tanto as QAs quanto os CCELI expressaram a proteína REG- γ porém não verificamos significância estatística entre a sua expressão e o grau displasia epitelial, bem como, entre a imunoexpressão do REG- γ e os parâmetros clinicopatológicos analisados nos CCELI. Os resultados do presente estudo sugerem que a superexpressão de REG- γ e a redução na expressão membranar de β -catenina podem ser eventos importantes na carcinogênese labial. No entanto, acreditamos que esta proteína esteja envolvida no processo da carcinogênese oral. Nesse processo, correlacionando a expressão imuno-histoquímica da β -catenina com a expressão do REG- γ , não resultados estatisticamente significativos, sugerimos então que a expressão de β -catenina pode não ser influenciada diretamente pelos níveis de expressão de REG γ .

PALAVRAS-CHAVE: Carcinogênese; Carcinoma epidermoide de lábio inferior; Queilite actínica; Imuno-histoquímica; Imunoexpressão; β -catenina ; REG γ .

Abstract

ABSTRACT

Actinic cheilitis (QA) is a potentially malignant lesion that occurs mainly in men with light skin and a history of chronic sun exposure. Currently, it is not possible to predict which cases of QA will progress to Squamous Cell Carcinoma (SCC), so some biomolecular markers have been researched. B-catenin is a multifunctional protein that is involved in cell-cell adhesion processes. The alteration of the cadherin-catenin complex has been demonstrated in SCC and correlated with tumor invasion, metastasis and worse prognosis of patients. REG γ is a proteasome activator that can promote the degradation of multiple proteins including p53 and MDM2. Studies show that REG γ is overexpressed in numerous cancers, suggesting that REG γ overexpression is involved in cancer progression. The aim of this study was to analyze the immunohistochemical expression of β -catenin and REG γ in cases of QA and lower lip squamous cell carcinoma (CCELI), comparing the immunohistochemical findings with the clinical and pathological data, in order to verify if there is any a correlation with tumor progression and whether they act synergistically in this process. B-catenin and REG γ immunoexpression was analyzed semi-quantitatively in 30 cases of QA and 30 cases of CCELI according to the scores: 0 (no labeling); 1 (1-25% positive cells); 2 (26-50% positive cells); 3 (51-75% positive cells); 4 (> 75% positive cells). For statistical analysis, Mann-Whitney and Spearman tests were performed ($p < 0.05$). Both QAs and CCELIs expressed the β -catenin protein, showing an increase in cytoplasmic and nuclear expression in cases of moderate and severe dysplasias. In CCELIs, membrane β -catenin immunoexpression was higher in cases of low grade malignancy. Both QAs and CCELIs expressed the REG- γ protein but no statistical significance between its expression and the degree of epithelial dysplasia was found, as well as between the immunoexpression of REG- γ and the clinicopathological parameters analyzed in the CCELIs. The results of the present study suggest that REG- γ overexpression and reduction in membrane expression of β -catenin may be important events in lip carcinogenesis. However, we believe that this protein is involved in the process of oral carcinogenesis. In this process, correlating the immunohistochemical expression of β -catenin with the expression of REG- γ , as we did not obtain statistically significant results, we suggest that β -catenin expression may not be directly influenced by the levels of REG γ expression.

KEYWORDS: Carcinogenesis; Lower lip squamous cell carcinoma; Actinic cheilitis; Immunohistochemistry; Immunoexpression; β -catenin; REG γ .

Listas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Aspectos microscópicos evidenciando perda de estratificação, projeções em gota, inversão de polaridade, nucléolos evidentes e hipercromatismo em caso de QA de alto risco de transformação maligna (Pannoramic Viewer, H/E)..... 34
- Figura 2** - Fotomicrografia evidenciando áreas de atrofia e hiperplasia do epitélio, infiltrado inflamatório subepitelial e elastose solar (seta) em caso de QA com baixo risco de transformação maligna (Pannoramic Viewer, H/E)..... 35
- Figura 3**- Fotomicrografia de CELI evidenciando o padrão de invasão tumoral em ilhas e o infiltrado inflamatório difuso e intenso no estroma tumoral (Pannoramic Viewer, H/E) 36
- Figura 4**- Fotomicrografia evidenciando as características histopatológicas de CCELI. Proliferação de células epiteliais malignas, formando cordões e ninhos que invadem o tecido conjuntivo ((Pannoramic Viewer, H/E; 2x)..... 36
- Figura 5**- Aspecto morfológico de CELI evidenciando o pleomorfismo celular. (Pannoramic Viewer, H/E)..... 37
- Figura 6**- Aspecto morfológico de CELI evidenciando células apresentando hipercromatismo nuclear, alteração da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular e nuclear, figuras de mitose. (Pannoramic Viewer, H/E)..... 37
- Figura 7**- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em QA (Pannoramic Viewer).Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN..... 46
- Figura 8**- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em QA (Pannoramic Viewer) 46
- Figura 9**- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em CCELI (Pannoramic Viewer) 47
- Figura 10**- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em CCELI, com predomínio de expressão membranar. (Pannoramic Viewer)..... 47
- Figura 11**- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em CCELI, com predomínio de expressão citoplasmática (Pannoramic Viewer) 48
- Figura 12**- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em QA (Pannoramic Viewer) 48

Figura 13- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em QA (Pannoramic Viewer)	49
Figura 14- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em QA (Pannoramic Viewer)	49
Figura 15- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ em CCELI (Pannoramic Viewer)	50
Figura 16- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ em CCELI (Pannoramic Viewer)	50
Figura 17- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em CCELI (Pannoramic Viewer)	51
Figura 18- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em CCELI (Pannoramic Viewer)	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Sistema TNM para o CE, preconizado pela American Cancer Society (2016).....	23
Quadro 2- Quadro 02 - Sistema de estadiamento clínico (TNM) para o CE, preconizado pela American Cancer Society (2016).....	24
Quadro 3- Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS para o diagnóstico de displasia oral.....	25
Quadro 4- Critérios para diagnóstico de displasia epitelial e classificação dos graus de displasias	25
Quadro 5- Sistema de gradação histológica de malignidade no “front de invasão” proposto por BRYNE (1998).....	26
Quadro 6- Especificidade, clone, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos casos de queilite actínica de acordo com parâmetros clinicopatológicos. Natal, RN – 2019.....	31
Tabela 2. Distribuição dos casos de carcinoma epidermoide de lábio inferior de acordo com parâmetros clinicopatológicos. Natal, RN – 2019.	32
Tabela 3. Distribuição dos casos de queilite actínica de acordo com os escores de imunexpressão do Reg- γ e da β -catenina. Natal, RN – 2019.....	38
Tabela 4. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática e nuclear do Reg- γ e suas diferenças em relação ao grau de displasia epitelial das queilites actínicas. Natal, RN – 2019.	38
Tabela 5. Análise dos escores de imunexpressão membranar, citoplasmática e nuclear da β -catenina e suas diferenças em relação ao grau de displasia epitelial das queilites actínicas. Natal, RN – 2019.	39
Tabela 6. Distribuição dos casos de carcinoma epidermoide de lábio inferior de acordo com os escores de imunexpressão do Reg- γ e da β -catenina. Natal, RN – 2019.....	40
Tabela 7. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática do Reg- γ e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos carcinomas de células escamosas de lábio inferior. Natal, RN – 2019.....	40
Tabela 8. Análise dos escores de imunexpressão nuclear do Reg- γ e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos carcinomas de células escamosas de lábio inferior. Natal, RN – 2019.....	41
Tabela 9. Análise dos escores de imunexpressão membranar da β -catenina e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos carcinomas de células escamosas de lábio inferior. Natal, RN – 2019.....	41
Tabela 10. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática da β -catenina e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos carcinomas de células escamosas de lábio inferior. Natal, RN – 2019.....	42
Tabela 11. Análise dos escores de imunexpressão nuclear da β -catenina e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos carcinomas de células escamosas de lábio inferior. Natal, RN – 2019.....	43

Tabela 12. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática e nuclear do Reg- γ e suas diferenças em relação ao tipo de lesão. Natal, RN – 2019.....	44
Tabela 13. Análise dos escores de imunexpressão membranar, citoplasmática e nuclear da β -catenina e suas diferenças em relação ao tipo de lesão. Natal, RN – 2019.....	44
Tabela 14. Correlações entre os escores de imunexpressão do Reg- γ e da β -catenina em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior. Natal, RN – 2019....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

QA	Queilite Actínica
CCE	Carcinoma de células escamosas
P53	Refere-se à proteína supressora tumoral p53.
MDM2	Do Inglês “murine double minute 2”
P21	Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular
CyclinD1	proteína codificada pelo gene <i>CCND1</i>
C-Myc	genes reguladores e proto-oncogenes que codificam fatores de transcrição
WNT	Via de sinalização celular
UV	Ultravioleta.
CCELI	Carcinoma de células escamosas de lábio inferior
CD44	Do inglês, cluster of differentiation 44, traduzido como grupamento de diferenciação 44.
B-cat	β -catenina
E-cad	E-caderina
TCF	Do inglês, T cell factor.
LEF	Do inglês, Lymphoid enhancing factor.
TNM	Do inglês, tumor-node-metastasis, refere-se ao sistema de estadiamento clínico, que avalia: tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e envolvimento por metástases à distância (M).
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
OMS	Organização Mundial de Saúde
SPSS	Refere-se ao programa Statistical Package for the Social Sciences
TRIS-HCI	Tris-hidroximetil-aminometano
BSA	Do inglês, bovin serum albumin, traduzido como albumina de soro bovino.

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem.
β	Do alfabeto grego, beta.
γ	Do alfabeto grego, gamma.
μm	Micrômetro.
Kda	Quilodálon.
pH	Potencial hidrogeniônico.
°GL	Graus Gay-Lussac.
®	Marca registrada.



Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 QUEILITE ACTÍNICA.....	11
2.2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR	13
2.2.1 Reg-gamma	14
2.2.2 Beta-catenina	16
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	21
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	21
4.3 POPULAÇÃO	21
4.4 AMOSTRA.....	21
4.4.1 Critérios de inclusão	21
4.4.2 Critérios de exclusão	22
4.5 ESTUDO CLÍNICO	22
4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA	24
4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	27
4.6.1 Método imuno-histoquímico	27
4.6.2 Análise do perfil imuno-histoquímico	29
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5 RESULTADOS	31
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	31
5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS	33
5.2.1 Queilite Actínica	33
5.2.2 Carcinoma de células escamosas de lábio inferior	35
5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	38
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE A	70

APÊNDICE B	71
APÊNDICE C	72
APÊNDICE D	73
APÊNDICE E	74
ANEXO	78



Introdução

1 INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente maligna que ocorre principalmente em homens leucodermas com histórico de exposição crônica ao sol, sendo mais comum a partir da quinta década de vida (MARTINS-FILHO; SILVA; PIVA, 2011; VIEIRA et al., 2012). Estima-se que 95% dos casos de carcinoma de células escamosas (CCE) de lábio inferior se desenvolvem a partir de quadros pré-existentes de QA. Sendo assim, a compreensão do processo de transformação maligna da QA em CCE de lábio inferior é importante, já que pode contribuir para avanços no diagnóstico e tratamento destas lesões (PIRES et al., 2013).

O CCE é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio pavimentoso estratificado e pode afetar tanto a cavidade oral quanto o vermelhão do lábio. O prognóstico dos pacientes com CCE de lábio inferior é favorável quando a doença é diagnosticada em estágios iniciais (SANTOS et al., 2014). Contudo, a presença de metástase linfonodal compromete de forma significativa o desfecho da doença, e apenas 25% a 50% dos pacientes com esta condição atingem a sobrevida de cinco anos (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2012).

O conhecimento sobre o comportamento biológico dessas lesões e a sua detecção precoce são fatores importantes na redução da morbi-mortalidade do câncer de boca. Diversas pesquisas têm se voltado para o estudo da carcinogênese, inclusive na tentativa de estabelecer uma técnica laboratorial capaz de indicar quais desordens potencialmente malignas, como as QAs, possuiriam real capacidade de transformação neoplásica, sendo a perda de adesividade celular uma das características avaliadas (FREITAS et al. 2010; ZARGARAN et al. 2018)

O REG γ (também conhecido como antígeno PA28 γ , PSME3 e Ki) é um membro da família de ativadores de proteassoma que pode promover a degradação de múltiplas proteínas incluindo p53 e MDM2. Estudos anteriores destacaram um possível papel do REG γ na tumorigênese ao constatar um aumento na expressão em cânceres de mama, tireóide, pulmão e fígado, atuando na degradação de proteínas celulares intactas, como o cofator do receptor nuclear (SRC-3) e o inibidor de quinase dependente de ciclina (p21), sugerindo que a expressão aberrante do REG γ está envolvida na progressão do câncer (ALI et al. 2013; LI et al. 2015).

Além disso, o REG γ atua como um oncogene na tumorigênese da pele, sendo verificada em um modelo de carcinogênese cutânea uma superexpressão do REG γ , ativando por sua vez, a via de sinalização Wnt /beta-catenina, levando a um aumento na expressão de ciclina D1 e c-Myc, estimulando assim a progressão tumoral. Por outro lado, a deleção de REG γ , bloqueia a sinalização das vias Wnt / β -catenina, atenuando a formação tumoral. Desta forma, o REG γ

atua como uma molécula crítica que liga a via Wnt / β -catenina durante o desenvolvimento da carcinogênese da pele (LI et al. 2015).

A adesão célula-célula e célula-matriz extracelular regulam importantes funções celulares tais como: crescimento, diferenciação, migração, proliferação e morte celular. A β -catenina é uma proteína de adesão que está envolvida em pelo menos dois processos: adesão célula-célula e comunicação celular, principalmente àquela relacionada com as proteínas Wnt. A alteração do complexo caderina-catenina tem sido demonstrada em diversos cânceres, incluindo o CCE, e correlacionada com a invasão, metástase e, conseqüentemente, com o pior prognóstico dos pacientes (FREITAS et al. 2010).

Diante do exposto, o presente estudo pretendeu analisar a expressão imuno-histoquímica da molécula de adesão β -catenina e do ativador de proteossoma REG γ em casos de QAs e CCELI, comparando os achados imuno-histoquímicos com os dados clínicopatológicos afim de averiguar se há uma correlação entre a imunoexpressão dessas moléculas com a progressão tumoral e se as mesmas atuam de forma sinérgica nesse processo.

Referencial Teórico

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 QUEILITE ACTÍNICA

A exposição constante ao sol pode causar, muitas vezes, danos irreparáveis, principalmente se ocorrer de forma constante nos horários de maior incidência da radiação ultravioleta (UV) sem a devida proteção (VIEIRA et al., 2012; CINTRA et al., 2013; LOPES et al., 2015). A Queilite Actínica (QA) é uma reação inflamatória crônica, potencialmente maligna, ocasionada pela exposição prolongada à radiação ultravioleta que pode conduzir a alterações genótípicas e fenótípicas nas células epiteliais, as quais são denominadas de displasia epitelial (PILATI et al., 2017).

Do ponto de vista epidemiológico, a QA afeta o lábio inferior em mais de 90% dos casos, e é mais frequente a partir da quinta década de vida, uma vez que os danos causados pela radiação solar se acumulam ao longo dos anos. Acomete preferencialmente indivíduos leucodermas do sexo masculino, especialmente aqueles que têm histórico de exposição solar crônica, tais como pescadores e agricultores (ROSSOE et al., 2011; VIEIRA et al., 2012; LOPES et al., 2015).

Em relação às características clínicas, as QAs podem se apresentar de forma localizada ou difusa. De forma geral, são assintomáticas e se manifestam como áreas de ressecamento, atrofia e/ou apagamento do limite entre a zona do vermelhão e a porção cutânea do lábio. Em estágios avançados, observam-se áreas leucoplásicas e/ou eritroplásicas, por vezes acompanhadas de ulcerações crônicas (VIEIRA et al., 2012; LOPES et al., 2015). Podem ainda apresentar-se sob a forma aguda ou crônica, sendo a forma crônica mais comum em indivíduos jovens expostos ao sol com frequência.

Clinicamente caracteriza-se pela atrofia da borda do vermelhão do lábio, perda de elasticidade, áreas ceratóticas, ásperas e escamosas de espessura variada, áreas eritematosas, úlceras e fissuras (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; SOUZA LUCENA et al., 2012; SANTANA SARMENTO et al., 2014). A forma aguda é caracterizada por exibir edema, rubor, bolhas e ulcerações no lábio. Essas lesões regridem quando o agente etiológico é removido (SAVAGE, MCKAY, FAULKNER, 2010; SOUZA LUCENA et al., 2012; SANTANA SARMENTO et al., 2014). Alguns sinais clínicos sugestivos de malignidade são: áreas endurecidas, ulcerações e eritemas persistentes. A presença de qualquer uma destas alterações indica a necessidade de biópsia (ROSSOE et al., 2011).

Histopatologicamente, a lesão exhibe epitélio pavimentoso estratificado, geralmente

atrófico com espessamento da camada córnea, podendo apresentar displasia que varia de leve à severa. Frequentemente evidencia-se, no tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório crônico de intensidade variada, assim como degeneração basofílica das fibras colágenas e elásticas induzida pela luz UV, denominada elastose solar ou actínica (ROJAS et al., 2012; LOPES et al., 2015).

A transformação maligna varia bastante em lesões que apresentam displasias, com um índice em torno de 6 a 36%. A gradação histológica das displasias ainda é uma ferramenta importante como preditivo de transformação maligna oferecendo bases para nortear a conduta clínica (SMITH et al., 2009). Os critérios utilizados para categorização das displasias levam em consideração as alterações arquiteturais (estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células da camada basal, projeções em gota, aumento do número e localização anormal de mitoses, disceratose, pérolas de ceratina e perda de coesão das células epiteliais) e citológicas (anisonucleose, anisocitose, pleomorfismo nuclear e celular, aumento da relação núcleo-citoplasma, mitoses atípicas, nucléolos evidentes e hiperchromatismo) (CÂMARA et al., 2016; EL-NAGGAR et al., 2017).

De acordo com a classificação proposta pela OMS, as lesões podem ser caracterizadas como hiperkeratose, displasia epitelial leve, moderada ou severa. A hiperkeratose se caracteriza apenas pelo espessamento da camada de ceratina superficial, com ou sem acantose. A displasia epitelial leve revela alterações a nível de camada basal e parabasal. A displasia epitelial moderada denota envolvimento da camada basal à porção média da camada espinhosa. A displasia epitelial severa representa alterações desde a camada basal até um nível acima da porção média do epitélio ou pode se estender por toda a espessura epitelial, sem indícios de invasão no tecido conjuntivo subjacente (EL-NAGGAR et al., 2017).

O Carcinoma de células escamosas de lábio inferior (CCELI) quase sempre se desenvolve a partir de lesões pré-existentes da QA. Dessa forma, a QA deve ser tratada devido ao risco de desenvolvimento de transformação maligna e o consequente potencial para provocar metástase. As alternativas terapêuticas da QA são: aplicação de 5-fluorouracil, descamação com ácido tricloroacético a 50%, eletrocirurgia, terapia fotodinâmica, laser de CO₂, vermelhectomia, criocirurgia e dermoabrasão (ROSSOE et al., 2011; VIEIRA et al., 2012; NEVILLE et al., 2016).

O prognóstico em QA é variado, baseando-se no diagnóstico histopatológico, na mudança de hábitos do paciente e nos cuidados tomados por ele, para evitar os danos causados pela radiação solar, seguindo as orientações do cirurgião dentista para que se previna a transformação maligna da lesão (SANTANA SARMENTO et al., 2014)

2.2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR

O câncer de boca, também intitulado câncer oral, encontra-se entre o sexto e oitavo tipo de câncer mais comum em todo o mundo, apresentando uma grande variabilidade de incidência entre os diversos países (SCULLY; BAGAN, 2009). O CCE é a neoplasia maligna oral mais comum, representando mais de 90% de todos os cânceres orais (KHAMMISSA et al., 2014). Desenvolve-se a partir do epitélio pavimentoso estratificado e pode afetar tanto a cavidade oral quanto o vermelhão do lábio, representando o tumor maligno mais comum na região dos lábios (BATISTA et al., 2010).

O CCELI corresponde a 25% - 30% de todos os cânceres de boca diagnosticados. É vinte vezes mais prevalente no lábio inferior em relação ao lábio superior (VIEIRA et al., 2012). A predileção do CCELI ocorre em consequência desta região anatômica ser exposta mais intensamente e diretamente à radiação solar (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2012; VIEIRA et al., 2012). Acomete com maior frequência homens idosos de pele clara, entre a sexta e sétimas décadas de vida (BIASOLI et al., 2016).

Acredita-se que a etiopatogênese do CCELI esteja relacionada a efeitos de diversos fatores extrínsecos e intrínsecos, que atuam em conjunto. Entre os fatores extrínsecos, destacam-se a radiação UV e o tabagismo, enquanto que os fatores intrínsecos incluem desequilíbrio alélico relacionado a genes supressores de tumor, oncogenes e enzimas que metabolizam carcinógenos, bem como hábitos alimentares e deficiência imunológica (AMTHA et al., 2009; VIEIRA et al., 2012; RAM et al., 2017).

O CCELI é considerado uma neoplasia de baixa agressividade e prognóstico favorável devido à sua tendência a progredir lentamente. É inicialmente uma lesão assintomática, por vezes, difícil distinguir das QAs. Manifestam-se clinicamente como lesões leucoplásicas ou eritroplásicas, placas atróficas mostrando fissuras persistentes com escamas ou crostas. Em estágios avançados, pode haver dor associada à úlcera exsudativa, com bordas endurecidas e base infiltrada que não cicatriza. Além disso, pode apresentar-se com aspecto verrucoso ou de uma massa exofítica friável (VIEIRA et al., 2012).

Histopatologicamente, o CCE caracteriza-se como uma proliferação de células epiteliais malignas, dispostas isoladamente ou em grupos celulares, podendo formar cordões e ninhos que invadem o tecido conjuntivo. As células neoplásicas exibem hiperchromatismo, pleomorfismo nuclear e celular e aumento do número de figuras de mitose, típicas ou atípicas. Em alguns

casos, pode-se encontrar disceratose, pérolas córneas, invasão muscular, linfática e perineural (NEVILLE et al., 2016).

O prognóstico do CCELI é excelente, desde que o diagnóstico precoce seja estabelecido, com uma sobrevida média de 5 anos em 90% dos casos. No entanto, estima-se que 5-20% dos casos desenvolvam metástases linfonodais durante o acompanhamento (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2012). De acordo com Souza et al. (2011), o tamanho do tumor, gradação histológica de malignidade, metástases linfonodais e recidivas da doença são os principais fatores relacionados à sobrevida dos pacientes com CCELI. Embora as metástases em linfonodos regionais sejam identificadas em apenas 6,6-26,5% dos casos, apenas 25-50% destes pacientes sobrevivem após 5 anos, indicando um prognóstico desfavorável (SANTOS et al., 2014).

O tratamento de escolha para o CCELI é a excisão cirúrgica, a depender da extensão, seguida por reconstrução funcional e estética. Diferentes tipos de técnicas podem ser utilizadas. A radioterapia adjuvante é indicada nos casos recorrentes e metastáticos, também podendo servir como uma alternativa em casos inoperáveis (GERAUD et al., 2012).

2.2.1 Reg-gamma

O REG γ (também denominado antígeno PSME3, PA28 γ ou Ki) é um membro da família de 28 KDa da partícula reguladora 11S REG/PA28 que ativa de maneira independente o ATP e a função catalítica do proteossoma 20S. Diferentemente dos homólogos 11S REG α e REG β que são expressos no citoplasma, o REG γ está localizado no núcleo em uma forma homoheptâmera, com níveis mais altos no cérebro do que em outros tecidos (JING et al. 2010; ALI et al. 2013; ZANINI et al. 2015). Pode promover a degradação de múltiplas proteínas incluindo p53 e MDM2, de maneira independente de ubiquitina e ATP. Estudos anteriores descobriram que o REG γ está superexpresso em numerosos tipos de câncer, incluindo cânceres de mama, tireóide, pulmão e fígado, sugerindo um possível papel do REG γ na tumorigênese (WANG et al., 2011; ALI et al. 2013; CHAI et al., 2014; WAN et al., 2014; LI et al. 2015).

Esta proteína está envolvida na regulação de uma ampla gama de processos fisiológicos incluindo envelhecimento, metabolismo lipídico hepático e angiogênese. Além disso, também pode desempenhar um papel na regulação da imunidade inata. No entanto, pouco se sabe sobre seus mecanismos na regulação de doenças inflamatórias ou sua relação com o câncer associado à inflamação. Estudos mostram que camundongos silenciados para REG γ exibiam crescimento reduzido, diminuição da proliferação celular e aumento do apoptose. Evidências recentes sugerem que o REG γ está envolvido na progressão do câncer (ALI et al. 2013; LI, J et al 2015;

XU et al. 2015).

Ali et al. (2013) foram os primeiros a constatar que a anomalia na sinalização supressora de tumor p53 desregula a via de proteassoma independente de ubiquitina mediada por REG γ / ATP durante a tumorigênese. Descobriram que REG γ promove a degradação de p53 atuando como coativador para promover a ubiquitinação de p53 mediada por MDM2. Acredita-se que quando a p53 é elevada para desencadear suas funções biológicas, como a apoptose, a atividade da via REG γ -proteassoma será inibida para evitar a degradação da p53 e os efeitos proliferativos da célula.

Níveis aumentados de REG3A humano (também conhecido como proteína associada a pancreatite (PAP) e REG1 α foram descobertos em tumores primários do fígado com mutações de β -cat, sugerindo uma possível regulação destes genes *REG* pela via de sinalização canônica Wnt/ β -cat. Uma forte associação entre mutações de β -cat e mudanças na expressão dos genes Reg também foram documentados em um estudo clínico recente envolvendo amostras de biópsia de pacientes com câncer de fígado. A ativação desregulada da sinalização Wnt canônica também foi identificada em outros tipos de câncer nos quais as proteínas REG γ mostraram um aumento da expressão (JING et al. 2010)

Li, L et al. (2015) demonstraram que o REG γ funciona como um oncogene para a tumorigênese da pele em um modelo de carcinogênese cutânea. Avaliaram que a via de sinalização Wnt têm sido sugerida como tendo um papel importante na progressão dos cânceres de pele, e encontraram níveis mais elevados de β -cat no tumor de pele de camundongos REG γ positivo do que nos camundongos REG γ ⁻ negativo, através dos testes de western blot e análise imuno-histoquímica. Além disso a expressão dos genes alvo da β -cat, incluindo CyclinD1 e c-Myc, foi aumentada na pele de camundongos REG γ positivo, mas diminuída ou sem alteração nas células da pele de camundongos REG γ negativos. Concluindo então que o REG γ promove a sinalização Wnt / β -cat e aumenta a expressão dos genes alvo da via Wnt.

2.2.2 Beta-catenina

A adesão celular desempenha um papel fundamental na organização tecidual e nas funções fisiológicas dos tecidos e órgãos (GUMBINER, 1996). As moléculas de adesão são proteínas expressas na superfície celular e participam das interações célula-célula e célula-matriz extracelular. Várias famílias de moléculas de adesão são conhecidas: integrinas,

caderinas, selectinas, imunoglobulinas e outras como o CD44. Estas moléculas estão envolvidas na sinalização entre o interior e o exterior da célula, no crescimento, proliferação, na organização espacial e migração celular. Desta forma, participam dos processos biológicos e patológicos, atuando ativamente do processo de metástase tumoral (RAJARAJAN et al. 2012).

A invasão tumoral e a formação de metástases envolvem uma série de etapas, incluindo degradação proteolítica da membrana basal e da matriz extracelular, alterações na adesão celular e movimentação das células tumorais nos tecidos. Em particular, tem sido sugerido que a redução da adesão celular mediada pelos complexos β -catenina /E-caderina está associada ao desenvolvimento e progressão dos CCEs (FREITAS et al. 2010; ZARGARAN et al. 2018).

As caderinas são glicoproteínas transmembranares que medeiam a adesão intercelular na presença de cálcio extracelular. O complexo caderina é composto pelos seguintes componentes: caderina, componentes intracelulares associados à caderina (Cateninas) e ao citoesqueleto (Actina). As cateninas (α -, β - e γ -) são proteínas citoplasmáticas que interagem com o domínio intracelular das caderinas, fornecendo ancoragem ao citoesqueleto (DRIVALOS et al., 2011). Dentre o grupo das cateninas, a β -cat possui destaque por se ligar diretamente à porção citoplasmática da E-cad e ser objeto de intensa investigação científica (MIGUEL et al., 2004).

A β -cat é uma proteína citoplasmática multifuncional que tem duas funções principais: a adesão celular mediada pela E-cad e a transdução de sinais celulares, participando principalmente como fator de transcrição na via Wnt. Estas duas funções biológicas distintas da β -cat determinam sua localização celular: Atuando como membro envolvido na adesão e na manutenção da arquitetura tecidual célula-célula localizando-se na membrana citoplasmática e quando situada livre no citoplasma, participa da sinalização celular, ligando-se ao TCF/LEF (Fator de Célula Estimulante Linfóide- 1/T)) ativando sua atividade transcricional no núcleo que resulta na expressão de genes alvo, como a ciclina D1, c-myc, metaloproteinase 7 (MMP7) e MMP26 (MIGUEL et al. 2004; LE BRAS et al. 2011; HE et al. 2012; RAJARAJAN et al. 2012; LU et al. 2013).

Esta proteína é essencial para o estabelecimento e manutenção das camadas epiteliais e proporciona uma ligação mecânica entre as junções intercelulares e as proteínas do citoesqueleto. Mutações genéticas da β -cat são responsáveis pela perda de adesão celular e invasão tumoral mesmo na presença de expressão normal de E-cad (OYAMA et al. 1994, GONZALEZ-MOLES et al. 2014, ALAMOUD et al. 2018).

A via de sinalização Wnt envolve genes altamente conservados para proteínas cujas funções biológicas são caracterizadas pelo crescimento, proliferação e diferenciação celular.

Atualmente são conhecidos 19 genes participantes da via Wnt, que podem ser divididos em duas classes: a que funciona por meio da sinalização da β -cat, via canônica e a independente de β -cat, que compreende a via não-canônica. A via canônica é a mais estudada (IWAI et al. 2010; ALAMOUD et al. 2018).

Na ausência de sinais Wnt, a β -cat é direcionada para degradação via proteassoma, por fosforilação através de um complexo multiproteico composto de uma serina/treonina quinase, glicogênio sintase quinase 3b (GSK-3b) e um produto do gene supressor de tumor: o polipose adenomatosa (APC) (ROJAS et al. 2015; ALAMOUD et al. 2018). A perda de E-cad ou a presença de sinalização WNT canônica promove o acúmulo de β -cat no citoplasma e a translocação para o núcleo, onde pode induzir a transcrição de genes que afetam a proliferação, migração e invasão celular. A diminuição da expressão membranar de β -cat e o aumento da expressão de catenina citoplasmática tem sido associada com a progressão do CCE (MIGUEL et al. 2004; PRGOMET et al. 2017).

A inibição da degradação da β -cat causada pelo ligante Wnt resulta no acúmulo dessa proteína citoplasmática e subsequente translocação para o núcleo, formando um complexo com o Fator de Célula Estimulante Linfóide-1/T (LEF-1/TCF) que desloca a proteína Grouch e assume a função de co-ativador, induzindo a transcrição de genes alvo da via de sinalização Wnt, associada ao crescimento e proliferação celular (GONZALEZ-MOLES et al. 2014; ALAMOUD et al. 2018). Portanto, se esta rota apresenta alterações no seu desempenho, pode levar ao crescimento celular descontrolado e à formação de tumores. A estabilização da β -cat é um evento precoce na carcinogênese. Vários relatos demonstraram ativação aberrante da via de sinalização Wnt em diversos tumores humanos, incluindo colorretal, gástrico e melanoma (CHANG et al. 2013; ROJAS et al. 2015).

Considerando a multifuncionalidade da β -cat, bem como seu papel na manutenção da integridade epitelial, objetivamos no presente estudo verificar a possível relação desta proteína com o REG γ e conseqüente progressão tumoral em uma série de casos de QAs e CCELI.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho se propôs investigar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Reg- γ e β -catenina em CCEs de lábio inferior e QAs, correlacionando-os entre si e sua relação com os aspectos clinicopatológicos, como a presença e ausência de metástase em linfonodos regionais, estadiamento clínico TNM e gradação histológica de malignidade nos CCEs e em QAs com variados graus de displasia epitelial . Pretendeu-se obter, com esses resultados, uma melhor compreensão de comportamento biológico das lesões objeto do estudo e o papel dessas proteínas, como elemento de valor contributivo na emissão prognóstica.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O Projeto de pesquisa referente a este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) recebendo o parecer Nº 2.947.524. (ANEXO 1)

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo em questão se caracterizou como uma pesquisa retrospectiva, descritiva e observacional, caracterizada pela análise e registro da imunexpressão das proteínas β -catenina e REG γ em espécimes teciduais de CCELI e QA.

4.3 POPULAÇÃO

Nesta pesquisa, a população foi constituída pelos casos de QAs diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN, no período de 2000 a 2015, e pelos casos de CCELI, diagnosticados e registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Dr. Luiz Antônio, Natal, RN, no período de 2003 a 2012.

4.4 AMOSTRA

A amostra foi constituída por 30 espécimes de QAs e 30 espécimes de CCELI inferior, que estavam enquadrados nos critérios de inclusão da amostra. Os dados de interesse para o estudo foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes, também arquivados no serviço anteriormente referenciados. As informações foram registradas em fichas previamente elaboradas (APÊNDICE A e B).

4.4.1 Critérios de inclusão

- Espécimes diagnosticados histopatologicamente como CCELI oriundos de ressecções cirúrgicas excisionais.

- Espécimes diagnosticados histopatologicamente como hiperqueratose ou displasias epiteliais, associadas a elastose solar, compatíveis com o diagnóstico clínico de QA, localizadas em lábio inferior.
- Espécimes com material biológico em quantidade e qualidade suficiente para o estudo morfológico e análise imuno-histoquímica.
- Casos cujas fichas clínicas estavam preenchidas adequadamente, contendo os dados de interesse para o estudo.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os casos de QA tratadas previamente com medicamento, os casos de CCELI tratados previamente com radioterapia ou quimioterapia e os casos que não se adequaram aos critérios de inclusão previamente descritos.

4.5 ESTUDO CLÍNICO

As informações clínicas de interesse para a presente pesquisa, tais como idade e sexo dos pacientes, estadiamento clínico TNM e presença/ausência de metástases linfonodais regionais, foram obtidas a partir dos prontuários médicos dos pacientes diagnosticados com CCELI e QA, transcritas em fichas previamente elaboradas (APÊNDICE A e B). Para a análise do estadiamento clínico, foram considerados os parâmetros descritos na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), apresentados a seguir nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1- Sistema TNM para o CE de lábio inferior, preconizado pela American Cancer Society (2016)

TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com 2cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2cm e até 4cm em sua maior dimensã
T3	Tumor com mais de 4cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)
T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria corótida interna
ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL (N)	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão.
N2	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3cm e até 6cm em sua maior dimensão N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão. N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6cm em sua maior dimensão
ENVOLVIMENTO POR METÁSTASE DISTANTES (M)	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: SOBIN; WITTEKIND, 2002

Quadro 2- Sistema de estadiamento clínico (TNM) para o CE, preconizado pela American Cancer Society (2016).

ESTÁDIO	CLASSIFICAÇÃO TNM
Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

Fonte: SOBIN; WITTEKIND, 2002

4.6 ANÁLISE MORFOLÓGICA

O estudo morfológico foi realizado a partir de lâminas com cortes de 5 µm de espessura dos espécimes de QA e CCELI, corados pela técnica da hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram digitalizados por meio do Scanner Panoramic MIDI (3DHISTECH kft.29-33, Konkoly-Thege M. str.Budapest, Hungary, H-1121) e visualizados através do software Panoramic Viewer 1.15.2 (3DHISTECH kft.29-33, Konkoly-Thege M. str.Budapest, Hungary, H-1121).

Para a análise morfológica dos casos de QA, foram adotados os critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS (Quadro 3). Com base na presença e frequência destas alterações, os casos de QA foram categorizados em: ausência de displasia, displasia leve, displasia moderada e displasia severa (Quadro 4) (BARNES et al., 2005).

Quadro 3- Critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS para o diagnóstico de displasia oral.

CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DISPLASIA EPITELIAL	
Alterações arquiteturais	Alterações celulares
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose (tamanho anormal do núcleo)
Hiperplasia da camada basal	Pleomorfismo (forma anormal) nuclear
Projeções epiteliais em gota	Anisocitose (tamanho anormal da célula)
Número aumentado de figuras de mitose	Pleomorfismo (forma anormal) celular
Mitoses superficiais	Aumento da proporção núcleo-citoplasma
Disceratose (ceratinização individual)	Mitoses atípicas
Pérolas de ceratina	Hipercromatismo celular
	Aumento do número e/ou tamanho no núcleo

Quadro 4- Critérios para classificação dos graus de displasias epiteliais.

Displasia	Característica
Leve	Alterações na arquitetura epitelial limitadas ao terço inferior do epitélio e poucas atipias citológicas.
Moderada	Alterações na arquitetura estendem-se até o terço médio do epitélio e atipias citológicas em quantidade moderada
Severa	Alterações na arquitetura epitelial observada em mais de dois terços do epitélio associados com quantidade considerada de atipias celulares e nucleares

A análise da gradação histológica de malignidade, no *front* de invasão dos CCELI, foi realizada de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (1992), que atribui escores aos parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório (Quadro 5). Os escores obtidos em cada parâmetro morfológico foram somados, obtendo-se o escore final para o caso em questão. As lesões que apresentarem escores finais entre 4 e 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade, enquanto aquelas com escores finais, superiores a 8, foram classificadas como de alto grau de malignidade (DA SILVEIRA et al., 2010) (APEÊNDICE C).

Quadro 5- Sistema de gradação histológica de malignidade no “*front de invasão*” proposto por Bryne (1998)

Aspectos morfológicos	Escore de Malignidade			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Altamente ceratinizado (mais de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo Nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (mais de 75% das células maduras)	Moderado pleomorfismo nuclear (50 a 75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25 a 50% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (0 a 25% das células maduras)
Padrão de Invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (N>15)	Dissociação celular difusa e pronunciada, em pequenos grupos e/ou células individuais (N<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

4.6 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.6.1 Método imuno-histoquímico

Todos os espécimes teciduais selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram submetidos a cortes histológicos de 3 μm de espessura e estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas e preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxisilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Em seguida, foram submetidos ao método da imunoperoxidase, com a utilização dos anticorpos monoclonais anti- β -catenina e anti-REG γ .

Como controles positivos para os anticorpos anti- β -catenina e anti-REG γ foram utilizados cortes histológicos de tecido de adenocarcinoma do cólon humano e câncer gástrico humano, respectivamente. Em todas as imunomarcações, para efeito de controle negativo, foram feitas as substituições dos anticorpos primários por albumina de soro bovino (BSA) a 1%, em solução tampão.

A técnica utilizada obedeceu aos seguintes passos:

- 1) Em um recipiente, todas as amostras foram imersas em solução preparada contendo Trilogy®, seguindo, então, as amostras teciduais para panela pascal para desparafinização, reidratação e recuperação dos sítios antigênicos (QUADRO 6);
- 2) Lavagem do material em água corrente por 3 minutos e duas passagens por água destilada (1 minuto cada);
- 3) Incubação dos cortes, pelo período de 15 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes (3%) para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- 4) Lavagem em água destilada;
- 5) Imersão em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos cada;
- 6) Incubação com a proteína Background Block (Cell Marque, Rocklin, Califórnia, EUA) por 10 minutos;
- 7) Lavagem em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos;
- 8) Incubação dos cortes com anticorpos primários diluídos (Dako Envision Flex Antibody Diluent DM830);
- 9) Imersão em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos cada;
- 10) Incubação com anticorpo secundário com Sistema Hi Def Detection (Cell Marque; Rocklin, Califórnia, EUA) com aplicação de solução amplificadora por 20 minutos;

- 11) Imersão em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos;
- 12) Aplicação do polímero HRP do Sistema Hi Def por 20 minutos
- 13) Duas passagens em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 por 5 minutos cada;
- 14) Aplicação do agente cromógeno DAB (diaminobenzidina; Scytek Laboratories; Logan, Utah, USA), durante 5 minutos à temperatura ambiente;
- 15) Imersão em solução de Tween20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 durante 5 minutos;
- 16) Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente, durante 5 minutos;
- 17) Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- 18) Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (3 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (3 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- 19) Imersão em xilol I (5 minutos);
- 20) Imersão em xilol II (5 minutos);
- 21) Montagem da lamínula contra a lâmina em resina Permount® (Fisher Chemical Inc., Fair Lawn, NJ, USA) para observação em microscópio de luz.

Quadro 6- Especificidade, clone, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
REG- γ	Ab198824	Abcam	1:100	Pascal/Trilogy	<i>Overnight (18h)</i>
β -catenina	β -catenin-1	Dako	1:200	Pascal/Trilogy	60 minutos

4.6.2 Análise do perfil imuno-histoquímico

Após o processamento dos cortes histológicos, cada espécime foi analisado à microscopia de luz (Olympus BX41, Olympus Japan Co., Tokyo, JPN) por um examinador, previamente treinado, em dois momentos distintos. Destaca-se que as imunoexpressões das β -catenina e do REG γ foram analisadas somente no *front* de invasão tumoral dos CCELI. Para a análise imuno-histoquímica nos espécimes de QA, foi considerada toda a extensão do epitélio de revestimento. Nos casos em que houve discordâncias na interpretação dos resultados, o espécime foi reavaliado pelo examinador.

A análise da expressão da β -catenina e do REG γ foi semiquantitativa. Foram consideradas imunopositivas as células que exibiram coloração acastanhada na membrana plasmática e/ou citoplasma, independente da intensidade de marcação. Sob aumento de 100x, os casos foram classificados quanto à localização celular da imunomarcação (β -catenina: membrana, citoplasma ou núcleo; REG γ : citoplasma ou núcleo) e posteriormente categorizados, conforme os percentuais de células imunopositivas, nos seguintes escores: 0 (sem marcação); 1 (1-25% de células positivas); 2 (26-50% de células positivas); 3 (51-75% de células positivas); 4 (> 75% células positivas). Os dados obtidos foram anotados em fichas adequadas (APÊNDICE D)

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados clínicopatológicos e imuno-histoquímicos foram registrados em planilhas eletrônicas Excel (*Microsoft Office 2013 for Windows*) e posteriormente exportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 20.0; SPSS Inc., Chicago IL, USA), e posteriormente submetidos ao teste de *Mann-Whitney* e *Spearman*. Para todos os testes, foi estabelecido um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Os dados clínicos dos 30 casos de QA analisados nesta pesquisa encontram-se detalhados na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos casos de QA de acordo com parâmetros clinicopatológicos. Natal, RN – 2019.

Parâmetros	n (%)
Sexo	
Masculino	23 (76,7)
Feminino	7 (23,3)
Idade	
31-40 anos	2 (6,7)
41-50 anos	6 (20,0)
51-60 anos	14 (46,7)
61-70 anos	4 (13,3)
71-80 anos	4 (13,3)
Raça*	
Branca	16 (53,3)
Parda	9 (30,0)
Negra	2 (6,7)
Sem informações	3 (10,0)
Ocupação***	
Agricultor	14 (46,7)
Pescador	1 (3,3)
Pedreiro	2 (6,7)
Doméstico / cozinheiro	2 (6,7)
Motorista	2 (6,7)
Militar	1 (3,3)
Empresário / funcionário público	3 (10,0)
Sem informações	5 (16,7)
Grau de displasia epitelial	
Displasia leve	13 (43,3)
Displasia moderada	14 (46,7)
Displasia severa	3 (10,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Conforme verificado na tabela 1, a análise dos dados revelou maior acometimento de indivíduos do sexo masculino (n=23; 76,7%), com idade variando entre 31 e 80 anos (média = 55,23 ± 10,27 anos). No que diz respeito à raça, houve

predomínio/predominância de indivíduos brancos (n=16; 53,3%). No que se refere à atividade ocupacional dos indivíduos, houve maior prevalência de agricultores, representando 46,7% da amostra (n=14).

Os dados clínicos dos 30 casos de CCELI analisados nesta pesquisa encontram-se detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos casos de CCELI de acordo com parâmetros clinicopatológicos. Natal, RN – 2019.

Parâmetros	n (%)
Sexo	
Masculino	22 (73,3)
Feminino	8 (26,7)
Idade	
21-30 anos	1 (3,3)
31-40 anos	1 (3,3)
41-50 anos	1 (3,3)
51-60 anos	8 (26,7)
61-70 anos	8 (26,7)
71-80 anos	7 (23,3)
81-90 anos	2 (6,7)
> 90 anos	2 (6,7)
Raça*	
Branca	3 (10,0)
Parda	5 (16,7)
Sem informações	22 (73,3)
Hábitos**	
Tabagismo	10 (33,3)
Tabagismo + etilismo	9 (30,0)
Sem informações	11 (36,7)
Ocupação***	
Agricultor	9 (30,0)
Pescador	1 (3,3)
Pedreiro	1 (3,3)
Doméstico / cozinheiro	2 (6,7)
Sem informações	17 (56,7)
Estadiamento clínico	
Estágio I	4 (13,3)
Estágio II	17 (56,7)
Estágio III	4 (13,3)
Estágio IV	3 (10,0)
Sem informações	2 (6,7)

Tamanho do tumor	
T1	8 (26,7)
T2	17 (56,7)
T3	2 (6,7)
T4	2 (6,7)
Sem informações	1 (3,3)
Metástase linfonodal	
Ausente	25 (83,3)
Presente	5 (16,7)
Recidiva local	
Não	28 (93,3)
Sim	2 (6,7)
Óbito	
Não	27 (90,0)
Sim	3 (10,0)
Gradação histopatológica de malignidade	
Baixo grau	18 (60,0)
Alto grau	12 (40,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Conforme verificado na tabela 2, a análise dos dados revelou maior acometimento de indivíduos do sexo masculino (73,3%), com idade variando entre 29 a 97 anos (média = 66,10 ± 15,84 anos. A sexta e sétima décadas de vida foram as faixas etárias mais prevalentes, correspondendo a 53,4% dos casos.

No que diz respeito ao estadiamento clínico TNM, o estágio II foi o mais frequente (n= 17; 56,7). Quanto ao tamanho do tumor, o tamanho T2 foi o mais prevalente (n=17; 56,7%), além disso, foi verificado que dos 30 casos de CCELI, 5 casos apresentaram metástase linfonodal (16,7%).

5.2 RESULTADOS MORFOLÓGICOS

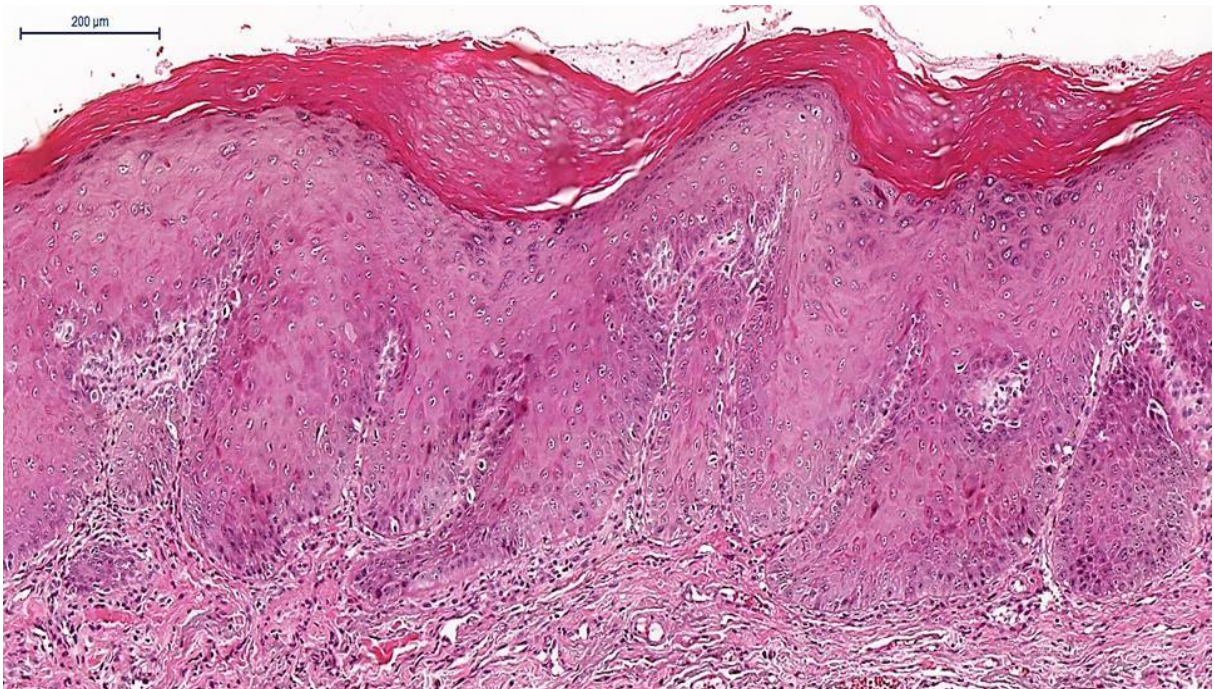
5.2.1 Queilite Actínica

Na avaliação morfológica, encontraram-se aspectos histopatológicos inerentes ao quadro de QAs, sendo evidenciada a presença de epitélio pavimentoso estratificado com áreas de atrofia e hiperplasia, demonstrando marcante produção de ceratina (hiperceratose) na maioria dos casos, além da presença de alterações displásicas arquiteturais e celulares. O tecido conjuntivo subjacente apresentava faixa de alteração basofílica amorfa e acelular das fibras

colágenas, caracterizando a elastose solar, além da presença de leve infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear (Figuras 1 e 2).

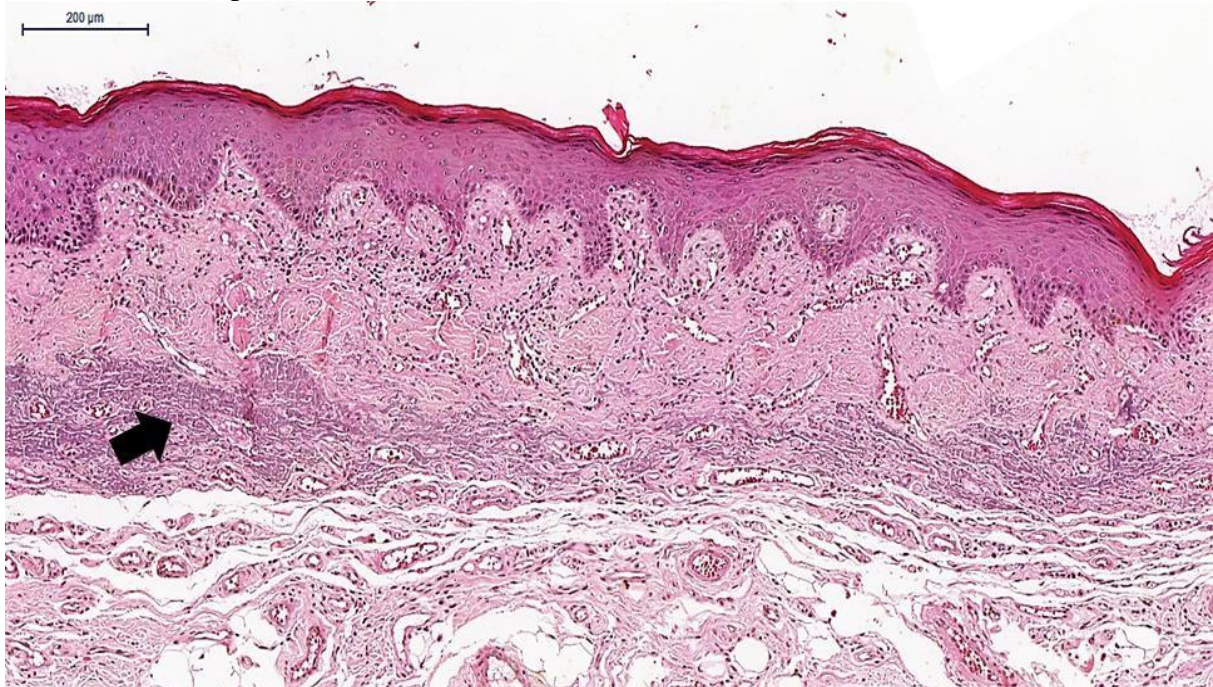
A análise morfológica das QAs de acordo com os parâmetros de alterações displásicas da OMS, evidenciou 13 casos com displasia leve (43,3%), 14 casos com displasia moderada (46,7%) e 3 casos com displasia severa (10%) (Tabela 1).

Figura 1 - Aspectos microscópicos evidenciando perda de estratificação, projeções em gota, inversão de polaridade, nucléolos evidentes e hiperchromatismo em caso de QA (Pannoramic Viewer, H/E).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 2 - Fotomicrografia evidenciando áreas de atrofia e hiperplasia do epitélio, infiltrado inflamatório subepitelial e elastose solar (seta) em caso de (Pannoramic Viewer, H/E)



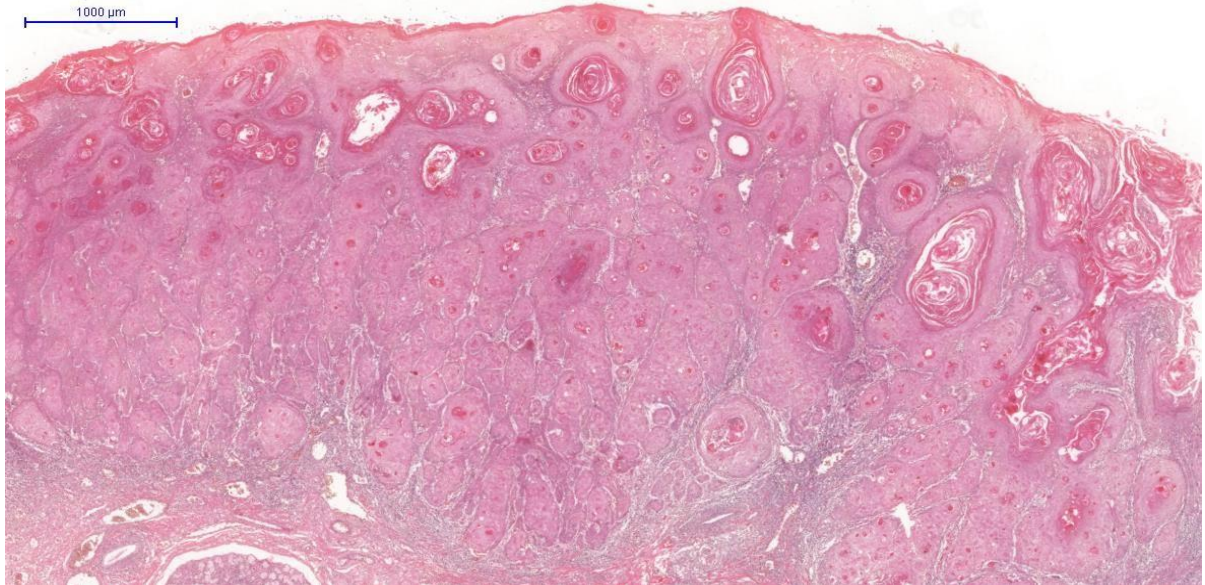
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

5.2.2 Carcinoma de células escamosas de lábio inferior

A análise morfológica revelou características inerentes ao CCELI. Observou-se a invasão em ilhas, lençóis e cordões de células epiteliais malignas, crescendo como entidades independentes dentro do tecido conjuntivo (Figuras 3 e 4). Estas células apresentavam hiperchromatismo nuclear, alteração da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular e nuclear, disceratose (com formações de pérolas córneas) e figuras de mitose típicas e atípicas. O infiltrado inflamatório variou de escasso a intenso (Figuras 3 - 6).

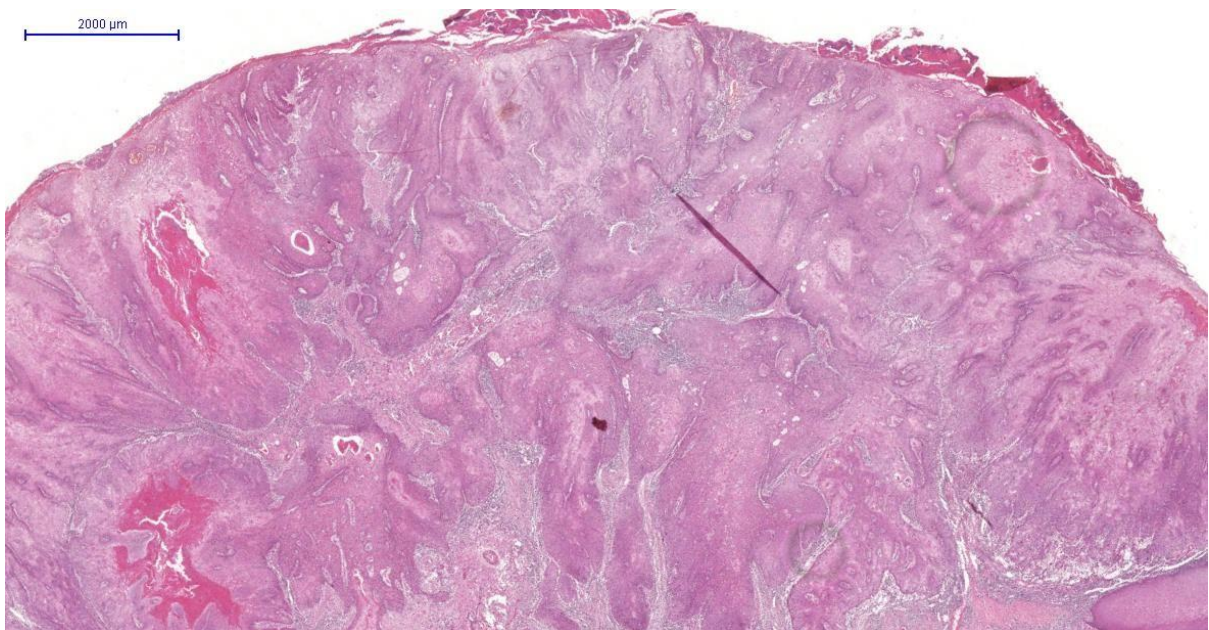
No tocante ao sistema de gradação histopatológica de malignidade proposto por Bryne (1992), a maioria dos casos de CCELI foram classificados como baixo grau de malignidade (60%), em relação ao alto grau de malignidade (40%) (Tabela 2).

Figura 3- Fotomicrografia de CCELI evidenciando o padrão de invasão tumoral em ilhas e o infiltrado inflamatório difuso e intenso no estroma tumoral (Pannoramic Viewer, H/E).



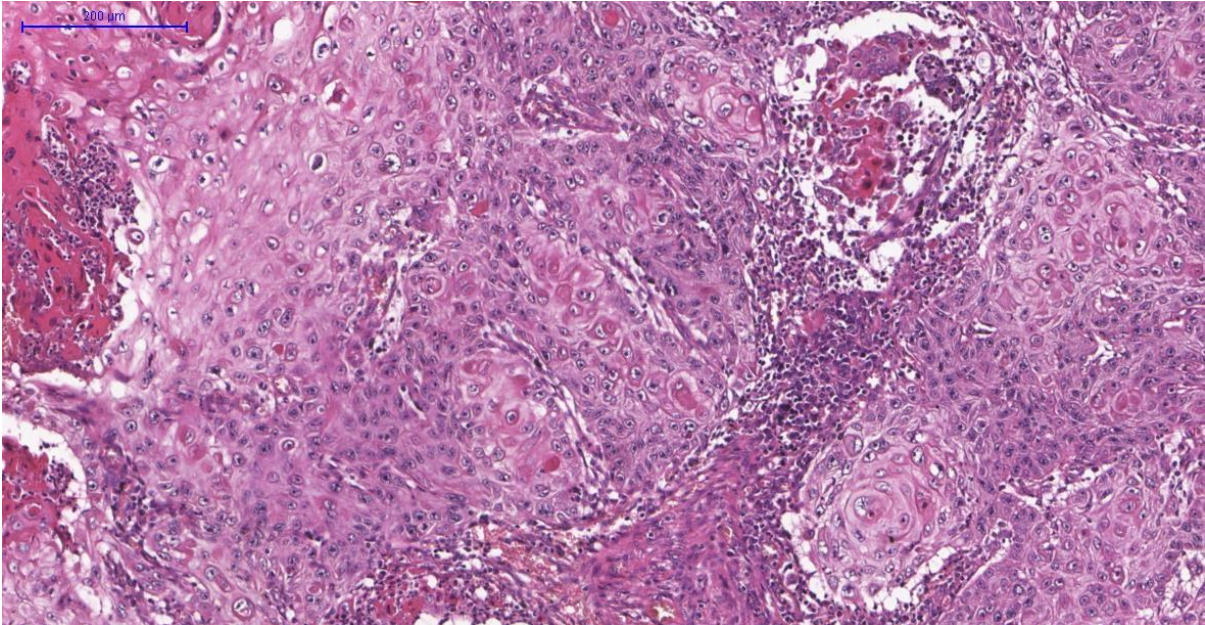
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 4- Fotomicrografia evidenciando as características histopatológicas de CCELI. Proliferação de células epiteliais malignas, formando cordões e ninhos que invadem o tecido conjuntivo (Pannoramic Viewer, H/E; 2x)



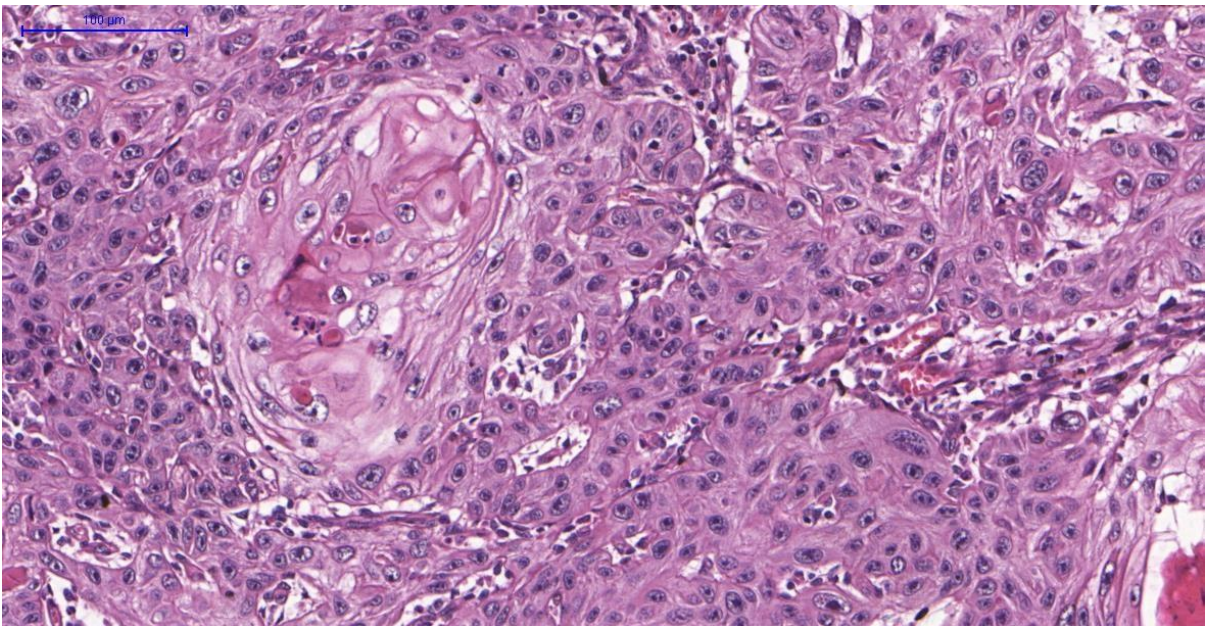
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 5- Aspecto morfológico de CCELI evidenciando o pleomorfismo celular (Pannoramic Viewer, H/E).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 6- Aspecto morfológico de CCELI evidenciando células apresentando hiper cromatismo nuclear, alteração da relação núcleo/citoplasma, pleomorfismo celular e nuclear, figuras de mitose (Pannoramic Viewer, H/E).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

A análise dos espécimes submetidos à marcação imuno-histoquímica com o anticorpo anti- β -catenina e com anticorpo anti-REG- γ revelou expressão de ambas as proteínas em quase todos os casos. De acordo com a tabela 3, dos 30 casos de QA submetidos à marcação imuno-histoquímica, houve predomínio do escore 4 para a imunoposição do REG- γ , tanto em nível citoplasmático (93,3%) quanto em nível nuclear (90%) (Figura 12). Por sua vez, na imunoposição da β -catenina foi verificado predomínio do escore 3 para a marcação citoplasmática (50%) e do escore 1 para a marcação nuclear (60%) (Figuras 7 e 8)

Tabela 3. Distribuição dos casos de QA de acordo com os escores de imunoposição do REG- γ e da β -catenina. Natal, RN – 2019

Biomarcador / localização	Escore 0 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 3 n (%)	Escore 4 n (%)
REG-γ					
Citoplasma	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,3)	1 (3,3)	28 (93,3)
Núcleo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (10,0)	27 (90,0)
β-catenina					
Membrana	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	30 (100,0)
Citoplasma	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (30,0)	15 (50,0)	6 (20,0)
Núcleo	0 (0,0)	18 (60,0)	9 (30,0)	3 (10,0)	0 (0,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Ainda analisando os casos de QA quanto à marcação imuno-histoquímica do REG- γ (Figuras 13 e 14) e suas diferenças com os graus de displasia epitelial, não foi possível encontrar relações estatisticamente significativas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Tabela 4).

No que se refere à β -catenina, foi evidenciada relação estatisticamente significativa entre a expressão desta proteína e o grau de displasia epitelial das QAs. Em comparação aos casos de QA com displasia leve, as QAs com displasia moderada ou severa apresentaram maiores escores de expressão citoplasmática de β -catenina ($p=0,014$). Assim como a expressão nuclear da β -catenina, foi superior nas displasias moderadas e severas em comparação às displasias leves ($p=0,30$) (Tabela 5).

Tabela 4. Análise dos escores de imunoposição citoplasmática e nuclear do REG- γ e suas diferenças em relação ao grau de displasia epitelial das QAs. Natal, RN – 2019.

Grupos	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
REG-γ (citoplasma)						
Displasia leve	13	4,00	4,00-4,00	15,31	108,00	0,809
Displasia moderada / severa	17	4,00	4,00-4,00	15,65		
REG-γ (núcleo)						
Displasia leve	13	4,00	4,00-4,00	17,00	91,00	0,116
Displasia moderada / severa	17	4,00	4,00-4,00	14,35		

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*).

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Tabela 5. Análise dos escores de imunexpressão membranar, citoplasmática e nuclear da β-catenina e suas diferenças em relação ao grau de displasia epitelial das QAs. Natal, RN – 2019.

Grupos	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
β-catenina (membrana)						
Displasia leve	13	4,00	4,00-4,00	15,50	110,50	1,000
Displasia moderada / severa	17	4,00	4,00-4,00	15,50		
β-catenina (citoplasma)						
Displasia leve	13	2,00	2,00-3,00	11,35	56,50	0,014
Displasia moderada / severa	17	3,00	3,00-4,00	18,68		
β-catenina (núcleo)						
Displasia leve	13	1,00	1,00-1,00	12,04	65,50	0,030
Displasia moderada / severa	17	2,00	1,00-2,00	18,15		

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*).

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

De acordo com a Tabela 6, nos espécimes de CCELI, o REG-γ apresentou imunexpressão citoplasmática em todos os casos, com maior frequência do escore 4 (56,7%) (Figuras 15 e 16). A marcação nuclear do REG-γ também foi observada em todos os casos, sendo 29 casos (96,7%) com escore 4. Em relação à marcação imuno-histoquímica membranar da β-catenina, houve predomínio dos escores 2 (30%) e 3 (33,3%) (Figura 10). No que se refere à expressão citoplasmática, foram observadas frequências iguais para os escores 3 (36,7%) e 4

(36,7%), sendo esses os mais prevalentes (Figura 11). A expressão nuclear da β -catenina apresentou predomínio do escore 1 (56,7%).

Tabela 6. Distribuição dos casos de CCELI de acordo com os escores de imunexpressão do REG- γ e da β -catenina. Natal, RN – 2019

Biomarcador / localização	Escore 0 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 3 n (%)	Escore 4 n (%)
REG-γ					
Citoplasma	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (13,3)	9 (30,0)	17 (56,7)
Núcleo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,3)	29 (96,7)
β-catenina					
Membrana	1 (3,3)	3 (10,0)	9 (30,0)	10 (33,3)	7 (23,3)
Citoplasma	0 (0,0)	1 (3,3)	7 (23,3)	11 (36,7)	11 (36,7)
Núcleo	2 (6,7)	17 (56,7)	6 (20,0)	5 (16,7)	0 (0,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/UFRN.

Ainda em relação aos casos de CCELI, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney demonstrou não haver relações estatisticamente significativas entre os escores de imunexpressão (citoplasmática e nuclear) do REG- γ (Figuras 17 e 18) e os parâmetros clinicopatológicos analisados (estadiamento clínico, tamanho do tumor, metástase nodal e grau histopatológico de malignidade) (Tabela 7 e 8).

Tabela 7. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática do REG- γ e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos CCELIs. Natal, RN – 2019.

Parâmetros	n	Mediana	Q₂₅-Q₇₅	Média dos postos	U	p*
Estadiamento clínico**						
I – II	21	4,00	3,00-4,00	13,69	56,50	0,307
III – IV	7	4,00	3,00-4,00	16,93		
Tamanho do tumor***						
T1 – T2	25	4,00	3,00-4,00	14,96	49,00	0,944
T3 – T4	4	3,50	3,00-4,00	15,25		
Metástase nodal						
Ausente	25	4,00	3,00-4,00	14,98	49,50	0,416
Presente	5	4,00	3,00-4,00	18,10		
Grau histopatológico de malignidade						
Baixo grau	18	4,00	3,00-4,00	15,86	101,50	0,757
Alto grau	12	3,50	3,00-4,00	14,96		

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (U); **Informação não disponível em 2 casos; ***Informação não disponível em 1 caso.

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Tabela 8. Análise dos escores de imunexpressão nuclear do Reg- γ e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos CCELI's Natal, RN – 2019.

Parâmetros	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
Estadiamento clínico**						
I – II	21	4,00	4,00-4,00	14,33	70,00	0,564
III – IV	7	4,00	4,00-4,00	15,00		
Tamanho do tumor***						
T1 – T2	25	4,00	4,00-4,00	14,92	48,00	0,689
T3 – T4	4	4,00	4,00-4,00	15,50		
Metástase nodal						
Ausente	25	4,00	4,00-4,00	15,40	60,00	0,655
Presente	5	4,00	4,00-4,00	16,00		
Grau histopatológico de malignidade						
Baixo grau	18	4,00	4,00-4,00	15,17	102,00	0,414
Alto grau	12	4,00	4,00-4,00	16,00		

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*); **Informação não disponível em 2 casos; ***Informação não disponível em 1 caso.

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Em relação aos escores de imunexpressão membranar da β -catenina, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou haver diferenças estatisticamente significativas quanto ao grau histopatológico de malignidade ($p=0,031$). Os CCELI's de baixo grau de malignidade apresentaram maior expressão membranar de β -catenina do que os tumores de alto grau. Porém, os demais parâmetros clinicopatológicos (estadiamento clínico, tamanho do tumor e metástase nodal) dos CCELI's não apresentaram relações estatisticamente significativas com a expressão membranar da referida proteína.

Quanto à análise dos escores de imunexpressão citoplasmática da β -catenina, o teste não-paramétrico de Mann-Whitney também revelou diferenças estatisticamente significativas em relação ao grau histopatológico de malignidade ($p=0,006$). Os tumores de alto grau de malignidade apresentaram maior expressão citoplasmática de β -catenina do que os tumores de baixo grau (Tabela 10). Porém, a expressão citoplasmática de β -catenina não revelou significância estatística em relação ao estadiamento clínico nos CCELI.

A imunexpressão nuclear da β -catenina também demonstrou relação estatisticamente significativa com o grau histopatológico de malignidade ($p<0,001$). Nos CCELI's de alto grau, os escores de imunopositividade nuclear foram superiores aos encontrados nos tumores de baixo grau (Tabela 11). Os demais parâmetros clinicopatológicos não apresentaram relações estatisticamente significativas com a expressão nuclear desta proteína.

Tabela 9. Análise dos escores de imunexpressão membranar da β -catenina e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos CCELI's Natal, RN – 2019.

Parâmetros	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
Estadiamento clínico**						
I – II	21	3,00	2,00-3,50	15,19	59,00	0,423
III – IV	7	3,00	1,00-3,00	12,43		
Tamanho do tumor***						
T1 – T2	25	3,00	2,00-4,00	15,18	45,50	0,767
T3 – T4	4	3,00	1,50-3,00	13,88		
Metástase nodal						
Ausente	25	3,00	2,00-3,00	15,46	61,50	0,954
Presente	5	3,00	1,00-4,00	15,70		
Grau histopatológico de malignidade						
Baixo grau	18	3,00	2,00-4,00	18,22	59,00	0,031
Alto grau	12	2,00	1,00-3,00	11,42		

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*); **Informação não disponível em 2 casos; ***Informação não disponível em 1 caso.

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Tabela 10. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática da β -catenina e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos CCELI's Natal, RN – 2019.

Parâmetros	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
Estadiamento clínico**						
I – II	21	3,00	3,00-4,00	16,19	38,00	0,045
III – IV	7	2,00	2,00-3,00	9,43		
Tamanho do tumor***						
T1 – T2	25	3,00	3,00-4,00	16,00	25,00	0,092
T3 – T4	4	2,50	2,00-3,00	8,75		
Metástase nodal						
Ausente	25	3,00	2,50-4,00	16,08	48,00	0,392
Presente	5	3,00	2,00-3,50	12,60		
Grau histopatológico de malignidade						
Baixo grau	18	3,00	2,00-3,00	12,11	47,00	0,006
Alto grau	12	4,00	3,00-4,00	20,58		

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*); **Informação não disponível em 2 casos; ***Informação não disponível em 1 caso.

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Tabela 11. Análise dos escores de imunexpressão nuclear da β -catenina e suas diferenças em relação a parâmetros clinicopatológicos dos CCELI. Natal, RN – 2019.

Parâmetros	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
Estadiamento clínico**						
I – II	21	1,00	1,00-2,00	14,74	68,50	0,771
III – IV	7	1,00	1,00-2,00	13,79		
Tamanho do tumor***						
T1 – T2	25	1,00	1,00-2,00	15,28	43,00	0,625
T3 – T4	4	1,00	1,00-1,75	13,25		
Metástase nodal						
Ausente	25	1,00	1,00-2,00	15,72	57,00	0,733
Presente	5	1,00	1,00-2,00	14,40		
Grau histopatológico de malignidade						
Baixo grau	18	1,00	1,00-1,00	10,58	19,50	< 0,001
Alto grau	12	2,00	2,00-3,00	22,88		

Legenda: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*); **Informação não disponível em 2 casos; ***Informação não disponível em 1 caso.

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não revelou diferença estatisticamente significativa na análise dos escores de imunexpressão nuclear do Reg- γ quando em relação ao tipo de lesão ($p=0,350$). Por outro lado, a imunexpressão citoplasmática desta proteína nos CCELI foi superior à encontrada nas QAs ($p=0,002$) (Tabela 12).

No tocante à análise da β -catenina, também foram constatadas diferenças estatisticamente significativas quanto ao tipo de lesão. Nos CCELI, os escores de imunexpressão membranar da referida proteína foram inferiores aos encontrados nas QAs ($p<0,001$) (Tabela 13).

Tabela 12. Análise dos escores de imunexpressão citoplasmática e nuclear do Reg- γ e suas diferenças em relação ao tipo de lesão. Natal, RN – 2019.

Grupo	<i>N</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
Reg-γ (citoplasma)						
Queilite actínica	30	4,00	4,00-4,00	35,92	287,50	0,002
Carcinoma de células escamosas	30	4,00	3,00-4,00	25,08		
Reg-γ (núcleo)						
Queilite actínica	30	4,00	4,00-4,00	29,50	420,00	0,350
Carcinoma de células escamosas	30	4,00	4,00-4,00	31,50		

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*).

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Tabela 13. Análise dos escores de imunexpressão membranar, citoplasmática e nuclear da β -catenina e suas diferenças em relação ao tipo de lesão. Natal, RN – 2019.

Grupo	<i>n</i>	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	<i>U</i>	<i>p</i> *
β-catenina (membrana)						
Queilite actínica	30	4,00	4,00-4,00	42,00	105,00	<0,001
Carcinoma de células escamosas	30	3,00	2,00-3,25	19,00		
β-catenina (citoplasma)						
Queilite actínica	30	3,00	2,00-3,00	28,50	390,00	0,344
Carcinoma de células escamosas	30	3,00	2,00-4,00	32,50		
β-catenina (núcleo)						
Queilite actínica	30	1,00	1,00-2,00	31,15	430,50	0,745
Carcinoma de células escamosas	30	1,00	1,00-2,00	29,85		

* Teste não-paramétrico de Mann-Whitney (*U*).

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Com base no teste de correlação de *Spearman* (r), não foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre os escores de imunexpressão citoplasmática e nuclear de Reg- γ , quer seja nas QAs ou nos CCELI. As correlações entre a imunexpressão de Reg- γ e β -catenina, considerando suas diferentes localizações celulares, também não demonstraram significância estatística nos grupos analisados. No tocante à β -catenina, foram constatadas correlações positivas e estatisticamente significativas entre os escores de imunexpressão citoplasmática e nuclear, tanto nas QAs ($r=0,695$; $p<0,001$) quanto nos CCELI ($r=0,432$; $p=0,017$).

Tabela 14. Correlações entre os escores de imunexpressão do Reg- γ e da β -catenina em QAs e CCELI. Natal, RN – 2019.

Correlação	<i>Queilite actínica</i> ($n = 30$)		<i>Carcinoma de células escamosas</i> ($n = 30$)	
	r	p^*	r	p^*
Reg- γ (citoplasma) x Reg- γ (núcleo)	-0,089	0,640	0,157	0,408
β -catenina (membrana) x β -catenina (citoplasma)	**	**	-0,013	0,945
β -catenina (membrana) x β -catenina (núcleo)	**	**	-0,157	0,407
β -catenina (citoplasma) x β -catenina (núcleo)	0,695	< 0,001	0,432	0,017
Reg- γ (citoplasma) x β -catenina (membrana)	**	**	-0,307	0,099
Reg- γ (citoplasma) x β -catenina (citoplasma)	0,158	0,404	-0,235	0,212
Reg- γ (citoplasma) x β -catenina (núcleo)	-0,019	0,922	-0,317	0,088
Reg- γ (núcleo) x β -catenina (membrana)	**	**	-0,257	0,171
Reg- γ (núcleo) x β -catenina (citoplasma)	-0,042	0,826	0,034	0,858
Reg- γ (núcleo) x β -catenina (núcleo)	-0,133	0,484	0,108	0,572

* Teste de Correlação de *Spearman* (r); ** Não foi possível realizar teste estatístico.

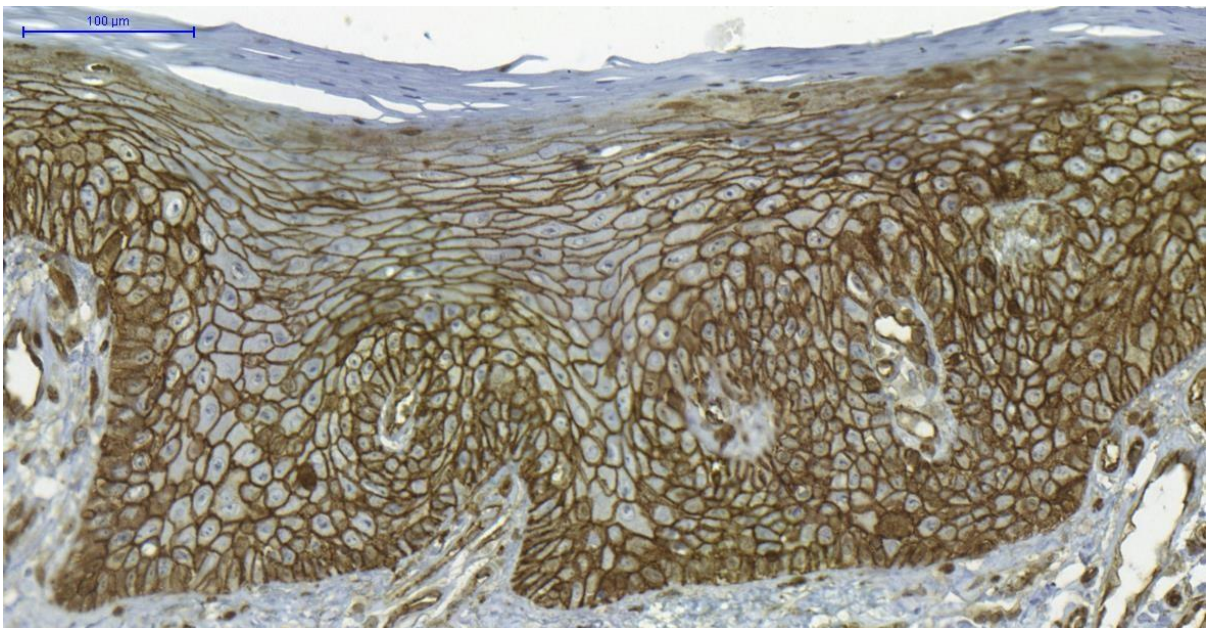
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral/ UFRN.

Figura 7- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em QA (Pannoramic Viewer).



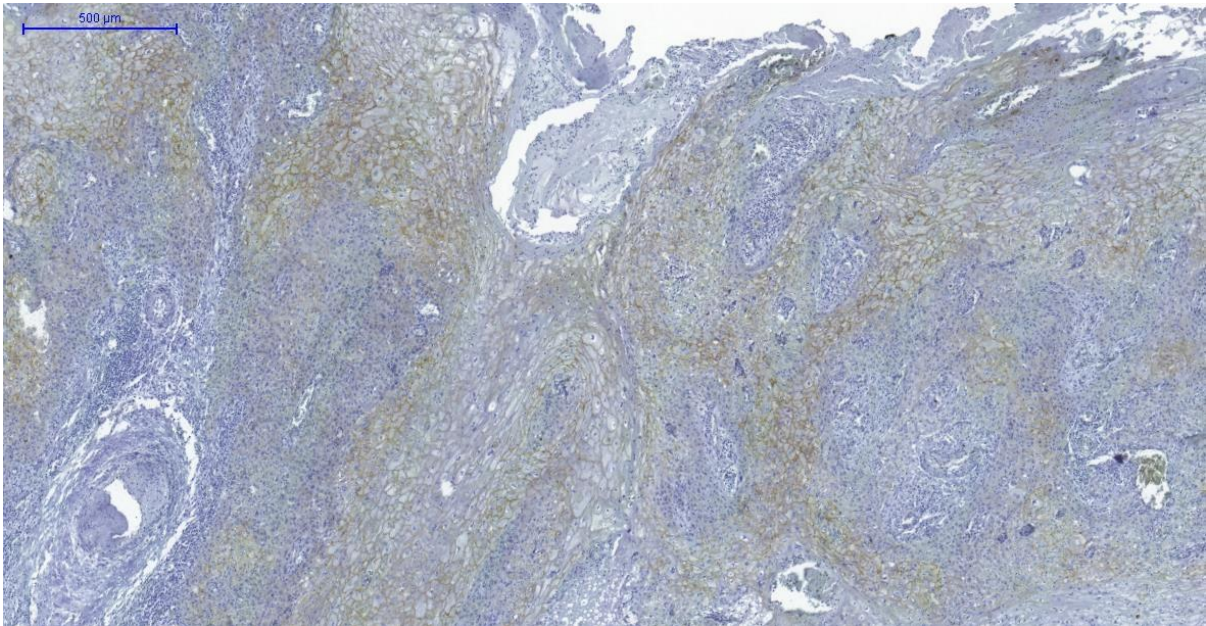
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 8- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em QA (Pannoramic Viewer).



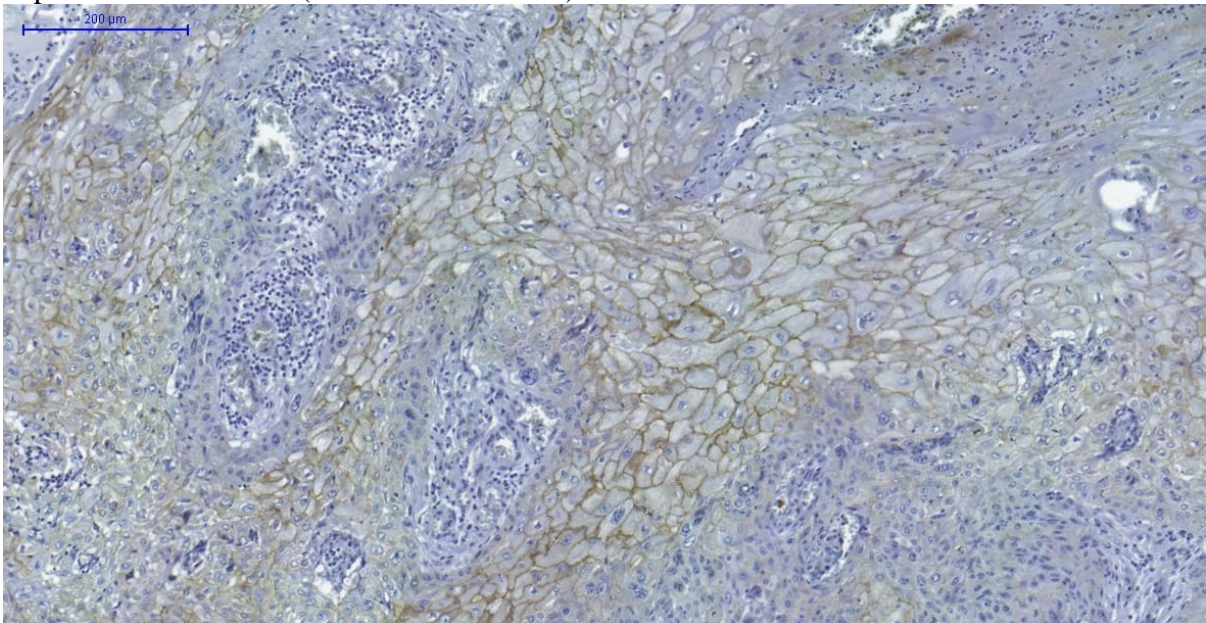
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 9- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em CCELI (Pannoramic Viewer).



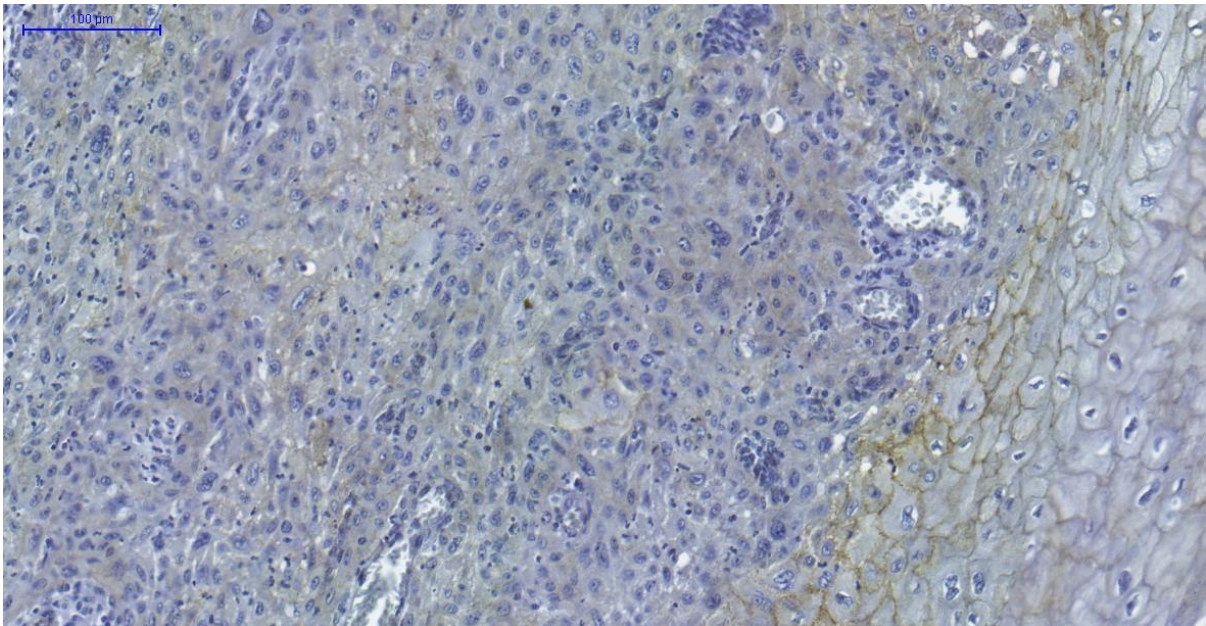
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 10- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em CCELI, com predomínio de expressão membranar. (Pannoramic Viewer)



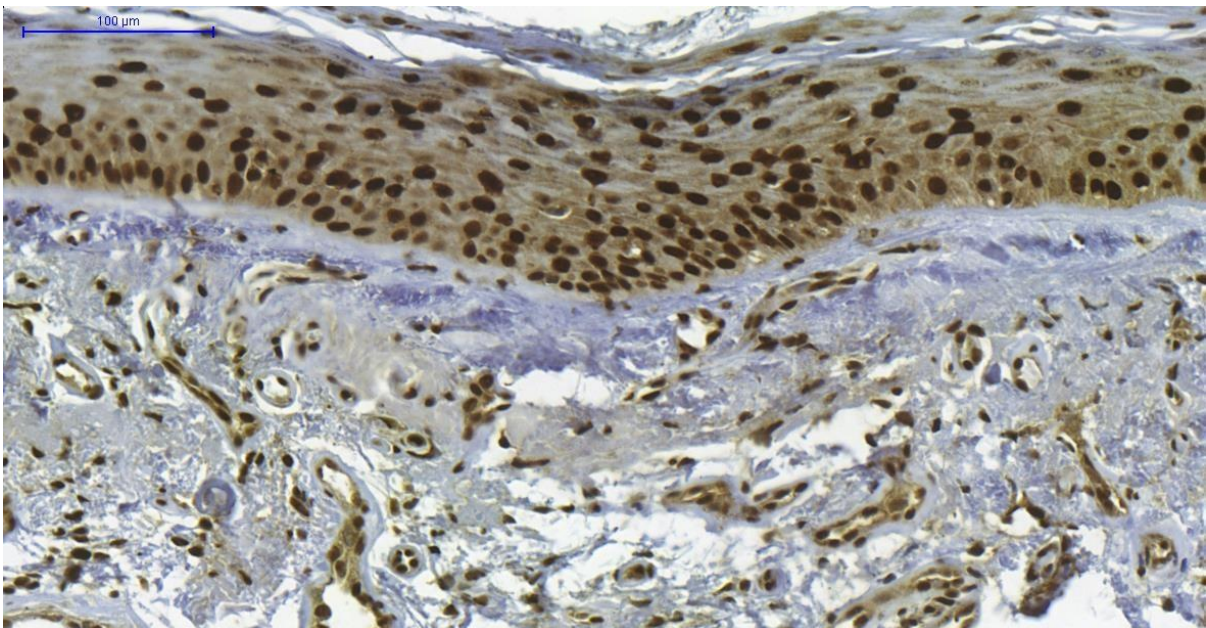
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 11- Expressão imuno-histoquímica de β -catenina em CCELI, com predomínio de expressão citoplasmática (Pannoramic Viewer).



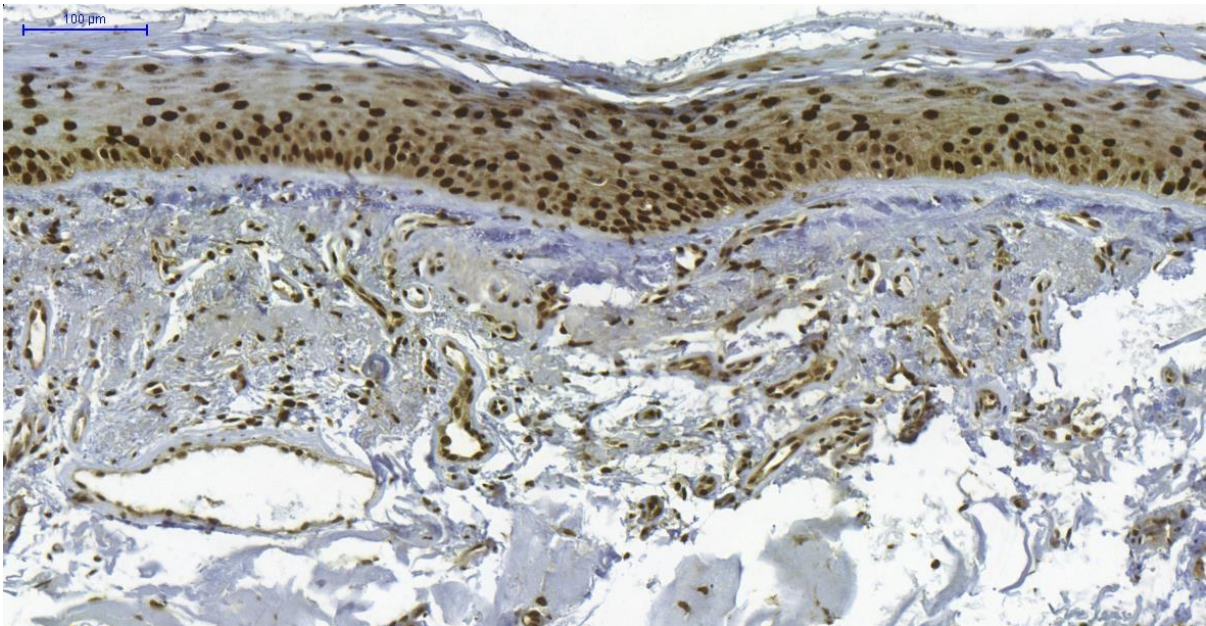
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 12- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em QA (Pannoramic Viewer).



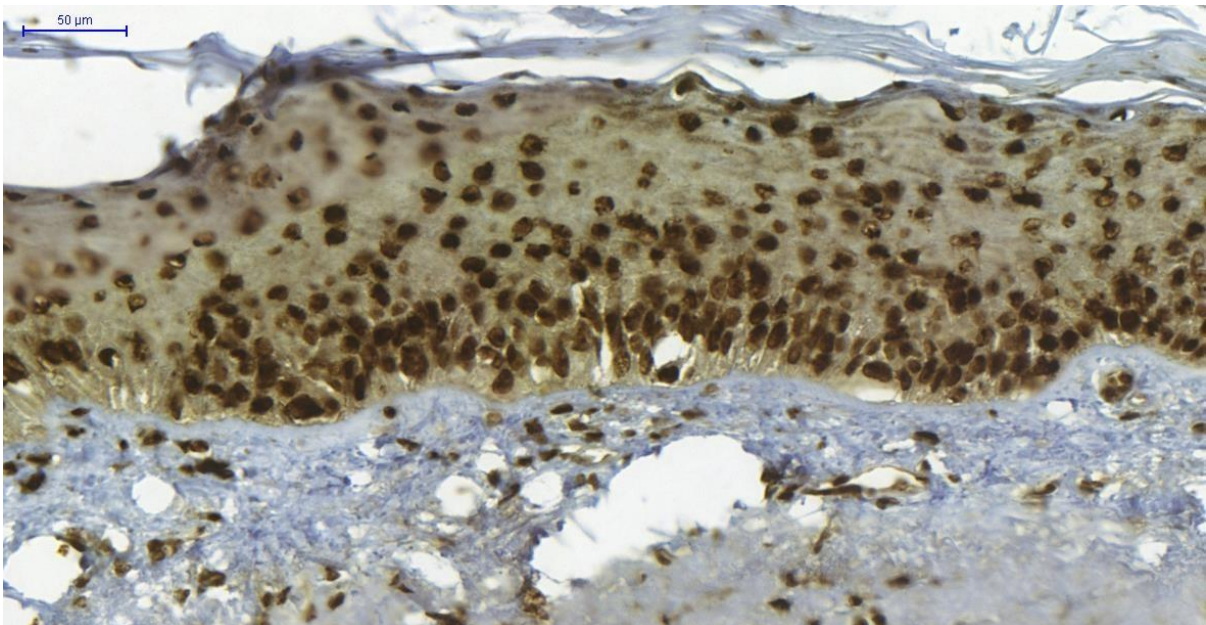
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 13- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em QA (Pannoramic Viewer).



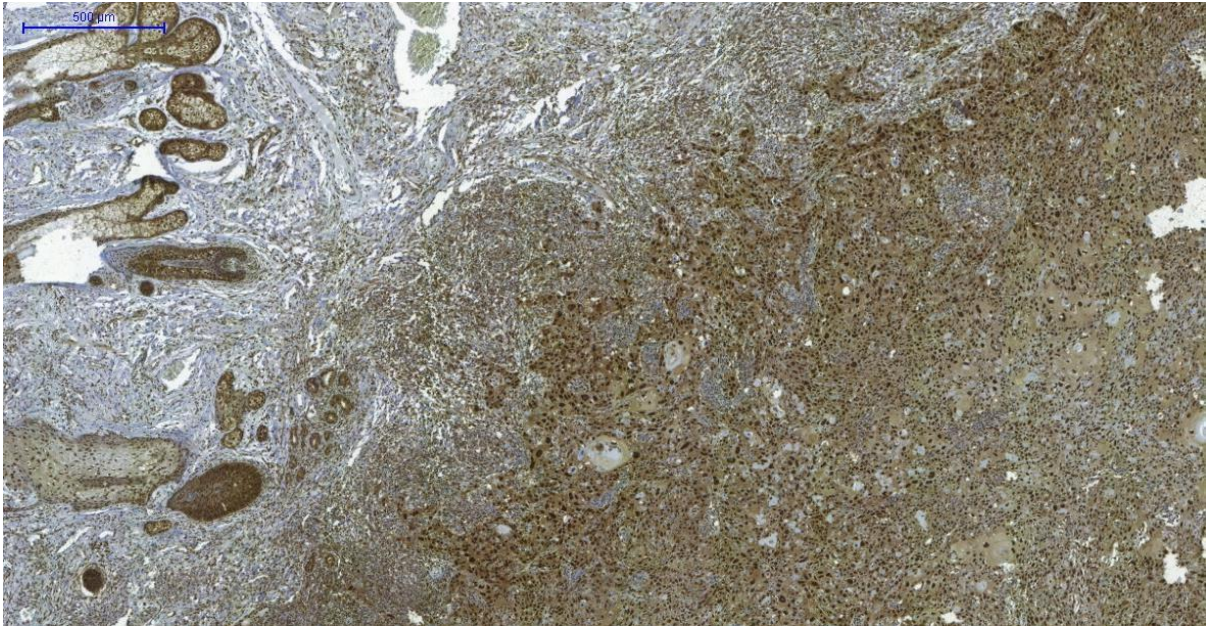
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 14- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em QA (Pannoramic Viewer).



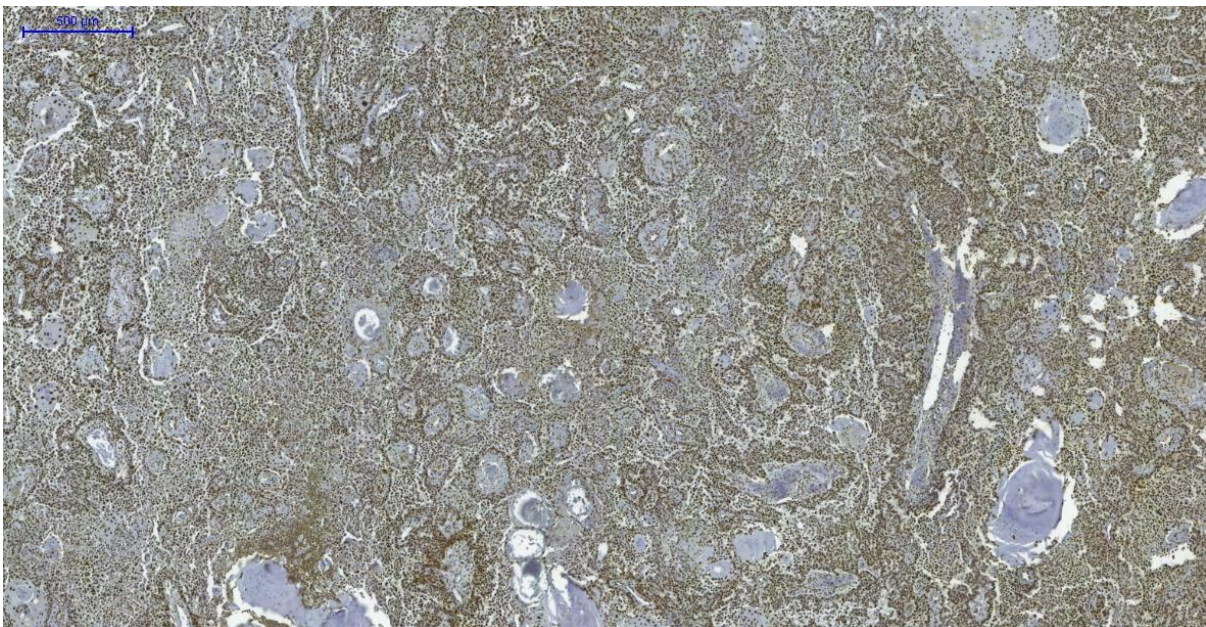
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 15- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ em CCELI (Pannoramic Viewer).



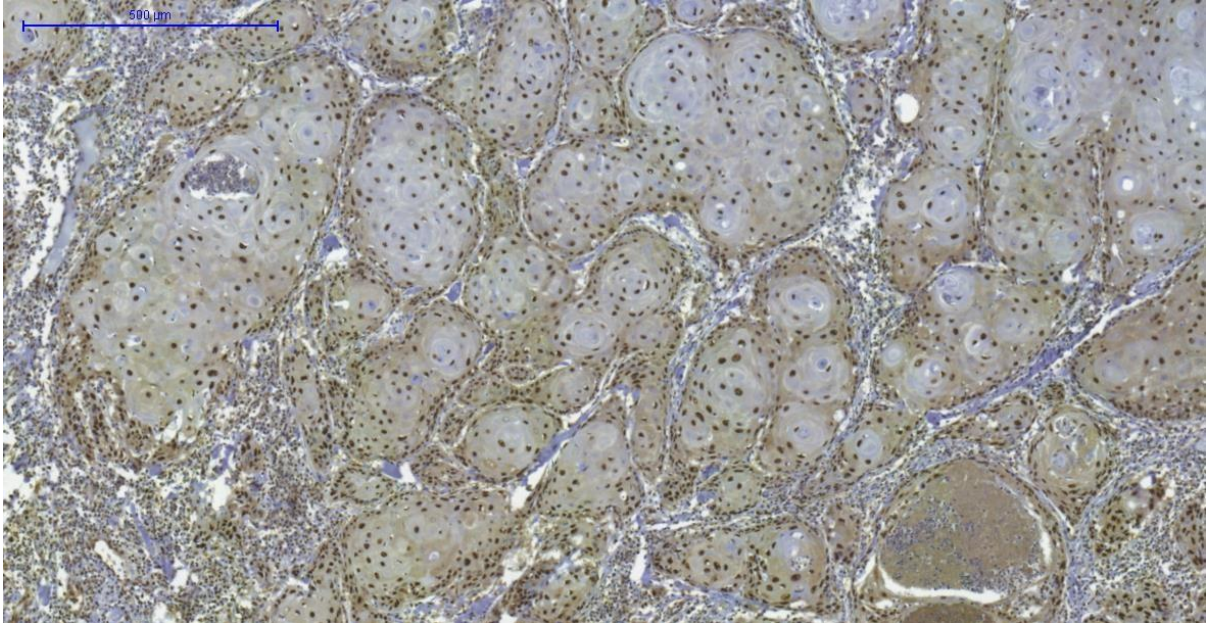
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 16- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ em CCELI (Pannoramic Viewer).



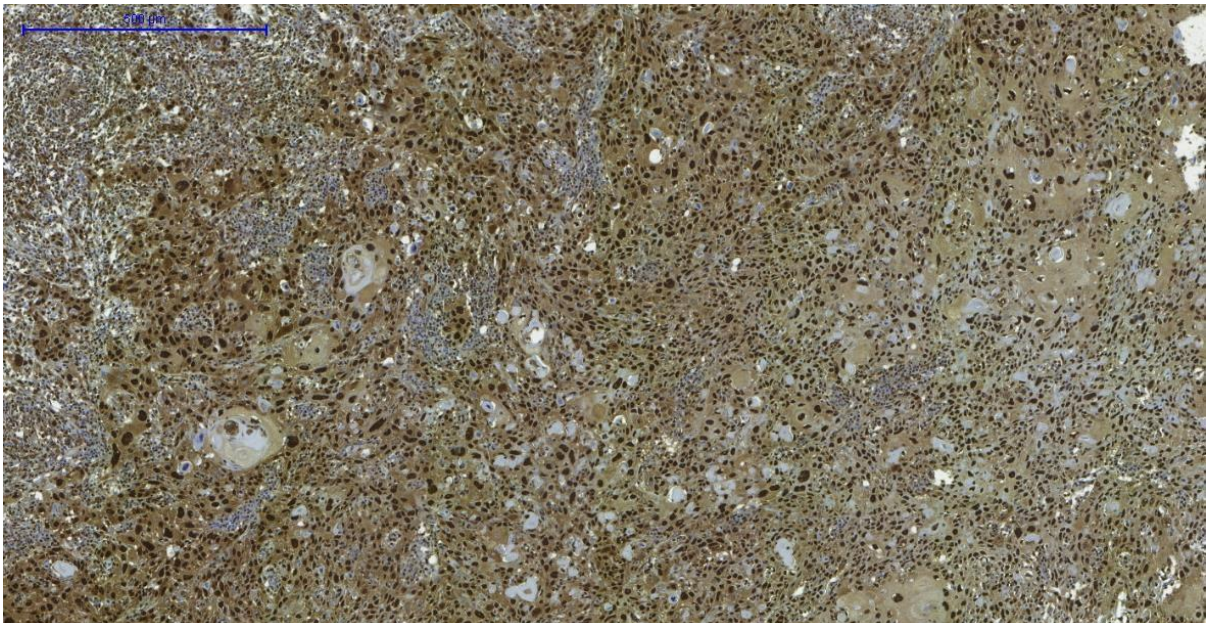
Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 17- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em CCELI (Pannoramic Viewer).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN.

Figura 18- Expressão imuno-histoquímica de Reg- γ citoplasmático e nuclear em CCELI (Pannoramic Viewer).



Fonte: Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral – UFRN

Discussão

6 DISCUSSÃO

O CCE é a neoplasia maligna mais comum em cavidade oral, representando cerca de 90% de todos os casos nesta localização, sendo o lábio inferior acometido em 21,7 a 24,7% dos casos relatados na literatura (BOTA; LYONS; CARROLL, 2017). Mesmo com os avanços nos tratamentos, mais de 50% dos pacientes foram a óbito dentro de 5 anos após o diagnóstico. Considerando a alta morbidade e mortalidade do CCE vários autores têm investigado critérios clínicos e morfológicos desta neoplasia, correlacionando-os com o prognóstico do tumor (VASCONCELOS et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; ALVES et al., 2017).

Considerando apenas o CCELI, a taxa de sobrevida é maior em comparação com outros CCEs. (MELLO et al., 2019). Embora a incidência de câncer de lábio seja baixa (1-2%), este é o tumor mais frequente da região oral, compreendendo 25-30% de todos os cânceres bucais. Na região de cabeça e pescoço, somente o câncer de pele é mais frequente que os CCELI (MARUCCIA et al., 2012)

Do ponto de vista epidemiológico, o CCELI é mais frequente em indivíduos do sexo masculino, entre a sexta e sétima décadas de vida, provavelmente por este grupo ser mais exposto, ao passar dos anos, aos fatores de risco, resultando em um acúmulo de alterações moleculares, devido ao uso do tabaco e exposição a outros carcinógenos, ou como parte do processo de envelhecimento biológico que se demonstrou estar ligado ao acúmulo de danos no DNA (MARUCCIA et al., 2012). Acomete preferencialmente indivíduos de pele clara, especialmente aqueles que têm histórico de exposição solar crônica, tais como pescadores e agricultores (COSTA et al 2005; OLIVEIRA et al 2006; HASSON 2008; AL-RAWI, TALABANI, 2008; VIEIRA et al., 2012; PIRES et al., 2014; BIASOLI et al., 2016).

Os resultados deste estudo corroboram os achados da literatura, sugerindo que o câncer de lábio no Brasil segue as tendências observadas em outros países. Verificou-se que os pacientes com CCELI apresentaram predomínio no seguinte perfil clínico-epidemiológico: sexo masculino, idade superior a 50 anos, cor da pele parda, com histórico de tabagismo e elevado nível de exposição solar, fato verificado pela alta proporção de agricultores. Os aspectos clínicos observados foram ausência de metástase e baixo índice de óbitos. (MAROCCHIO et al., 2010; KHAMMISSA et al., 2014).

A exposição crônica à radiação UV está relacionada com o surgimento de carcinomas em lábio inferior, sendo vinte vezes mais prevalente em relação ao lábio superior. (VIEIRA et al., 2012; BATISTA et al 2010). Essa predileção do CCE para o lábio inferior (80- 95%) em

comparação com o lábio superior (2-12%) se dá devido o lábio inferior, ser exposto mais intensamente e diretamente pela luz solar (GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2012; VIEIRA et al., 2012; BATISTA et al 2010).

Os principais parâmetros clínicos relacionados à sobrevida dos pacientes para o CCELI são: estadiamento clínico (TNM), grau histológico de malignidade, metástase e recidiva (SILVEIRA et al., 2007; EDGE; COMPTON, 2010; AKHTER et al., 2011; ALMEIDA et al., 2011; SOUZA et al., 2011). Neste estudo, verificou-se predominância de estágio T2 em 56,7% dos casos, o que indicava que a maioria dos tumores média entre 2 e 4 cm. Além disto, foi confirmada a presença de metástase linfonodal no momento do diagnóstico em apenas 16,7% dos pacientes. Isto pode ser justificado pelo fato de que as lesões no lábio são rapidamente detectadas pelo autoexame em comparação com as lesões intraorais, o que também permite diagnóstico precoce e melhor prognóstico (ALVES et al., 2017).

Para o estudo morfológico optamos por utilizar o sistema de gradação histopatológica de malignidade preconizado por Bryne et al. (1998) que atribui escores aos parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório. Encontramos em nosso estudo uma maior ocorrência de lesões classificadas como baixo grau de malignidade (60%), o que pode explicar a menor incidência de metástase cervical nestes tumores e o seu melhor prognóstico. Alves et al. (2017) confirmaram em seu estudo que os CCELI tem uma menor agressividade que os canceres intra-orais.

Frequentemente, lesões potencialmente malignas do lábio precedem o CCELI, a QA é uma delas. Caracterizada por graus variáveis de alterações no revestimento epitelial, causadas principalmente pela exposição prolongada e crônica à luz solar (MELLO et al., 2019). Verificou-se, no presente trabalho, que os pacientes com QA apresentaram prevalência no seguinte perfil clínico-epidemiológico: sexo masculino, idade entre a quinta e sexta décadas de vida, cor branca e com histórico de exposição solar crônica, corroborando os dados descritos na maioria dos estudos (CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; PIÑERA-MARQUES et al., 2010; MARTINS-FILHO; SILVA; PIVA, 2011; LUCENA et al., 2012; SARMENTO et al., 2014; LOPES et al., 2015).

As atividades profissionais relatadas pela maioria dos pacientes desta pesquisa estava relacionada à exposição solar, sendo este o principal fator etiológico para o desenvolvimento das QAs, conforme relatado nos estudos de MARTINS-FILHO; SILVA; PIVA, 2011; SARMENTO et al., 2014 e LOPES et al., 2015. O principal fator etiológico associado a QA é a exposição prolongada aos raios UV, sem proteção. Portanto, trabalhadores ao ar livre, como pescadores e agricultores, submetidos a longos períodos de exposição solar são vulneráveis ao

desenvolvimento de QA (MELLO et al., 2019).

Sabendo-se que a QA representa uma lesão com potencial de transformação maligna, para a análise morfológica dessas lesões, foram adotados os critérios arquiteturais e citológicos preconizados pela OMS, e verificou-se maior incidência de displasias leves. Nos estudos de Sarmiento et al. (2014) e Oliveira-Alves et al. (2014), prevaleceu o diagnóstico de displasia leve. Em contrapartida no estudo de Markopoulos- Albanidou-Farmaki e Kayavisi (2004) apenas 27,7% dos pacientes apresentaram quadro de displasias leves, enquanto o restante dos casos (72,3%) exibiu displasias moderadas e severas.

REG γ (também conhecido como PA28 γ e PSME3) é um membro da família 11S de ativadores de proteassoma e foi demonstrado que promove a degradação de várias proteínas reguladoras importantes, incluindo o inibidor de quinase dependente de ciclina p21 (CHEN et al., 2007; LI et al., 2007). Proteassomas são grandes complexos proteolíticos encontrados em todas as células eucarióticas, que destroem proteínas danificadas, bem como proteínas reguladoras críticas que controlam processos celulares fundamentais, como a progressão do ciclo celular, transcrição e sinalização celular. São compostos de um núcleo catalítico 20S e uma partícula reguladora, que pode ser a partícula reguladora 19S ou um membro da família REG (11S) (ZHANG et al., 2012).

É uma proteína multifuncional que está envolvida na degradação de importantes proteínas reguladoras, como SRC-3, PTTG1 e inibidores de quinase dependentes de ciclina p21 /16/19 de uma forma independente de ubiquitina e ATP, e tem sido implicado na regulação da progressão do ciclo celular (LI et al., 2007, CHEN et al., 2007, YING et al., 2006, SHI et al., 2015). Foi demonstrado, no estudo de Barton et al. (2004) que camundongos deficientes em Reg γ exibiam retardo de crescimento. Vários alvos do Reg γ foram identificados nos últimos anos, sugerindo que ele desempenha um papel importante na angiogênese, doenças infecciosas e envelhecimento precoce (DONG et al., 2013; LIU et al., 2014, YAN et al., 2014).

Dos 30 casos de QA analisados nesta pesquisa, houve predomínio do escore 4 para a imunexpressão do Reg- γ , tanto em nível citoplasmático, quanto em nível nuclear. Ainda analisando os casos de QA quanto à marcação imuno-histoquímica e suas diferenças com os graus de displasia epitelial, não foi possível encontrar relações estatisticamente significativas. Nos espécimes de CCELI, o Reg- γ apresentou imunexpressão citoplasmática em todos os casos, com maior frequência do escore 4, assim como marcação nuclear em todos os casos. Muito embora, demonstrou não haver relações estatisticamente significativas entre os escores de imunexpressão (citoplasmática e nuclear) do Reg- γ e os parâmetros clinicopatológicos analisados (estadiamento clínico, tamanho do tumor, metástase nodal e grau histopatológico de

malignidade).

Dessa forma, verificamos nesta pesquisa, uma superexpressão do REG γ em quase 100% das lesões de QA e CCELI, corroborando os achados relatados na literatura que falam a respeito da superexpressão do REG γ em diversos tipos de tumores, sugerindo ter um papel potencial na tumorigênese (WANG et al., 2011 , Ali et al., 2012; CHAI et al., 2014; LI et al., 2015). Estudos descobriram que o REG γ pode facilitar o turnover do p53 supressor de tumor promovendo a ubiquitinação mediada por p53 e MDM2 (HE et al., 2012; ZHANG e ZHANG, 2008) além disso, poderia estar participando da apoptose dependente do p53. (MAGNI et al., 2014).

Segundo Ali et al. (2012) as análises imunohistoquímicas em seu estudo, mostram uma correlação positiva entre p53 mutante e REG γ nos tecidos de câncer de reto, gástrico, renal, ovário e cólon. Da mesma forma, as linhagens celulares de câncer de mama revelaram maior expressão de REG γ . É importante ressaltar que essas análises indicam que direcionar a via do proteassoma REG γ -20S para a terapia do câncer pode ser útil para tumores humanos.

Ainda em seu estudo, Ali et al. (2012) foram os primeiros constatar que a anomalia na sinalização supressora de tumor p53 desregula a via de proteassoma independente de ubiquitina mediada por REG γ / ATP durante a tumorigênese. Descobriu-se que REG γ promove a degradação de p53 atuando como coativador para promover a ubiquitinação de p53 mediada por MDM2. A depleção de REG γ demonstrou conduzir a níveis aumentados de proteína p53 em várias linhas celulares de câncer. Seu estudo fornece um modelo anteriormente desconhecido, no qual existe um ciclo de realimentação autoregulatório entre a p53 e o REG γ . Acredita-se que quando a p53 é elevada para desencadear suas funções biológicas, como a apoptose, a atividade da via REG γ -proteassoma será inibida para evitar a degradação da p53 e os efeitos proliferativos da célula.

O Estudo de Li et al. (2015) investigou a associação entre o REG γ e o prognóstico do carcinoma epidermóide de boca. O nível de expressão da proteína foi avaliado por imunohistoquímica em um total de 368 pacientes com CCE. Seus resultados indicaram que o REG γ pode contribuir para o desenvolvimento de uma forma mais agressiva de carcinoma oral. Sua expressão correlaciona-se negativamente com a sobrevida do paciente.

Chai et al. (2014) , em seu estudo através de análises imuno-histoquímica, avaliaram a expressão de REG γ em amostras de câncer de mama de camundongos e humanos e mostraram que todos os tumores metastáticos de pulmão de camundongos eram positivos para REG γ . A maioria dos tumores metastáticos apresentava níveis elevados de sua expressão. No presente estudo não houve relação estatisticamente significativo entre REG γ e a presença de metástase,

porém, este fato pode ser explicado, pelo número reduzido de casos de CCELI metastático neste estudo.

Liu et al. (2010), relataram que REG γ pode aumentar a exportação nuclear de p53 facilitando sua monoubiquidação em vários locais, diminuindo sua concentração no compartimento nuclear onde a p53 ativa exerce sua atividade transcricional. Em seu estudo, utilizando um modelo de xenoenxerto de camundongos, mostraram que o knockdown de REG γ resulta em uma redução significativa do crescimento do tumor, sugerindo um papel importante para esta proteína no desenvolvimento do tumor. Demonstrando, portanto, que a inativação da p53 mediada pelo REG γ , é um dos mecanismos envolvidos na progressão do câncer,

A invasão tumoral e a formação de metástases envolvem uma série de etapas, incluindo degradação proteolítica da membrana basal e da matriz extracelular, alterações na adesão celular e movimentação das células tumorais nos tecidos. Em particular, tem sido sugerido que a redução da adesão celular mediada pelos complexos β -catenina/E-caderina está associada ao desenvolvimento e progressão dos CCEs da cabeça e pescoço (FREITAS et al. 2010; ZARGARAN et al. 2018).

Neste estudo, a análise da imunexpressão da β -catenina nas QAs mostrou que os casos de displasias moderadas ou severas apresentaram maiores escores de expressão citoplasmática de β -catenina que em displasias leves. Assim como, a expressão nuclear da β -catenina, foi superior nas displasias moderadas e severas em comparação às displasias leves.

Levando em consideração o papel da β -catenina, e as suas diferentes funções dependendo da sua localização, os resultados deste estudo corroboram os achados contidos na literatura. A β -catenina quando localizada na membrana citoplasmática participa na adesão célula-célula e manutenção da arquitetura tecidual. Podemos inferir, portanto, que, há uma maior expressão membranar da β -catenina nas displasias leves devido o epitélio se manter ainda muito próximo da sua organização normal, bem como a expressão de moléculas de adesão célula-célula (MIGUEL et al. 2004; AZEVEDO et al. , 2010 ; LE BRAS, et al. 2011; HE, et al. 2012; RAJARAJAN, et al. 2012; LU et al. 2013).

A β -catenina citoplasmática é essencial para a transdução de sinal da membrana para o núcleo. A não degradação de β -catenina, gera um acúmulo da mesma no citoplasma , fazendo-a funcionar como um fator de transcrição. A ativação dos mecanismos de degradação da β -catenina no citoplasma depende do status da via de sinalização Wnt canônica. Na ausência de sinalização Wnt, a β -catenina citoplasmática é constantemente degradada por um complexo

multiproteico. A degradação da β -catenina impede que ela atinja o núcleo e atue como fator de transcrição para seus genes-alvo, ciclina D1, c-myc, metaloproteinase 7 (MMP7) e MMP26, envolvendo-se assim no processo de proliferação celular (MIGUEL et al. 2004; LE BRAS, et al. 2011; HE, et al. 2012; RAJARAJAN, et al. 2012; LU et al. 2013 ; GONZALEZ- MOLES et al., 2014).

Ainda em nosso estudo, os CCELI de baixo grau de malignidade apresentaram maior expressão membranar de β -catenina do que os tumores de alto grau. Porém, os demais parâmetros clinicopatológicos (estadiamento clínico, tamanho do tumor e metástase nodal) dos CCELI não apresentaram relações com a expressão membranar da referida proteína. No tocante à análise da β -catenina, também foram constatadas diferenças quanto ao tipo de lesão.

Nos CCELI, os escores de imunexpressão membranar da referida proteína foram inferiores aos encontrados nas QAs. A ausência ou redução da expressão da β -catenina na membrana de displasias severas, pode estar refletindo a diminuição da adesão intercelular, o que facilitaria a motilidade das células neoplásicas e consequente invasão do tumor (AZEVEDO et al. , 2010 ; MELO et al., 2019).

Este estudo não constatou correlações entre a imunexpressão de Reg- γ e β -catenina, considerando suas diferentes localizações celulares. Em contrapartida, Li, L et al. (2015) mostraram em seu estudo como a superexpressão de REG γ leva à carcinogênese da pele, avaliando a via de sinalização Wnt. Encontraram níveis mais elevados de β -catenina no tumor de pele de camundongos REG γ positivos que nos camundongos REG γ negativos, através da análise por *western blot* e análise imuno-histoquímica. Consistentemente, a expressão dos genes alvo da β -catenina, incluindo Ciclina D1 e c-Myc, foi aumentada na pele REG γ positivo, mas diminuiu ou não teve alteração nas células da pele REG γ negativo.

Dessa forma, os dados mostraram que a superexpressão do REG γ ativa a via de sinalização Wnt / β -catenina, levando a um aumento na expressão de CyclinD1 e c-Myc, aumentando assim a progressão tumoral. Por outro lado, a deleção de REG γ , bloqueia a sinalização Wnt / β -catenina, atenuando a formação tumoral. Assim, o REG γ atua como uma molécula crítica que ativa a via Wnt / β -catenina durante a carcinogênese de pele (LI et al. 2015).

Em resumo, nosso estudo sugere que a β -catenina exerce um papel importante na agressividade das lesões de QA e CCELI, bem como no potencial de invasão dessas lesões. Quanto à expressão do REG γ , sugerimos que este, participe de fato da patogênese destas lesões. No entanto, a expressão dessa proteína não parece ser essencial no processo de transformação maligna, atuando em sinergia com outros fatores na carcinogênese. Por fim, podemos inferir

que a ausência de correlação entre a expressão das proteínas estudadas, sugere que a expressão de β -catenina não seja influenciada diretamente pelos níveis de expressão de REG γ .

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Tantas as QAs quanto os CCELIIs expressaram a proteína Reg- γ porém não verificamos significância estatística entre a sua expressão e o grau displasia epitelial, bem como, não houve relações estatisticamente significativas entre a imunexpressão (citoplasmática e nuclear) do REG- γ e os parâmetros clinicopatológicos analisados (estadiamento clínico, tamanho do tumor, metástase nodal e grau histopatológico de malignidade) nos CCELIIs. Dessa forma, os resultados do presente estudo sugerem que o REG- γ não têm relação com a agressividade das lesões estudadas. No entanto, a alta expressão observada nessas lesões sugere que esta proteína está envolvida no processo da carcinogênese labial.
2. Tantas as QAs quanto os CCELIIs expressaram a proteína β -catenina, sendo evidenciado um aumento da expressão citoplasmática e nuclear nos casos de Displasias moderadas e severas em comparação com as Displasias leves. Nos CCELIIs a imunexpressão membranar de β -catenina foi maior nos casos de baixo grau em comparação aos de alto grau de malignidade que apresentaram uma maior imunexpressão citoplasmática. Este fato sugere que a redução na expressão membranar de beta-catenina pode ser um evento importante na carcinogênese labial.
3. A ausência de correlação entre as imunexpressões de beta-catenina e REG- γ sugere que, na carcinogênese labial, este regulador de proteassomo não seja capaz de influenciar a expressão dessa importante molécula envolvida na adesão celular e na transdução de sinais.



Referências

REFERÊNCIAS

- AGRA, I. M. G. et al. Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 134, n. 7, p. 743-749, 2008.
- AKHTER, M. et al. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. **J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v. 15, n. 2, p. 168-176, 2011.
- ALAMOUD, K. A.; KUKURUZINSKA, M. A. Emerging insights into Wnt/ β -catenin signaling in head and neck cancer. **J. Dent. Res.**, v. 97, n. 6, p. 665-673, 2018.
- ALI, A. et al. Differential regulation of the REG γ -proteasome pathway by p53/TGF- β signalling and mutant p53 in cancer cells. **Nat. Commun.**, v. 4, p. 2667, 2013.
- ALMEIDA, F. C. S. D. et al. Fatores prognósticos no câncer de boca. **Rev. Bras Ciênc. Saúde**, v. 15, n. 4, p. 471-478, 2011
- AL-RAWI, N. H.; TALABANI, N. G. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: a case series analysis of clinical presentation and histological grading of 1,425 cases from Iraq. **Clin. Oral Invest.**, v. 12, n. 1, p. 15-18, 2008.
- ALVES, Alessandro Menna et al. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma from a service-based population. **Braz. Dent. J.**, v. 28, n. 3, p. 301-306, 2017.
- AMTHA, R. et al. Dietary patterns and risk of oral cancer: a factor analysis study of a population in Jakarta, Indonesia. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 8, p. e49-53, 2009
- BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.109, n. 3, p. e74-9, 2010.
- BIASOLI, E.R. et al. Lip Cancer: A Clinicopathological study and treatment outcomes in a 25-Year Experience. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.74, n. 7, p. 1360-1367, 2016.
- BOTA, James P.; LYONS, Alexis B.; CARROLL, Bryan T. Squamous Cell Carcinoma of the Lip—A Review of Squamous Cell Carcinogenesis of the Mucosal and Cutaneous Junction. **Dermatologic Surgery**, v. 43, n. 4, p. 494-506, 2017.
- CÂMARA, P. R. et al. A comparative study using WHO and binary oral epithelial dysplasia grading systems in actinic cheilitis. **Oral Dis.**, v. 22, n. 6, p. 523-529, 2016.
- CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. Actinic cheilitis : clinical and histological features. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 3, p. 498-503, 2008.
- CHANG, Y.; CHU, T.-Y.; DING, D.-C. WNT/ β -Catenin signaling pathway regulates non-

- tumorigenesis of human embryonic stem cells co-cultured with human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 41913, 2017.
- CINTRA, J. S. et al. Queilite Actínica: Estudo epidemiológico entre trabalhadores rurais do município de Piracaia-SP. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.**, v. 67, n. 2, p. 118-121, 2013
- DONG, Shuxian et al. The REG γ proteasome regulates hepatic lipid metabolism through inhibition of autophagy. **Cell metab**, v. 18, n. 3, p. 380-391, 2013.
- DRIVALOS, A. et al. The role of the cell adhesion molecules (integrins/cadherins) in prostate cancer. **Int. Braz J. Urol.**, v. 37, n. 3, p. 302-306, 2011.
- EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 17, n. 6, p. 1471–1474, 2010
- EL-NAGGAR, L. et al. World Health Organization classification of tumours – pathology and genetics of head and neck tumours. 4. ed . IARC Press: Lyon, 2017. 347 p.
- FAN CHAI, Yan Liang et al. High expression of REG γ is associated with metastasis and poor prognosis of patients with breast cancer. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 11, p. 7834, 2014.
- FREITAS, R. A. et al. Correlation of β -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. **Acta Cir. Bras.**, v. 25, n. 6, p. 513-517, 2010.
- GÉRAUD, C. et al. Lip cancer: retrospective analysis of 181 cases. **JDDG.**, v. 10, n. 2, p. 121-127, 2012.
- GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. β -catenin in oral cancer: an update on current knowledge. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 9, p. 818-824, 2014.
- GUMBINER, B. M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 345-357, 1996.
- GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. et al. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 26, n. 9, p. 1116-1121, 2012.
- HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 6, p. 1259-62, 2008
- HE, C. et al. Expression of c-Myc and Fas correlates with perineural invasion of pancreatic cancer. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 5, n. 4, p. 339-346, 2012.
- JING, D.; KEHOE, D. E.; TZANAKAKIS, E. S. Expression of Reg family proteins in embryonic stem cells and its modulation by Wnt/ β -catenin signaling. **Stem. Cells Dev.**, v. 19, n. 9, p. 1307-1319, 2010.
- JUNG, Y.; MCCARTY, J. H. Band 4.1 proteins regulate integrin-dependent cell spreading. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 426, n. 4, p. 578-584, 2012.

- KAMMISSA, R. A. et al. Oral squamous cell carcinoma in a South African sample: Race/ethnicity, age, gender; and degree of histopathological differentiation. **J. Cancer Res. Ther.**, v. 10, n. 4, p. 908-914, 2014.
- LE BRAS, Grégoire F. et al. CD44 upregulation in E-cadherin-negative esophageal cancers results in cell invasion. **PLoS One.**, v. 6, n. 11, p. e27063, 2011.
- LI, Jing et al. Associations between proteasomal activator PA28 γ and outcome of oral squamous cell carcinoma: Evidence from cohort studies and functional analyses. **E.Bio. Medicine**, v. 2, n. 8, p. 851-858, 2015.
- LI, L. et al. REG γ is critical for skin carcinogenesis by modulating the Wnt/ β -catenin pathway. **Nat. Commun.**, v. 6, p. 6875, 2015.
- LOPES, M. L. D. et al. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 90, n. 4, p. 505-512, 2015.
- LU, H. et al. Expression and prognostic role of c-Myb as a novel cell cycle protein in esophageal squamous cell carcinoma. **Clin. Transl. Oncol.**, v. 15, n. 10, p. 796-801, 2013.
- LUCENA, E. E. S. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis.**, v. 18, n. 6, p. 575-9, 2012.
- MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis.**, v. 10, n. 4, p. 212-216, 2004.
- MARTINS-FILHO, P. R. S.; DA SILVA, L. C. F.; PIVA, M. R. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. **Int. J. Dermatol.**, v. 50, n. 9, p. 1109-1114, 2011.
- MARUCCIA, M. et al. Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. **Anticancer res.**, v. 32, n. 4, p. 1543-1546, 2012.
- MELLO, Fernanda-Weber et al. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil. **J. Clin. Exp. Dent.**, v. 11, n. 1, p. e62, 2019.
- MIGUEL, M. C. C.; AMORIM, R. F. B. Multifuncionalidade da beta-catenina e suas implicações na patologia. **Rev. Bras. Patol. Oral**, v. 3, n. 2, p. 57-61, 2004.
- NEVILLE, B. W. et al. Oral and Maxillofacial Pathology. 4 ed. Elsevier. 2016.
- OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A.R.; ZUCALOTA, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J. Bras. Patol. Med.**, v. 42, n. 5, p. 385-392, Out, 2006
- OYAMA, T. et al. A truncated β -catenin disrupts the interaction between E-cadherin and α -catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. **Cancer Res.**, v. 54, n. 23, p. 6282-6287, 1994.

- PILATI, S.F. et al. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. **Oral Dis.**, 23, p. 219-224, 2017.
- PIÑERA-MARQUES, K. et al. Actinic lesions in fishermen's lower lip: clinical cytopathological and histopathologic analysis. **Clinics**, v. 65, n. 4, p. 363-367, 2010.
- PIRES, F. et al. Oral squamous cell carcinoma : clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 21, n. 5, p. 460-467, 2013.
- PRGOMET, Z.; ANDERSSON, T.; LINDBERG, P.. Higher expression of WNT 5A protein in oral squamous cell carcinoma compared with dysplasia and oral mucosa with a normal appearance. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 125, n. 4, p. 237-246, 2017.
- RAJARAJAN, A. et al. CD44 expression in oro-pharyngeal carcinoma tissues and cell lines. **PloS One.**, v. 7, n. 1, p. e28776, 2012.
- RAM, R. et al. The Identification of Three Cancer Stem Cell Subpopulations within Moderately Differentiated Lip Squamous Cell Carcinoma. **Front. Surg.**, v. 4, p. 1-8, 2017.
- ROJAS, I. G. et al. Increased fibroblast density in actinic cheilitis: association with tryptase-positive mast cells, actinic elastosis and epithelial p53 and COX-2 expression. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 1, p. 27-33, 2012.
- ROJAS, M. R. et al. Increased nuclear β -catenin expression in oral potentially malignant lesions: a marker of epithelial dysplasia. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 20, n. 5, p. e540-546, 2015.
- ROSSOE, E. W. T. et al. Queilite actínica: avaliação comparativa estética e funcional entre as vermelhectomias clássica e em W-plastia. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86, n. 1, p. 65-73, 2011.
- SANTANA SARMENTO, D.J.S. et al. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **Int. J. Dermatol.**, v. 53, n. 4, 466-472, 2014.
- SANTOS, H. B. P. et al. Histopathological grading systems and their relationship with clinical parameters in lower lip squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, n. 5, p. 539-545, 2014.
- SARMENTO, D. J. S. et al. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **Int. J. Dermatol.**, v. 53, n. 4, p. 466-472, 2014.
- SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis.**, v. 15, n. 6, p. 388-399, 2009.
- SHI, Yuan et al. miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REG γ . **Cancer lett.**, v. 358, n. 1, p. 27-36, 2015.

- SILVEIRA, E. J. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376-83, 200
- SOUZA LUCENA, E.E.S. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis.**, v.18, n.6, p. 575-579, 2012.
- SOUZA, R. L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 16, n. 6, p. e757-62, 2011.
- VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, n. 1, p. 105-114, 2012.
- WANG, C. et al. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial–mesenchymal transition. **Histopathology**, v. 61, n. 1, p. 78-87, 2012.
- WILLIAMS, H. K. et al. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol.**, v. 27, n. 7, p. 308-317, 1998.
- XU, J. et al. The REG γ -proteasome forms a regulatory circuit with I κ B ϵ and NF κ B in experimental colitis. **Nat. Commun.**, v. 7, p. 10761, 2016.
- ZANNINI, L. et al. REG γ proteasome activator is involved in the maintenance of chromosomal stability. **Cell Cycle**, v. 7, n. 4, p. 504-512, 2008.
- ZARGARAN, M.; BAGHAEI, F.; MOGHIMBEIGI, A. Comparative study of β -catenin and CD 44 immunoexpression in oral lichen planus and squamous cell carcinoma. **Int. J. Dermatol.**, v. 57, n. 7, p. 794-798, 2018.



Apêndices

APÊNDICE A

Ficha para coleta de dados clínicopatológicos referentes aos casos de QA

Nº de Registro (Pesquisa): _____

Nº de Registro (Laboratório): _____

Idade: _____

Sexo: Masculino FemininoRaça: Branca Parda Negra Outra

Profissão: _____

Localização Anatômica: _____

Diagnóstico Histopatológico: _____

Gradação Histológica (OMS):

 Sem Displasia Leve Moderada Severa

Classificação de risco (KUJAN et al., 2006):

 Baixo Risco Alto Risco

Observações:

APÊNDICE B

Ficha de coleta de dados clinicopatológicos referentes aos CCELI

Nº de Registro (Pesquisa): _____

Nº de Registro (Prontuário): _____

Idade: _____

Sexo: () Masculino () Feminino

Raça: () Branca () Parda () Negra () Outra

Profissão: _____

Tabagismo: () Sim () Não

Etilismo: () Sim () Não

Localização Anatômica: _____

Aspecto Clínico: _____

Estadiamento Clínico: T_N_M_____

Excisão Cirúrgica: () Sim () Não Data: ___/___/___

Radioterapia: () Sim () Não Início: ___/___/___

Quimioterapia: () Sim () Não Início: ___/___/___

Nº do Bloco: _____

Biópsia: () Excisional () Incisional

Metástase Linfonodal: () Sim () Não Data: ___/___/___

Observações:

APÊNDICE D

Ficha para coleta de dados imuno-histoquímicos

Nº de Registro (Pesquisa): _____

Nº de Registro (Prontuário): _____

Tipo de Lesão: () QA () CCE

Anticorpo: () β -catenina () REG- γ

Escore de imunomarcção:

Membrana: 0 (0%) 1 (1-25%) 2 (26-50%) 3 (51-75%) 4 (>75%)**Citoplasma:** 0 (0%) 1 (1-25%) 2 (26-50%) 3 (51-75%) 4 (>75%)**Núcleo:** 0 (0%) 1 (1-25%) 2 (26-50%) 3 (51-75%) 4 (>75%)

APÊNDICE E
TCLE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa “Estudo da imunexpressão do reg-gamma e da beta catenina em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior”, coordenado pelo Prof. Dr. Leão Pereira Pinto. Sua participação é voluntária, o que significa que o(a) senhor(a) poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Essa pesquisa procura analisar a expressão de algumas proteínas envolvidas na no crescimento do tumor, no material da biópsia que foi retirada da sua boca e está guardado no Departamento de Odontologia. O objetivo dessa pesquisa é compreender como essas substâncias funcionam no organismo.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será revelado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar o seu nome. Ninguém vai saber que você participou da pesquisa.

A pesquisa será desenvolvida a partir de dados coletados das fichas de requisição de biópsia (local da biópsia, tempo da lesão, aspecto, sintomas) e do material da biópsia que você já fez à época do seu atendimento. Não vai ser feito nenhum tratamento, pois você já foi tratado da lesão. O risco da sua participação é mínimo e nenhum procedimento clínico vai ser realizado para o desenvolvimento da pesquisa. Todos os cuidados vão ser tomados com a manipulação da sua ficha e com o material da sua biópsia. Apenas as pessoas da equipe da pesquisa terão acesso a esses materiais.

Os benefícios esperados com a realização desse estudo podem não ser diretamente aplicados para você, mas certamente poderão contribuir para ampliar os conhecimentos a respeito do papel das proteínas no câncer de boca, ajudando no tratamento e na prevenção da doença em outros pacientes.

Se você ou o seu acompanhante tiverem alguns gastos pela sua participação nessa pesquisa, eles serão assumidos pelo pesquisador e reembolsado para vocês. Se você sofrer qualquer dano decorrente desta pesquisa, sendo ele imediato ou tardio, previsto ou não, você será indenizado.

(Rubrica do Participante)

(Rubrica do Pesquisador)

Durante todo o período da pesquisa você poderá tirar suas dúvidas ligando para (Leão Pereira Pinto -Departamento de Odontologia da UFRN-Av Senador Salgado Filho 1787 Lagoa Nova-Natal/RN, no telefone (84) 32154138 ou pelo e-mail: lp.pinto@hotmail.com).

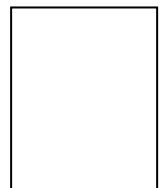
Qualquer dúvida sobre a ética dessa pesquisa você deverá ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa – instituição que avalia a ética das pesquisas antes que elas comecem e fornece proteção aos participantes das mesmas – da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, nos telefones (84) 3215-3135 / (84) 9.9193.6266, através do e-mail cepufnr@reitoria.ufrn.br ou pelo formulário de contato do site www.cep.propesq.ufrn.br . Você ainda pode ir pessoalmente à sede do CEP, de segunda a sexta, das 08:00h às 12:00h e das 14:00h às 18:00h, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Central. Lagoa Nova. Natal/RN. CEP 59078-970

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará pra mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa: “Estudo da imunexpressão do reg-gamma e da beta catenina em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior” e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Natal, ____/____/____

Assinatura do paciente



DECLARAÇÃO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Como pesquisador responsável pela “Estudo da imunexpressão da Beta-catenina e do Reg-gama em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior”, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante deste estudo, assim como manter a confidencialidade e sigilo sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringido as normas e diretrizes propostas pelas Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS que regulamenta pesquisas envolvendo seres humanos.

Natal, ____/____/____

(Rubrica do Participante)

Prof. Dr. Leão Pereira Pinto

Pesquisador Responsável

Av. Sen. Salgado Filho, nº 1787, Lagoa Nova, Natal/RN, CEP: 59056-000



Anexo

ANEXO 1

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DO REG-GAMMA E DA BETA CATENINA EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR

Pesquisador: Leão Pereira Pinto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 94023018.5.0000.5537

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Patologia Oral

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.947.524

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Projeto de pesquisa de Mestrado do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), que busca investigar a expressão imuno-histoquímica das proteínas -catenina e Reg em CCEs de lábio inferior e QAs e, desse modo, tentar fornecer informações adicionais sobre a carcinogênese de lábio inferior. Será executado a partir de fichas clínicas de requisição de biópsia e de espécimes teciduais, emblocados em parafina, diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Serão coletados endereços e telefones dos prováveis participantes a partir dos dados constantes nas fichas de requisição de biópsia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Investigar a expressão imuno-histoquímica das proteínas -catenina e Reg em CCEs de lábio inferior e QAs e, desse modo, tentar fornecer informações adicionais sobre a carcinogênese de lábio inferior.

Objetivos específicos

- Classificar os casos em QAs de baixo e alto risco, segundo metodologia sugerida por Kujan et al;

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

CEP: 59.078-970

Telefone: (84)3215-3135

E-mail: cepufm@reitoria.ufrn.br

**UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA**



Continuação do Parecer: 2.047.524

- Realizar o estudo morfológico dos casos de CCELI, classificando-os segundo os critérios estabelecidos por Bryne et al. (1992) e adaptados por Silveira et al. (2007), em baixo e alto grau de malignidade;
- Verificar se há diferença na expressão de -catenina e Reg em QAs com variados graus de displasia epitelial;
- Avaliar a imunexpressão das proteínas -catenina e Reg em CCELI, e sua relação com os aspectos clinicopatológicos, como a presença e ausência de metástase em linfonodos regionais, estadiamento clínico TNM e gradação histológica de malignidade;
- Verificar se há diferenças na expressão de ambas as proteínas entre as lesões;
- Investigar possíveis associações e correlações na imunexpressão das proteínas -catenina e Reg nas QAs e CCELIs, no intuito de melhor compreender a contribuição dessas proteínas na progressão das lesões estudadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

> Riscos

O risco é mínimo, nenhum procedimento clínico vai ser realizado com a finalidade da pesquisa. Todos os cuidados vão ser tomados com a manipulação da sua ficha e com o material da sua biópsia. Apenas as pessoas da equipe da pesquisa terão acesso a esses materiais.

> Benefícios

Os benefícios esperados com a realização desse estudo podem não ser diretamente aplicados ao paciente, mas certamente poderão contribuir para ampliar os conhecimentos a respeito do papel das proteínas nas doenças da boca.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa trará conhecimentos sobre o possível papel de proteínas moduladoras das QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Ver campo conclusões do Parecer.

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-970

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

E-mail: cepufrn@reitoria.ufrn.br

**UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA**



Continuação do Parecer: 2.947.524

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a análise ética do projeto, algumas pendências foram elencadas:

- Em relação do documento TCLE:

Pendência 1:

a) Refazer a coerência de forma clara e compreensível. Por exemplo: "...expressão de algumas proteínas de adesão celular envolvidas na progressão tumoral...";

Pendência atendida.

Pendência 2:

b) Não utilizar termos técnicos;

Pendência atendida.

Pendência 3:

c) Ausência da descrição dos benefícios da pesquisa;

Pendência atendida.

Pendência 4

d) Ausência do local que o participante deverá assinar;

e) Campo para rubrica do participante e do pesquisador deverá ser inserido no final de todas as páginas;

Pendência atendida.

Pendência 5

f) Incluir paginação. Ex.: Se o documento tiver 3 páginas, numerar da seguinte forma: 1 de 3, 2 de 3, 3 de 3;

Pendência atendida.

O CEP Central/UFRN considera que o pesquisador respondeu a contento todas as pendências. O protocolo de pesquisa está aprovado. Oportunamente, lembramos ao pesquisador que é obrigatório o envio dos relatórios parcial e final da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde - CNS e Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP é da responsabilidade do pesquisador responsável:

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-070

E-mail: cepufm@reitoria.ufm.br

**UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA**



Continuação do Parecer: 2.047.524

1. elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinatura estar na mesma folha (Res. 466/12 - CNS, item IV.5d);
2. desenvolver o projeto conforme o delineado (Res. 466/12 - CNS, item XI.2c);
3. apresentar ao CEP eventuais emendas ou extensões com justificativa (Manual Operacional para Comitês de Ética - CONEP, Brasília - 2007, p. 41);
4. descontinuar o estudo somente após análise e manifestação, por parte do Sistema CEP/CONEP/CNS/MS que o aprovou, das razões dessa descontinuidade, a não ser em casos de justificada urgência em benefício de seus participantes (Res. 446/12 - CNS, item III.2u) ;
5. elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais (Res. 446/12 - CNS, item XI.2d);
6. manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa (Res. 446/12 - CNS, item XI.2f);
7. encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto (Res. 446/12 - CNS, item XI.2g) e,
8. justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou não publicação dos resultados (Res. 446/12 - CNS, item XI.2h).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES BÁSICAS_DO_PROJETO_1174812.pdf	05/09/2018 11:35:43		Aceito
Outros	CartadeRespostaPendencia.docx	05/09/2018 11:35:08	Leão Pereira Pinto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa_modificado.docx	29/08/2018 09:59:08	Leão Pereira Pinto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Agência	TCLE_modificado.docx	29/08/2018 09:57:58	Leão Pereira Pinto	Aceito
Outros	Formulario_CEP_UFRN.doc	09/07/2018 16:29:09	Leão Pereira Pinto	Aceito
Outros	Termo_de_Confidencialidade.docx	09/07/2018	Leão Pereira Pinto	Aceito

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

CEP: 59.078-070

UF: RN

Município: NATAL

Telefone: (84)3215-3135

E-mail: copufm@reitoria.ufrn.br

UFRN - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE - LAGOA NOVA



Continuação do Parecer: 2.947.524

Outros	Termo_de_Confidencialidade.docx	18:27:50	Leão Pereira Pinto	Aceito
Outros	Termo_de_concessao.doc	09/07/2018 18:27:18	Leão Pereira Pinto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_nao_inicio.doc	09/07/2018 18:19:52	Leão Pereira Pinto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia.doc	09/07/2018 18:19:11	Leão Pereira Pinto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	09/07/2018 18:15:58	Leão Pereira Pinto	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	09/07/2018 18:15:40	Leão Pereira Pinto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

NATAL, 08 de Outubro de 2018

Assinado por:
LÉLIA MARIA GUEDES QUEIROZ
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Senador Salgado Filho, 3000

Bairro: Lagoa Nova

UF: RN **Município:** NATAL

Telefone: (84)3215-3135

CEP: 59.078-970

E-mail: copufm@reitoria.ufrn.br