

LETÍCIA DRUMOND DE ABREU GUIMARÃES

**Análise do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) associado a via de
sinalização PI3K/AKT na carcinogênese oral**

São Paulo

2016

LETÍCIA DRUMOND DE ABREU GUIMARÃES

Análise do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) associado a via de sinalização PI3K/AKT na carcinogênese oral

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo

2016

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

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

Guimarães, Letícia Drumond de Abreu.

Análise do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) associado a via de sinalização PI3K/AKT na carcinogênese oral / Letícia Drumond de Abreu Guimarães ; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. -- São Paulo, 2016.

80 p. : fig., tab.; graf.; 30 cm.

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

Versão corrigida

1. Carcinoma de células escamosas 2. Carcinogênese bucal. 3. Leucoplasia bucal. 4. Oncogênes. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Guimarães LDA. Análise do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) associado a via de sinalização PI3K/AKT na carcinogênese oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:16/12/2016

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a).Norberto Nobuo Sugaya

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a).Marina Helena Cury Gallottine

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovada

Prof(a). Dr(a).Lilia Alves Rocha

Instituição: FMU Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho aos meus pais, Osmany e Mariluce, pelas palavras de conforto nas horas mais difíceis. Ao meu namorado, Leonardo, pela paciência e incentivo. E ao meu irmão, Gustavo, pelo exemplo.

AGRADECIMENTOS

À Deus que me deu força e capacidade para realização dos meus sonhos.

Aos meus pais pela dedicação, sem vocês não chegaria até aqui.

Ao meu namorado, por me incentivar sempre.

Ao meu irmão por ser meu exemplo.

À CNpQ pela bolsa de estudo.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia por permitir o acesso à instituição para a realização do estudo.

Ao Departamento de Patologia por me receber tão bem.

Ao meu orientador prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior pelo ensinamento e apoio durante minha trajetória. Obrigada pelo carinho!

À todos os professores do departamento, aprendi muito com vocês.

Ao aceite da banca, obrigada pelas considerações. Serão muito úteis para a minha conclusão.

Ao arquivo e ao laboratório de Patologia Cirúrgica, que me permitiu que este trabalho tivesse o valor agora observado.

Aos amigos da sala VIP, em especial Fabiana, Stephanie, Rubens, Dimitry, Bruno, Priscila e Fernanda, muito obrigada pela ajuda e do dia-a-dia mais divertido.

À Flávia e Marina por sempre tirarem minhas dúvidas em relação ao laboratório e por permitir a conclusão deste estudo.

Aos companheiros de almoço por estarem sempre presentes.

À todos amigos do departamento, pela amizade e por me dar força.

Aos companheiros de laboratório, Juvani, Elisa e Adriana, e aos colegas da secretaria, Fátima e Vinícius pela ajuda e apoio.

Às meninas que moram comigo, Selma, Érika e minha prima Raísa por sempre me apoiar e dar conforto.

À todos meus familiares que ficaram na torcida para mais esta conquista em minha vida.

RESUMO

Guimarães LDA. Análise do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) associado a via de sinalização PI3K/AKT na carcinogênese oral. São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia. Versão Corrigida.

O processo da carcinogênese é provocado por múltiplos estágios, envolvendo desordens potencialmente malignas, iniciação, invasão, progressão e metástase. O prognóstico do carcinoma epidermoide de boca (CEB) ainda permanece desfavorável devido ao diagnóstico tardio. Para mitigar esta complicação, biomarcadores tem sido utilizados para ajudar no diagnóstico precoce e entender melhor a influência sobre a carcinogênese oral, onde vias de sinalização são ativadas, principalmente a PI3K/AKT. MIF foi relacionada a progressão de diversos tipos cânceres, porém pouco se sabe seu papel na evolução do CEB. Por isso, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar através do padrão de expressão imuno-histoquímico proteínas participantes da via de sinalização de PI3K/AKT: AKT1 e PAKT e sua associação com a expressão de MIF em fragmento de mucosa, hiperqueratose sem e com displasia e CEB correlacionando com a progressão da doença e características clinico-demográficos. Foram utilizados 73 blocos de parafina, avaliados quanto à porcentagem da expressão de cada marcador e coletados os dados clínicos epidemiológicos referentes para correlaciona-los à imunomarcacão. A imunopositividade ocorreu nos casos de mucosa normal, sem e com displasia e CEB. Nos casos de mucosa normal foram positivos para PAKT (50%), AKT (60%), MIF (80%). Em sem displasia, foi observado imunomarcacão para PAKT (50%) e MIF (50%). Com displasia houve marcacão PAKT (81,81%) e MIF (81%). Nos espécimes de CEB ocorreu em PAKT(100%), AKT (95,23%) e MIF (90,5%). Todos os anticorpos tiveram alta expressão no CEB em comparacão com a mucosa normal ($p < 0,0001$), sem displasia ($p < 0,0001$) e com displasia ($p < 0,0001$). Observou-se também influencia sobre o fator de risco como tabagismo, etilismo e etnia, respectivamente para os grupos sem displasia, CEB e com displasia. Assim, estas proteínas podem ser consideradas potenciais marcadores preditores do CEB.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide. Carcinogênese. Leucoplasia bucal. Proteína Oncogênica v-akt, MIF.

ABSTRACT

Guimarães LDA. Analysis of migration inhibitory factor macrophage (MIF) signaling associated with PI3K / AKT in oral carcinogenesis. **Dissertation.** São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia;2016 Versão Corrigida.

The carcinogenesis process is caused by multiple stages, involving potentially malignant disorders, initiation, invasion, progression and metastasis. The prognosis of squamous cell carcinoma (CEB) remains unfavorable due to late diagnosis. To mitigate this complication, biomarkers have been used to aid in early diagnosis and better understand the influence on oral carcinogenesis, which are activated signaling pathways, particularly PI3K / AKT. MIF was related to progression of many types cancers, but its role in the evolution of CEB is little known. Therefore, the aim of this study was to identify and characterize by the expression pattern of immunohistochemical participants proteins signaling pathway PI3K / AKT: AKT1 and PAKT and its association with MIF expression in normal mucosa, hyperkeratosis with and without dysplasia and CEB correlating with the progression of the disease and clinical and demographic characteristics. 73 paraffin blocks were used, in which evaluated the percentage of expression of each marker and collected epidemiological clinical data to correlate them to immunostaining. The imunonopositividade occurred in cases of normal mucosa, hyperkeratosis with and without dysplasia. In cases of normal mucosa were positive for PAKT (50%), AKT (60%), MIF (80%). In no dysplasia, immunostaining was observed PAKT (50%) and MIF (50%). With dysplasia was marking PAKT (81.81%) and MIF (81%). In CEB specimens occurred in PAKT (100%), AKT (95.23%) and MIF (90.5%). All antibodies had high expression in the CEB compared to normal mucosa ($p < 0.0001$) without dysplasia ($p < 0.0001$), and dysplasia ($p < 0.0001$). It was also observed influence on the risk factors such as smoking, alcohol consumption and the ethnicity, respectively, for with dysplasia groups, CEB and without dysplasia. Thus, these proteins can be considered potential early diagnostic markers of CEB.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Carcinogenesis. Leukoplakia oral. Oncogene Protein v-akt, MIF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Esquema ilustrativo da ativação de MIF.....	32
Figura 2.2 - Esquema ilustrativo da via de sinalização PI3K/AKT.....	37
Quadro 4.1 - Avaliação da imuno-histoquímica	46
Figura 5.1 - Média e desvio padrão da porcentagem de marcação representada pelos escores de cada grupo do estudo. A) MIF no epitélio B) MIF na lâmina própria C) PAKT no epitélio D) PAKT na lâmina própria E) AKT no epitélio F) AKT na lâmina própria.....	51
Quadro 5.1 - Características da imunomarcação do anticorpo MIF.....	52
Quadro 5.2 - Características da imunomarcação do anticorpo PAKT.....	53
Figura 5.2 - Expressão imuno-histoquímica de MIF e PAKT entre os grupos.....	55
Figura 5.3 - Expressão imuno-histoquímica de AKT, PAKT e MIF no CEB.....	55
Figura 5.4 - Expressão imuno-histoquímica de AKT no fragmento de mucosa e CEB.....	55

Quadro 5.3 - Características da imunomarcação do anticorpo
AKT.....57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1 - Características dos anticorpos, da recuperação antigênica, do bloqueio de sítios inespecíficos e tempo de incubação e diluição dos anticorpos nos ensaios de imunohistoquímica.....45
- Tabela 5.1 - Características dos anticorpos, da recuperação antigênica, do bloqueio de sítios inespecíficos e tempo de incubação e diluição dos anticorpos nos ensaios de imunohistoquímica- 49
- Tabela 5.2 - Correlação da expressão dos anticorpos com dados clínico epidemiológico50
- Tabela 5.3 - Comparação da marcação imunohistoquímica entre os grupos fragmento de mucosa, sem displasia, com displasia e carcinoma epidermoide56
- Tabela 5.4 - Comparação da marcação imunohistoquímica entre os grupos sem displasia, com displasia e carcinoma epidermoide56
- Tabela 5.5 - Comparação da marcação imunohistoquímica entre os grupos sem displasia, com displasia e carcinoma epidermoide56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl2	Célula B de linfoma 2
CE	Célula endotelial
CEB	Carcinoma epidermoide de boca
COX-2	Ciclo-oxigenase2
CD74	<i>Cluster of Differentiation 74</i>
CD44	<i>Cluster of Differentiation 44</i>
CDK4	Ciclina Quinase Dependente 4
HIF-1	Fator de Transcrição indutível de Hipóxia
IHC	Imuno-histoquímica
IL-6	Interleucina-6
IL-2	Interleucina-2
IL-8	Interleucina-8
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	Fator inibitório da migração de macrófago
MMP	Matriz metaloproteinase
NF-KB	Fator nuclear kappa B
PI3K/Akt	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKB	Proteína quinase B
PH	Homologia Plectrina
P53	Tumor supressor protein 53
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
5-FU	5-fluorouracil

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Características do Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB)	25
2.2 Carcinogênese Oral – Desordens potencialmente malignas	26
2.3 Biomarcadores moleculares	29
2.3.1 Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF).....	29
2.3.2 Via de sinalização PI3k/AKT/mTOR	35
2.4 MIF e PI3K/AKT: Associação	38
3 PROPOSIÇÃO	41
3.1 Objetivo principal	41
3.2 Objetivos secundários	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 Local do Estudo	43
4.2 Seleção e coleta da Amostra	43
4.2.1 Critérios de Inclusão.....	43
4.2.2 Critérios de exclusão	43
4.3 Dados clínicos epidemiológico	44
4.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	44
4.5 Avaliação da expressão por Imuno-histoquímica (IHQ)	46
4.6 Análise Estatística.....	47
5 RESULTADOS	49
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de boca (CEB) representa 90% de todas as formas de câncer de cabeça e pescoço (1). A maioria é diagnosticada tardiamente diminuindo as chances de sobrevivência. O processo da carcinogênese é provocado por múltiplos estágios, envolvendo desordens potencialmente malignas, iniciação, invasão, progressão e metástase. (2).

O CEB, como a maioria das outras neoplasias malignas, consiste de uma população celular heterogênea de variado comportamento biológico e admite-se que parâmetros clínico-patológicos isolados não são suficientes para inferir as características e o comportamento biológico do tumor. O reconhecimento de diferentes perfis genéticos e moleculares pode permitir avaliar fatores de risco, diagnóstico precoce e comportamento clínico e biológico. Nesse contexto, torna-se necessária a identificação de biomarcadores moleculares significativos para ampliar os parâmetros atualmente utilizados no desenvolvimento de novos protocolos de diagnóstico, prognóstico e terapias (3)

Vários marcadores moleculares, utilizados isoladamente ou em combinação, têm sido reconhecidos como importantes na carcinogênese, progressão e prognóstico do CEB. Estas proteínas participam de vias de sinalização no ciclo celular, em supressão tumoral, estabilidade genômica, apoptose, angiogênese, e de proliferação celular. Dentre as vias ativadas, a via PI3K/AKT possui um importante papel na progressão do CEB (4).

Estudos recentes mostraram que uma citocina pró-inflamatória, denominada Fator Inibitório de Migração de Macrófago (MIF) ativa esta via, que induz a proliferação, não só em eventos neoplásicos, mas também no crescimento fisiológico (5). Em várias lesões potencialmente malignas e neoplasias malignas, tem sido relatado aumento da sua expressão correlacionando com mau prognóstico (6)

Embora vários estudos indiquem um papel importante desta proteína com a ativação da via no desenvolvimento de câncer, o mecanismo não é completamente compreendido no CEB e seu papel na carcinogênese oral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB)

O câncer tem um importante impacto na qualidade de vida dos doentes (7). De acordo com GLOBOCAN a estimativa para 2020 é de 285.460 homens e 267.581 mulheres. No Brasil, a incidência de câncer de boca varia ao longo do território nacional e no ano de 2016, representou a 7ª neoplasia mais frequente e as estimativas são de 11.280 casos entre os homens e 4.010 entre as mulheres, totalizando 15.290 novos casos para este ano.

Há evidências de alterações do perfil epidemiológico de câncer de boca, na última década, em todo o mundo, que apontam para o aumento do número de casos em adultos jovens. A doença, apesar disso, continua a acometer predominantemente indivíduos do sexo masculino e de idade avançada (8).

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento desse câncer são o tabagismo e o etilismo, de modo que a ação sinérgica desses dois fatores estabelece um fator de risco adicional. A infecção pelo papilomavírus humano (HPV-16) predominantemente nos casos de orofaringe tem se mostrado também um importante fator (9). Não há, contudo, evidência de sinergismo entre esta infecção e o consumo de tabaco e/ou álcool, o que sugere envolvimento de diferentes mecanismos na carcinogênese oral. Outros fatores de risco, como exposição à radiação solar, história pregressa familiar de neoplasia, condições socioeconômicas e dieta também são relatados (10).

O carcinoma epidermoide é o perfil histopatológico mais frequente, encontrado em cerca de 90% dos casos, especialmente em borda lateral da língua e assoalho da boca. Em contraste, o epitélio do dorso da língua raramente é acometido, e a explicação para essa proteção permanece desconhecida. Observam-se ainda diferentes particularidades histológicas em relação à topografia e à faixa etária. Um dos exemplos dessas particularidades o câncer de lábio inferior, que está associado à exposição à radiação solar (8).

O estágio do tumor é um importante parâmetro para a determinação da escolha do tratamento. Pacientes que se apresentam em estágio I ou II apresentam bom prognóstico e são tratados frequentemente com radioterapia ou cirurgia. Já os pacientes em estágios avançados, III ou IV, usualmente requerem a adição de quimioterapia no esquema terapêutico. Há, ainda, evidência de que o esvaziamento cervical eletivo esteja envolvido no melhor prognóstico nos casos sem acometimento de linfonodos cervical. Em todos os casos, no entanto, o acompanhamento clínico é fundamental devido à elevada possibilidade de recidiva (10).

Nos estágios iniciais, verifica-se com frequência a ausência de sintomas acompanhada ou não por linfonodomegalia cervical. Dessa forma, o diagnóstico do câncer de boca é comumente tardio e, como consequência, a maior parte dos pacientes é diagnosticada em estágios avançados (11).

Segundo o estudo de Rier et al. (12), a sobrevida geral em 5 anos do paciente com câncer de cabeça e pescoço é de 57%. Dentre as topografias dessa região, o câncer de língua apresentou o pior prognóstico com uma sobrevida mediana de 48 meses, seguido pelo câncer de gengivas.

Dentre vários fatores, o diagnóstico precoce e a idade reduzida no momento do diagnóstico são os mais importantes no impacto da sobrevida. Também há evidências de que o tratamento escolhido, a condição socioeconômica do paciente e o estado nutricional também interfiram (12).

2.2 Carcinogênese Oral – Desordens potencialmente malignas

A mortalidade, morbidade e o custo do tratamento associado com a doença aumenta proporcionalmente com atraso no diagnóstico (13). Uma grande maioria dos carcinomas epidermoide orais surgem a partir de lesões precursoras pré-malignas. A detecção precoce nesta fase resultaria na mitigação destas consequências indesejáveis (14).

Algumas lesões da mucosa oral são conhecidas como pré-cancerosa baseado em evidências de estudos longitudinais, nos quais áreas com alterações clínicas evoluíram para neoplasia maligna durante o “*follow-up*”. Algumas dessas alterações,

especialmente áreas vermelhas e brancas, são vistas nas margens de carcinoma epidermoide. Estas áreas podem apresentar mudanças morfológicas e citológicas observadas também na neoplasia maligna, porém sem invasão. Também exibem algumas alterações cromossômicas, genômica e molecular encontradas no câncer de boca. Os termos “pré-maligna”, “lesões precursoras”, “pré-cancerosa”, “neoplasia intra epitelial” e “potencialmente maligna” têm sido amplamente usada para descrever condições clínicas que podem evoluir para neoplasia maligna (15).

A classificação da WHO de tumores de cabeça e pescoço utilizou o termo: “lesões precursoras”. Em consenso, o termo foi trocado para “desordens potencialmente malignas”, mostrando que nem todas as lesões e condições descritas sob este termo podem se transformar em neoplasia maligna, pois algumas alterações morfológicas tem maior potencial de transformação maligna (15).

Desordens potencialmente malignas da mucosa oral também são indicadores de risco a prováveis lesões malignas futuras em outros locais, clinicamente sem alterações, e não apenas nos locais específicos das lesões (16)

A leucoplasia oral, uma das desordens potencialmente maligna com um elevado risco de transição para o carcinoma epidermoide de boca, é um termo clínico e não tem uma histologia específica. Clinicamente são reconhecidos dois tipos principais de leucoplasia, sendo um homogêneo e outro não homogêneo. A distinção destes é puramente clínica. Lesões homogêneas são uniformemente planas, finas, apresentam rachaduras rasas da superfície e de risco para transformação maligna relativamente baixo. Lesões não-homogêneas apresentam um risco para transformação maior; variedades não homogêneas são classificadas em: salpicado: carácter misto, branca e vermelha, mas predominantemente branca; nodular: pequenas excrescências polipoides; e verrucosa: superfície enrugada ou ondulada. No entanto, essas placas brancas e vermelhas tem risco mais elevado de tornarem-se malignas. Um diagnóstico provisório de leucoplasia é feito quando a lesão predominantemente branca ao exame clínico não pode ser diagnosticada como qualquer outra doença ou desordem da mucosa oral. Histologicamente as leucoplasias podem mostrar atrofia ou hiperplasia epitelial e pode ou não demonstrar displasia epitelial (15).

A displasia epitelial é marcada pela aberrante e descoordenada proliferação celular descrita basicamente ao nível celular (Atipia) (14). Deve-se notar que a displasia não tem característica clínica aparente e o termo não deve ser utilizado como descritor clínico da lesão (15).

Essa alteração ocorre em 25% de casos de leucoplasias e nesses, o potencial para a transformação maligna varia de 5% a 15% (15). A biópsia é mandatória e deve ser realizado o acompanhamento do caso, se nenhuma outra doença for confirmada, a lesão é caracterizada como leucoplasia sem ou com displasia (17).

Segundo Krishinan et al. (18) o sistema binário de classificação, alto risco e baixo risco de tornar-se maligno, provou ter uma melhor calibração inter e intra observadores em comparação com os dois outros sistemas, da OMS e Liubliana.

Apesar da presença de displasia epitelial ainda ser um indicador forte de transformação maligna (17), mais tentativas estão sendo feitas para identificar biomarcadores moleculares específicos para prever quais lesões têm o potencial de ser maligno (15).

Lima et al. (19) estudaram em amostras de casos de lesões displásicas e não displásicas e concluíram que o hábito de fumar não estava diretamente relacionado com a maior presença de displasia. No entanto, dentro do grupo de fumantes, um aumento do número de cigarros fumados por dia foi diretamente correlacionada com a frequência de células positiva para c-Jun, que é uma proteína que tem importante função no controle do ciclo celular.

Al-Dhoharah et al. (20) compararam a expressão de DKK3, que é um gene supressor de tumor, em pacientes com leucoplasia oral, fibrose submucosa oral e fragmento de mucosa. Em mucosa oral normal, DKK3 foi expressa na membrana de célula em camadas suprabasais e estava ausente na camada basal. Em leucoplasia oral, a porcentagem de expressão citoplasmática de DKK3 nos casos de displasia leve foi menor em comparação com displasia grave. Além disso, a coloração era localizada no citoplasma da camada basal. O mecanismo preciso pelo qual a expressão DKK3 desloca a partir da membrana celular para o citoplasma não é totalmente clara. Já nos casos de fibrose submucosa oral houve perda de expressão DKK3 em 50% dos casos. Concluíram que DKK3 é um indicador de diagnóstico auxiliar para avaliar a carcinogênese com base no grau de displasia.

Klobucar et al. (6) utilizaram proteínas (Iadinin-1 e MIF- CD44- integrina) que possuíram alto potencial na progressão do câncer de laringe e em metástase demonstrado através de estudo com amostra de câncer de laringe e de tecido normal adjacente.

Outro estudo realizado, mostrou alta expressão de pAKT e pmTOR durante a carcinogênese oral, exibindo diferença entre os grupos de lesões displásicas e de

carcinoma epidermoide quando comparados com lesões não displásicas. Concluindo que estas proteínas podem ser consideradas potencial marcador de diagnóstico para detecção do câncer de boca (6, 21)

Massarelli et al. (22) observaram que em lesões pré-neoplásicas a expressão citoplasmática de pAKT foi homoganeamente distribuída entre todas as camadas do epitélio e que esta marcação foi mais frequentemente expressa em graus leve e moderado de displasia em comparação com displasia grave. Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre outras características clínico-patológicas

Martins et al. (21) notaram que a marcação de pAKT foi negativa para lesões não displásicas, enquanto 62,2% das amostras do grupo de displasia exibiu positividade no citoplasma das células da camada basal e parabasal. E enquanto na amostra de carcinoma epidermoide de boca, 83,3% mostrou expressão tanto na porção periférica e em meio as ilhas tumorais.

2.3 Biomarcadores moleculares

2.3.1 Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF)

Em 1966, uma molécula produzida por linfócitos T que inibiu a migração aleatória de macrófagos foi descoberta, sendo denominado Fator Inibitório da Migração de Macrófagos (MIF) (23), de peso molecular 12,5 kDa (24). Foi um dos primeiros mediadores de citocinas descrito, codificada por um gene localizado no cromossomo 22q11.23. É uma linfoquina (um tipo de proteína que raramente é identificado por métodos de separação usuais de proteína) que está envolvida na imunorregulação e inflamação (25).

Sua estrutura é tridimensional e tem como receptor identificado por expressão, CD74 (26), que é a forma de superfície celular da MHC classe II cadeia invariante. A falta de motivos para ativação da segunda mensagem intracitoplasmática do domínio de CD74, em seguida, levado a estudos que estabelecem que a transdução de sinal requer o recrutamento e a ativação de uma proteína adicional, CD44 (27). Mais

recentemente, os receptores de quimiocinas CXC, CXCR4, CXCR2 foram também identificadas (28).

Conhecida como uma citocina pleiotrópica que amplamente é expressa em doenças inflamatórias, substitui a resposta imune mediada por supressão glicocorticoides e regula funções de macrófagos e linfócitos (29), mantendo assim um equilíbrio entre mecanismos pró-inflamatório e anti-inflamatório (30).

MIF tem sido proposto como um regulador central de processos inflamatórios, uma vez que possui múltiplas ações pró-inflamatórias diretas e indiretas. É diretamente pró-inflamatória por ativação ou por promover a expressão de citocinas (TNF α (31), IL-1b, IL-2[Bacher(32), IL-6 (31), IL-8, IFNC (33), liberação de óxido nítrico, expressão de matriz metaloproteinases (MMP), e a indução da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) (33). Além disso, é indiretamente pró-inflamatória, substituindo os efeitos dos glicocorticoides sobre sistema imune / inflamatório a ativação das células e liberação de citocinas pró-inflamatórias (34).

Foi inicialmente descrita em linfócitos e macrófagos. No entanto, a caracterização adicional desta citocina demonstrou que é expressa e armazenada em uma ampla variedade de células imunes e não imunes, não apenas macrófagos, linfócitos, mas também células epiteliais e endoteliais (35). Com base na capacidade da camada epitelial ser a primeira barreira mecânica e imunológica contra agentes patogênicos, a presença de MIF nestas células sugere que esta citocina desempenha um importante papel no início de defesa inata do hospedeiro (36).

Sua elevada expressão tem sido descrita em muitas patologias inflamatórias incluindo a síndrome de desconforto respiratório agudo, asma (37), fibrose pulmonar (38), choque séptico, artrite reumatoide, glomerulonefrite (39), sepse, artrite (40), arteriosclerose (41). Curiosamente, também é encontrada numa grande variedade de malignidades humanas: próstata, mama, cólon, cérebro, pele, e tumores derivados do pulmão (42).

A maioria destas doenças é tratada quer por eliminação genética ou por neutralização de MIF. Portanto, terapias anti-MIF despertaram o interesse clínico (40).

Apesar das evidências convincentes de que MIF é superexpressa em, e contribui para, a patologia de tantas doenças inflamatórias e malignas, os mecanismos que contribuem para a sua expressão exagerada são pouco descritos (43).

Uma característica comum da inflamação crônica e muitos tumores é o desenvolvimento de hipóxia de tecido local. Hipóxia pode ser definida como um estado

em que a demanda de oxigênio excede o fornecimento e, assim, em doenças inflamatórias pode ocorrer como resultado do dano microvascular. No caso da formação de tumores a demanda de oxigênio longe pode exceder a oferta devido à falta de fornecimento de sangue e as exigências extremas de tecido neoplásico. O mecanismo específico pelo qual a hipóxia ativa o promotor MIF humano continua a ser elucidado e é de grande importância na compreensão do controle genético da expressão do MIF nos tecidos (43).

As respostas adaptativas primárias à hipóxia são principalmente destinadas a restaurar o equilíbrio entre a demanda e suprimento de oxigênio, e são em grande parte dependente da ativação de HIF-1a (Fator de Transcrição Indutível de hipóxia). Estabilização de HIF-1a em hipóxia induz a expressão de genes que regulam a angiogênese, induz a vasodilatação, e promove uma mudança de oxigênio ao metabolismo glicolítico. Em respostas adaptativas normais estes caminhos são essenciais para permitir a recuperação dos tecidos. No caso de tumores sólidos e de inflamação crônica, no entanto, respostas mal adaptadas podem contribuir significativamente para a progressão da doença (43).

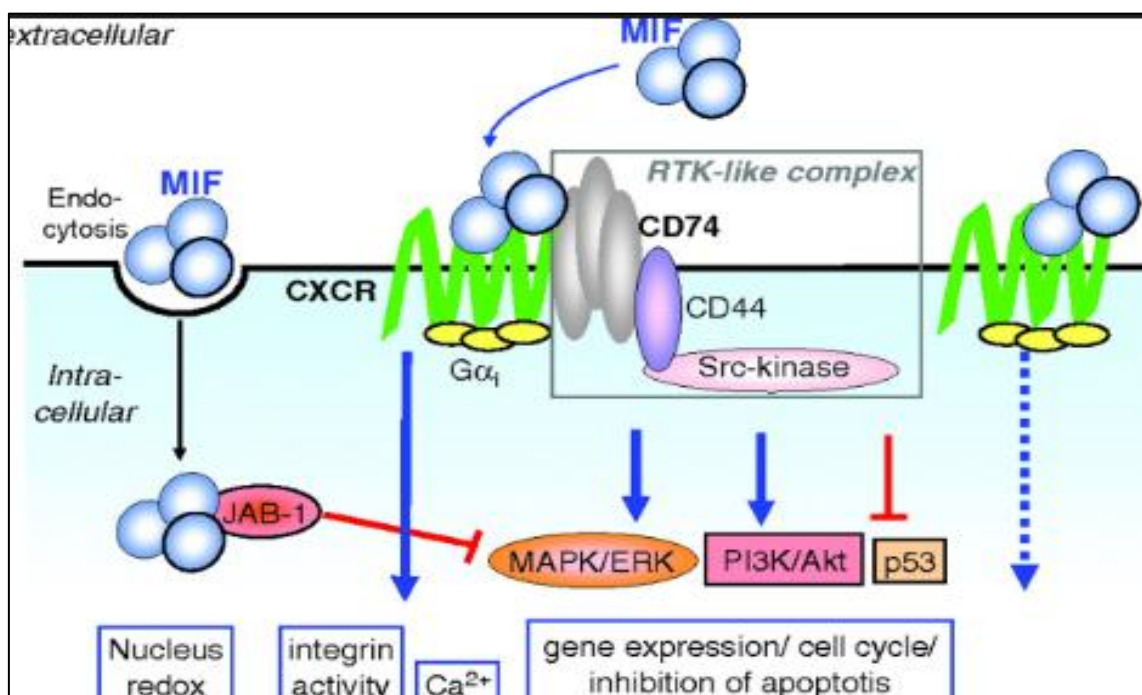
Baugh et al. (43) mostraram que a hipóxia é um potente indutor de expressão de MIF e que a atividade transcripcional do promotor humano é regulado de forma cooperativa pelos fatores de transcrição CREB e HIF-1. Assim, propuseram que a inibição da atividade de HIF-1 pode ser uma nova estratégia terapêutica para reduzir a expressão de MIF em doenças inflamatórias e que também possui implicações importantes no tratamento de certas doenças malignas.

Também propuseram que pode desempenhar um importante papel na transformação oncogênica e sobrevivência do tumor, e uma série de estudos recentes mostraram que MIF atua na regulação da expressão de VEGF. Neste contexto, durante uma hipóxia, a sua expressão elevada pode desempenhar um papel importante no aumento da angiogênese (43).

Estudos recentes mostraram que o CD44 promove recrutamento de células malignas para o endotélio vascular através do aumento da expressão e ativação de receptores de integrina p1 (6, 44), também revelaram níveis significativamente elevados de molécula de CD44, MIF e Src quinase ativados em tecidos tumorais metastáticos em comparação com tecidos tumorais não metastáticos. Shi et al. (27) descobriram que o CD44 interage com o receptor (CD74) e MIF na superfície celular, resultando na formação do complexo entre a MIF, CD74 e CD44 que medeia sinal para

transdução que conduz à ativação de ERK1 e ERK2. Os mesmos autores também demonstraram que o tratamento de MIF conduz à ativação de proteína tirosina quinase c-Src (Src) apenas nas células que expressam tanto CD74 e CD44, e sugeriu que a Src quinase é necessária para induzir a ativação de MIF a partir de ERK1 e ERK. Esta conclusão foi reforçada pelos resultados de estudos anteriores que mostraram que a Src tirosina quinase é fisicamente associado com o domínio citoplasmática de CD44, figura 2.1 (45).

Figura 2.1 Esquema ilustrativo da ativação de MIF.



Fonte: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729125>

De acordo com Rendon et al. (46) MIF estimula a migração e invasão celular também através Rac-1, uma pequena GTPase que pertencem à subfamília Rho.

Funcionalmente, atua sobre vários processos que são fundamentais para carcinogênese (proliferação do tumor, a evasão de apoptose, angiogênese e invasão) através da ativação da ERK-1/2 e vias de AKT e regulação JAB1, p53, SCF ubiquitinaligases, e HIF-1 (25). Além de regulador de p53 e antagonista do crescimento e apoptose demonstrado na figura 2.1 (47).

MIF também pode regular a angiogênese na migração de células endoteliais através de um mecanismo que envolve a PI3K (48). E segundo Amin et al. (49) a adesão induzida por MIF de células HL-60 às células HMEC-1 é dependente de Src,

PI3K, e NFκB. Em contraste, a ERK1 / 2 não é envolvida. Sugerindo que MIF tem efeitos pró-inflamatórias no recrutamento de monócitos através da ativação de moléculas de adesão.

No estudo de Lee et al. (50) dados indicaram que a ativação de AKT é iniciada pela interação de MIF ao receptor CD74 caracterizando a sinalização de processos necessários para a ativação do AKT induzida por MIF como que consiste de um CD74 / Src-quinase / PI3K .

O significado dessas propriedades oncogênicas é refletida pelas associações positivas identificadas entre a produção MIF e a agressividade do tumor e ocorrência de metástases em modelos *in vitro* e *in vivo* de alguns cânceres (25, 51).

MIF com seu receptor CD74 aumenta a invasão de câncer de próstata (52), e a baixa expressão genética em linhagens celulares de câncer reduz a invasividade tumoral (53). Além disso, as células deficientes em MIF não mostraram melhor proliferação após transformação oncogênica (54). Tomados em conjunto, estes resultados sugerem um papel importante envolvido na regulação do crescimento de células tumorais (55).

Além de apoiar o crescimento celular, o MIF também é responsável por inibir apoptose. Um mecanismo molecular para a promoção do processo de oncogênese foi elucidado através da identificação da interdependência funcional entre MIF e HIF-1α em uma forma dependente de p53 (56). Também neutraliza indução de apoptose por p53 e promove a sobrevivência de células tumorais através da via PI3K / AKT (57).

A sua superexpressão é identificada em metástases em linfonodos prostáticos, carcinoma da mama, adenocarcinomas de pulmão, câncer de bexiga e carcinoma hepatocelular [(58); (59);(60)].

Kindt et al. (61) sugeriram que MIF contribui para a progressão / agressividade também no carcinoma de cabeça e pescoço. França (62) comparou o carcinoma epidermoide de lábio e intra-oral com parâmetros clínicos e patológicos utilizando imuno-histoquímica, e obteve uma relação significativa entre a incidência de câncer intra-oral, uso de álcool, e número de células positivas no estroma do tumor.

Outro estudo demonstrou que os níveis salivares e séricos de MIF diminuíram significativamente após a ressecção cirúrgica em 50 pacientes com CEB, e os autores sugerem que os níveis sorológicos poderiam ser considerados como um marcador de neoplasia maligna recidivada (63). Níveis elevados no soro podem ser devido ao MIF

liberado a partir do tumor ou por células envolvidas em respostas inflamatórias induzidas (nomeadamente, linfócitos e macrófagos) (64).

A superexpressão levou a examinar se níveis da expressão influenciam a resposta do tumor à quimioterapia. Tumores de laringe induzidos por injeção de células de MIF-KD era mais sensível à cisplatina e 5-fluorouracil (5-FU), enquanto que os tumores não eram sensível ao docetaxel. Mostrando que as terapias MIF-dirigidas podem ser de alguns valores para manejo de carcinoma de cabeça e pescoço (61).

Segundo Kindt et al. (64) a inibição farmacológica de MIF nas células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço resultou na proliferação e invasão prejudicada. Chen et al. (55) mostraram que HBP1 inibe a transcrição de MIF, resultando na inibição da proliferação de células e reduzida invasão de câncer de próstata. O estudo de Denz et al. (65) o silenciamento de MIF por siRNA em câncer pancreático induz uma inibição da proliferação celular acompanhada pela indução de apoptose.

Mais evidências para um papel onipresente na oncogênese foram demonstradas nos casos de adenocarcinoma de pulmão com uma perda de potencial migratório e invasivo utilizando siRNA e subsequente silenciamento e baixa expressão de MIF (46); (66).

Conforme determinado pela transfecção com MIF siRNA, a expressão gênica de MIF foi efetivamente derrubada em células de CEB. Podendo mediar vias MMP-2/9, sugerindo que MIF pode servir como um alvo terapêutico para o tratamento do CEB (67).

Chang et al. (66) analisaram 40 amostras de CEB e de tecidos normais adjacentes com PCR e revelaram que os níveis de HMGA2 e MIF foram significativamente elevados em CEB em comparação com tecidos normais adjacentes. Comprovando também com imuno-histoquímica, MIF foi superexpressa no citoplasma das células tumorais, mas nas amostras de epitélio normal mostrou pouca ou nenhuma expressão. Concluíram que HMGA2 e MIF estão implicados na regulação da migração e capacidade de invasão das células de câncer de boca.

No estudo de Zeng et al. (67), MIF foi acentuadamente expressa no CEB, na membrana da célula ou no citoplasma, e não no núcleo. Já no fragmento de mucosa, a coloração foi menos pronunciada em todo o epitélio. Cludts et al. (68) relataram em carcinoma epidermoide de hipofaringe aumento desta marcação também com localização predominantemente citoplasmática.

De acordo com França et al. (62) todos os espécimes de CEB analisados tinham células MIF-positivos tanto no parênquima do tumor como no estroma, independentemente se fosse em lábio ou intra-oral. Também foi detectada na região epitelial adjacente ao tumor, e a expressão foi observada independentes do grau de displasia. Enquanto o epitélio normal mostrou esta imunomarcacão em todas as camadas. Em células do parênquima, os níveis desta expressão variaram em relação à diferenciação do tumor. Por exemplo, grau 1 e 2 exibiram uma localizacão celular de MIF dentro da região interior de ilhas de tumor. Ao contrário, nos tumores pouco diferenciados exibiram uma distribuicão irregular, ninhos tumorais não exibiram marcaçao, e apenas algumas células inflamatórias peri tumorais foram MIF positiva. E as pérolas de queratina foram negativas.

Em várias lesões potencialmente malignas e malignas, como também em tumores metastáticos, tem sido relatado aumento da expressao MIF correlacionando com mau prognóstico (6). Como demonstrado por Zeng et al. (67), esta citocina tem papel importante na progressão do CEB.

Juntos, estes resultados indicam que a expressao de MIF pode ser um marcador relevante de CEB.

2.3.2 Via de sinalizacão PI3k/AKT/mTOR

A via PI3K (fosfoinosítide-3-quinase) / AKT/ mTOR tem sido entendida como um caminho de sobrevivência dentro de células eucarióticas em que a serina de AKT /treonina quinase representa um ponto chave. Células expressam três isoformas de AKT intimamente relacionadas: AKT1 (PKBa), AKT2 (PKBb) e AKT3 (PKBg), codificados por genes diferentes. AKT ativada media um sinal antiapoptótico, protegendo assim as células cancerosas. Apenas as expressões de AKT2 e AKT3 é patologicamente aumentadas em cânceres humanos, sugerindo o envolvimento de isoformas de AKT específicas no início ou propagação do câncer. Hiperativação AKT é encontrada mais frequentemente em tumores bem diferenciados que são mais invasivos, crescem mais rápido, e respondem menos ao tratamento (69).

As AKTs, conhecidas como proteína quinase B (PKB), são uma família de serina-treonina quinases envolvida em numerosos processos biológicos essenciais, incluindo a proliferação de célula, apoptose, migração celulares, metabolismo e oncogênese (70).

Contém um domínio PH no N terminal e um domínio central quinase seguido por um C cauda de terminal. A sua ativação é precisamente controlada em condições fisiológicas. A desregulação deste processo está relacionada com diversas doenças, tais como câncer e doenças metabólicas (70).

A ativação de AKT é depende de fosfoinosítide-3,4,5-P₃, gerando o produto da fosfoinosítida 3-quinase (PI3K) (71). A interação de fosfoinosítide-3,4,5-P₃ com o domínio homologia plecstrina (PH) promove a translocação para a membrana de plasma, onde sofre fosforilação em dois locais: Thr308 por PDK1 e Ser473 (72), pelo complexo de proteínas contendo mTOR, Gbl, SIN1, e Rictor (73). De nota, somente a fosforilação completa em Ser473 e Thr308 pode exibir suas funções.

Uma vez ativado, AKT pode promover a sobrevivência da célula através da ativação de uma cascata de sinalização (74). Foi demonstrado que fatores de crescimento, tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (75), fator de crescimento de fibroblastos e angiopoietina se ligam fisicamente e ativam receptor de tirosina-quinases, iniciando-se assim a sinalização intracelular (76) (figura 2.2).

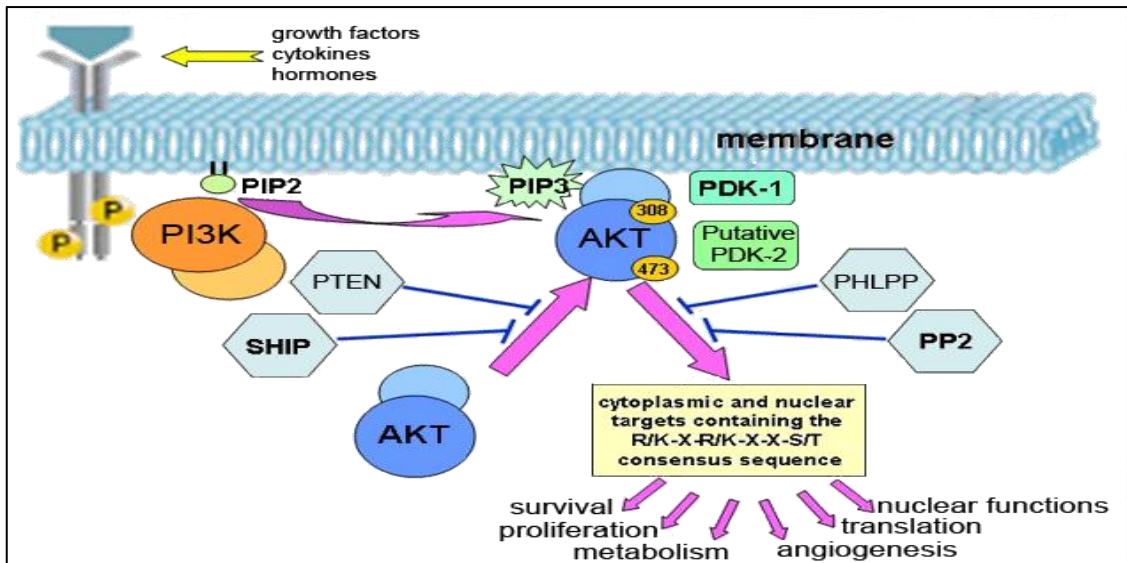
Segundo Lida et al. (77) a via de AKT é importante na resistência adquirida ao cetuximab e sugere que terapias combinadas dirigidas às vias EGFR e AKT / MAP K podem ser benéfica neste cenário.

Dada a importância deste percurso em vários cânceres, uma série de pequenas moléculas alvo com PI3K e sem inibição do mTOR estão sendo avaliadas em pacientes. Vários inibidores da AKT também entraram na evolução clínica; no entanto, alguns deles bloqueiam a ativação de AKT em vez de inibição da atividade de quinase (78).

Dumble et al. (79) relataram uma nova classe de inibidores de AKT via oral disponível, pan-GSK2110183 e GSK2141795, resultando na inibição do crescimento do tumor e / ou regressão.

Abrahão et al. (80) mostrou que células de câncer de cabeça e pescoço tratadas com celecoxib reduziram significativamente os níveis de pAKT.

Figura 2.2 Esquema ilustrativo da via de sinalização PI3K/AKT.



Uma variedade de estudos confirmaram que a AKT pode ser um potencial oncogene em seres humanos e sua superexpressão de AKT fosforilada / PKB (pAKT / PKB) foi encontrada em alguns tipos de cânceres, incluindo o câncer gástrico, de ovário, do pâncreas, de mama, próstata, pulmão e está intimamente relacionada com a sua ocorrência, desenvolvimento e sensibilidade para a radioterapia e quimioterapia (81-83)

Ettl et al. (4) investigaram o efeito da irradiação em duas linhagens de células de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, focando na incidência da apoptose, marcadores de células-tronco e componentes da via PI3K /AKT. Mostrando que o sucesso da radioterapia depende da indução de apoptose e esta parece interferir com a via PI3K / AKT e o bloqueio do EGFR / PI3K / AKT não é suficiente para a restituição de radiosensibilidade. Como as células tumorais são capazes de usar vias alternativas, por exemplo, um MET-driven ERK / MAPK isto permite que o tumor possa escapar da apoptose.

A ativação de AKT não pode ocorrer somente via-se EGFR, mas também através alterações genéticas em vários componentes da via, como PIK3CA ou em PTEN (84). Recentemente, foi detectada mutação no gene AKT1, envolvendo um ácido glutâmico (E) para a lisina (K) na substituição amino ácido 17 (E17K) no domínio de homologia da plecstrina. Esta mutação resulta em translocação para a membrana e a ativação constitutiva de AKT1. No entanto, a frequência de mutação em várias neoplasias

verificou-se ser incomum, variando entre 0% e 8% (85). Cohen et al. (86) investigaram a frequência desta mutação e revelaram que é um evento raro na carcinogênese oral.

Além disso, estudos também confirmaram que a ativação da AKT está associada com a progressão clínica e processos patológicos de cânceres, tais como a extensão e profundidade da invasão, metástase linfonodal e estadiamento patológico (87). Lyu et al. (84) utilizando imuno-histoquímica, descobriram que a alta expressão de pAKT foi associada com um pior prognóstico da doença .

Marcadores p53, Ki-67, EGFR, e pAKT foram significativamente expressos em células tumorais de cabeça e pescoço em comparação com o tecido não maligno (88). No estudo de Won et al. (89), a expressão de EGFR e pAKT foi significativamente maior no CEB do que no carcinoma de orofaringe. A perda de PTEN também foi mais frequente no CEB. Já PIK3CA, mTOR, e expressão da p53 não diferiram entre os grupos.

Massarelli et al. (22) estudaram através de imuno-histoquímica amostras de câncer de língua e a grande maioria apresentou coloração citoplasmática e apenas algumas células mostraram expressão nuclear para pAKT, porém não encontraram correlação com características clínico patológico. No entanto, a sobrevida livre de doença foi significativamente menor nos casos com ativação da AKT, também demonstrada por Pickard et al. (88).

2.4 MIF e PI3K/AKT: Associação

Dependendo do contexto celular, a ligação da MIF com os seus receptores de superfície celular que se sabe podem levar à ativação de dois eixos fundamentais de sinalização, ou seja, a proteína ativada por mitogênioquinase (MAPK) e via de sinalização da via PI3K / AKT (90). Um estudo feito com adenocarcinoma de pulmão verificou que MIF pode promover e estimular proliferação de células tumorais a partir das vias MAPK / PI3K / AKT (29).

Oliveira et al. (25) demonstram que MIF está envolvido na proliferação de melanoma e o crescimento é mediado através da atividade da via PI3K / AKT. Essa ativação é frequentemente associada à infra-regulação ou perda de Fosfatase PTEN que antagoniza a sinalização de PI3K (91). Além de PTEN, outros elementos

importantes do PI3K / AKT encontram-se amplificados ou mutados no melanoma, como AKT3 (92).

Procurando por uma interação entre a apoptose inibir MIF e o PI3 K / AKT / mTOR foi demonstrado que MIF evita apoptose e induz a sobrevivência de células tumorais através de ativação direta da via de AKT. MIF aumentou a atividade AKT através do receptor CD74 de MIF e as quinases Src e PI3K em fibroblastos primários e imortalizados, em estudos com câncer de colo de útero e de mama (57).

Guo et al. (93) mostraram que o nível de fosforilação da AKT e p53 foram menores em baixa expressão de MIF do que em células de controle.

De acordo com Oliveira et al. (25), a baixa expressão de MIF resultou na diminuição da pAKT em todas as linhas celulares de melanoma testadas. Este efeito foi acompanhado por uma redução na expressão de ciclina D1 e ciclina dependente de quinase 4 (CDK4), e um aumento da expressão de p27. Além disso houve uma correlação entre os efeitos da expressão do MIF e o grau de ativação de AKT entre linhas de célula. Coletivamente isto sugere que a ativação da AKT é um dos principais mecanismos pelos quais MIF contribui para a regulação do ciclo celular em pacientes com melanoma.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo principal

O objetivo é analisar o padrão da expressão da pAKT, AKT e MIF e suas correlações com o processo de carcinogênese oral .

3.2 Objetivos secundários

Investigar as características da carcinogênese oral por estimativa da imunomarcção e comparar se os achados moleculares estão correlacionados com a evolução da doença.

Avaliar se MIF está associado à via PI3K/AKT na carcinogênese oral.

Correlacionar se a expressão de AKT1 está associada à carcinogênese oral.

Avaliar se as proteínas são marcadores de diagnóstico precoce do carcinoma epidermoide de boca.

Correlacionar características clínico epidemiológico histopatológico com a expressão de MIF, pAKT e AKT.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) onde se encontram o arquivo de blocos parafinados.

As análises foram desenvolvidas no Serviço de Anatomia Patológica da mesma instituição.

4.2 Seleção e coleta da Amostra

4.2.1 Critérios de Inclusão

Nesse estudo foram selecionados blocos de parafina com material suficiente e ausência de fixação imprópria de biópsias confirmadas histopatologicamente como: fragmento de mucosa, hiperqueratose sem displasia, hiperqueratose com displasia e carcinoma epidermoide com camada de epitélio em transição, de não neoplásico para neoplásico. As biópsias foram selecionadas somente da região da borda de língua ou do assoalho de boca e realizadas pela Clínica da Estomatologia da FOUSP, para padronização da amostra. Foram coletadas do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Patologia Oral da mesma instituição entre janeiro de 2008 a dezembro de 2015.

4.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos casos onde tenham sido colhido material proveniente de biópsias de outro serviço de instituição, recidivas ou metástases, de outros sítios anatômicos e blocos com materiais insuficientes.

4.3 Dados clínicos epidemiológico

Os dados clínicos e epidemiológico foram obtidos em prontuários eletrônicos do Programa Laudo & Imagem do Departamento de Patologia da FOUSP e incluídos variáveis como: idade, gênero, etnia e história de consumo de álcool e/ou tabaco. Se estes estivessem ausentes, buscou nos prontuários da Clínica de Estomatologia da mesma instituição. Os dados considerados foram definidos pelo paciente no momento da realização da biópsia da língua e/ou assoalho de boca.

4.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

Uma vez selecionados os casos, cortes histológicos de 3µm de espessura foram obtidos a partir de tecido embebido em parafina e aplicados em lâminas tratadas com 3- aminopropil-trietoxisilano (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e desparafinizados em dois banhos sucessivos de xilol, um por 30 min a 60° e o outro 15min em temperatura ambiente. Em seguida, foram reidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (do álcool absoluto à solução de etanol a 85%), com posterior remoção de pigmento formólico em solução de etanol 95% com 10% de amônia. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 95°C com diferentes soluções, conforme descrito na tabela 4.1. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com duas imersões de 15min cada em solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 3%. Após o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram lavados em um banho de 5min em água corrente e após lavada em

água destilada. E por 1 min em solução de Tris pH 7,6. Em seguida, foi realizado o bloqueio de sítio inespecífico conforme descrito na Tabela 4.1. Depois do bloqueio de sítio inespecífico, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-AKT, anti-pAKT e anti-MIF. As características de cada anticorpo e da incubação encontram-se descritas na Tabela 4.1. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com Tris (banho de 3 min) e, em seguida, realizou-se incubação com anticorpo de ligação biotinilado (30 min) e com complexo terciário (30 minutos) (Advance, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) para os anticorpos primários de coelho e para o anticorpo primário de camundongo, incubação com Envision por 30 minutos (Dual Link System –HRP, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA); cada incubação foi intercalada com uma imersão em solução de Tris (3 min). A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) (Dako Liquid DAB Plus, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e a contracoloração, com hematoxilina de Mayer. Os cortes foram então desidratados em banhos sucessivos de 3min em cadeia crescente de etanóis (de 70% até absoluto) e diafanizados com xilol (dois banhos de 5min). Para a montagem das lâminas, foi realizada montagem automatizada (Tissue-Tek® SCA, Sakura, EUA) com fita de polietileno (CoverslippingFilmFinitek, Sakura, EUA).

Tabela 4.1 - Características dos anticorpos, da recuperação antigênica, do bloqueio de sítios inespecíficos e tempo de incubação e diluição dos anticorpos nos ensaios de imunohistoquímica

Anticorpo primário	Procedência	Espécie	Recuperação antigênica	Bloqueio	Incubação
Anti-pAKT(ab81283)	Abcam	Coelho	Ácido cítrico (30min)	BSA (30 min)	1:100 (2 horas)
Anti-AKT1 (ab32505)	Abcam	Coelho	Ácido cítrico (30min)	BSA (30 min)	1:100 (2 horas)
Anti-MIF (ab55445)	Abcam	Camundongo	EDTA (30min)	BSA (30 min)	1:200 (Overnight)

Para cada reação foram feitos novos controles positivos e negativos, com e sem adição do anticorpo primário respectivamente.

4.5 Avaliação da expressão por Imuno-histoquímica (IHQ)

Áreas representativas foram escolhidas por um único observador, e a aquisição de imagens foram realizadas utilizando um microscópio de luz (AxioCam, Carl ZeissMicroImagingGmbH, Germany) na magnitude de 100x. Três análises foram realizadas: em primeiro lugar a análise descritiva foi composta pela análise da localização da marcação celular (nuclear e/ou citoplasmática) predominante da expressão; em segundo, a análise qualitativa foi realizada através da avaliação da percentagem de casos positivos para cada anticorpo, a reação foi considerada negativa quando nenhuma das células foi corada e positiva se pelo menos uma corada. E em terceiro, a quantitativa em cada campo selecionado foi delimitado a área de marcação e a porcentagem de células positivas foi gravado pelo programa Image J e anotados no Excel. Como a região do epitélio variou conforme sua espessura de acordo com a quantidade de camadas e tamanho das células, foi calculado a porcentagem da marcação em relação a área total de cada epitélio das amostras, conforme os pontos de corte descritos para a expressão por Won (2012), sinteticamente, em 0 (negativo, escore 0), 1-5% (escore 1), 6-20% (escore 2), 21-50% (escore 3), >50% (escore 4).

Resumido no Quadro 4.1 abaixo:

Quadro 4.1:Avaliação da imuno-histoquímica

Análise Descritiva	Análise Qualitativa	Análise Quantitativa
Marcação citoplasmática	Negativo	Escore 0: negativo
Marcação nuclear		Escore 1: 1- 5% das células coradas
Marcação citoplasmática e nuclear	Positivo	Escore 2: 6-20% das células coradas
		Escore 3: 21-50% das células coradas
		Escore 4: > 50% das células coradas

4.6 Análise Estatística

A análise descritiva foi feita utilizando frequências absolutas e relativas para as variáveis categóricas, além das medidas de tendência central e dispersão para as variáveis contínuas. Estas variáveis foram comparadas pelos teste t (desde que confirmada a normalidade na distribuição das variáveis a partir do teste de Shapiro-Wilk), respectivamente, entre os grupos. Os dados numéricos paramétricos foram apresentados em média e desvio padrão, e os dados não paramétricos, em mediana e valores mínimo e máximo.

Para verificar a correlação entre elas foi usado correlação de Pearson para curva de normalidade e de Spearman para distribuição não normal.

O nível de significância de 5% considerado em todos os testes estatísticos. O software SPSS 16.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas.

5 RESULTADOS

Os dados demográficos das 73 biopsias estudadas (10 de fragmento de mucosa, 10 de hiperqueratose sem displasia, 11 com displasia e 42 carcinomas epidermoide de boca) estão resumidos na tabela 5.1 e a associação entre a expressão dos anticorpos e informação clínica está demonstrada na tabela 5.2.

Tabela 5.1 - Dados demográficos das biópsias usadas na imuno-histoquímica.

		Fragmento de mucosa n= 10 (%)	Sem Displasia n= 10 (%)	Com displasia n= 11 (%)	Carcinoma epidermoide n= 42 (%)
Idade	Média	40,5	61	54	60,92
	Mediana	33,5	60	52	62
Sexo	Feminino	5 (50)	5 (50)	5 (45,47)	7 (16,7)
	Masculino	5 (50)	5 (50)	6 (54,53)	35 (83,3)
Raça	Leucoderma	8 (80)	6 (60)	9 (82)	32 (76,19)
	Melanoderma	0	2 (20)	1 (9)	5 (11,9)
	Asiático	2 (20)	2 (20)	0	3 (7,13)
	Sem informação	0	0	1 (9)	2 (4,78)
Localização	Língua	10 (100)	7 (70)	7 (63,63)	21 (50)
	Assoalho de boca	0	3 (30)	4 (36,37)	21 (50)
Tabagismo	Sim	1 (10)	3 (30)	6 (54,53)	33 (78,57)
	Não	7 (70)	7 (70)	1 (9,0)	3 (7,13)
	Sem informação	2 (20)	0	4 (36,37)	6 (14,3)
Etilismo	Sim	1 (10)	2 (20)	3 (27,28)	26 (61,9)
	Não	7 (70)	8 (80)	4 (36,37)	10 (23,8)
	Sem informação	2 (20)	0	4 (36,37)	6 (14,3)

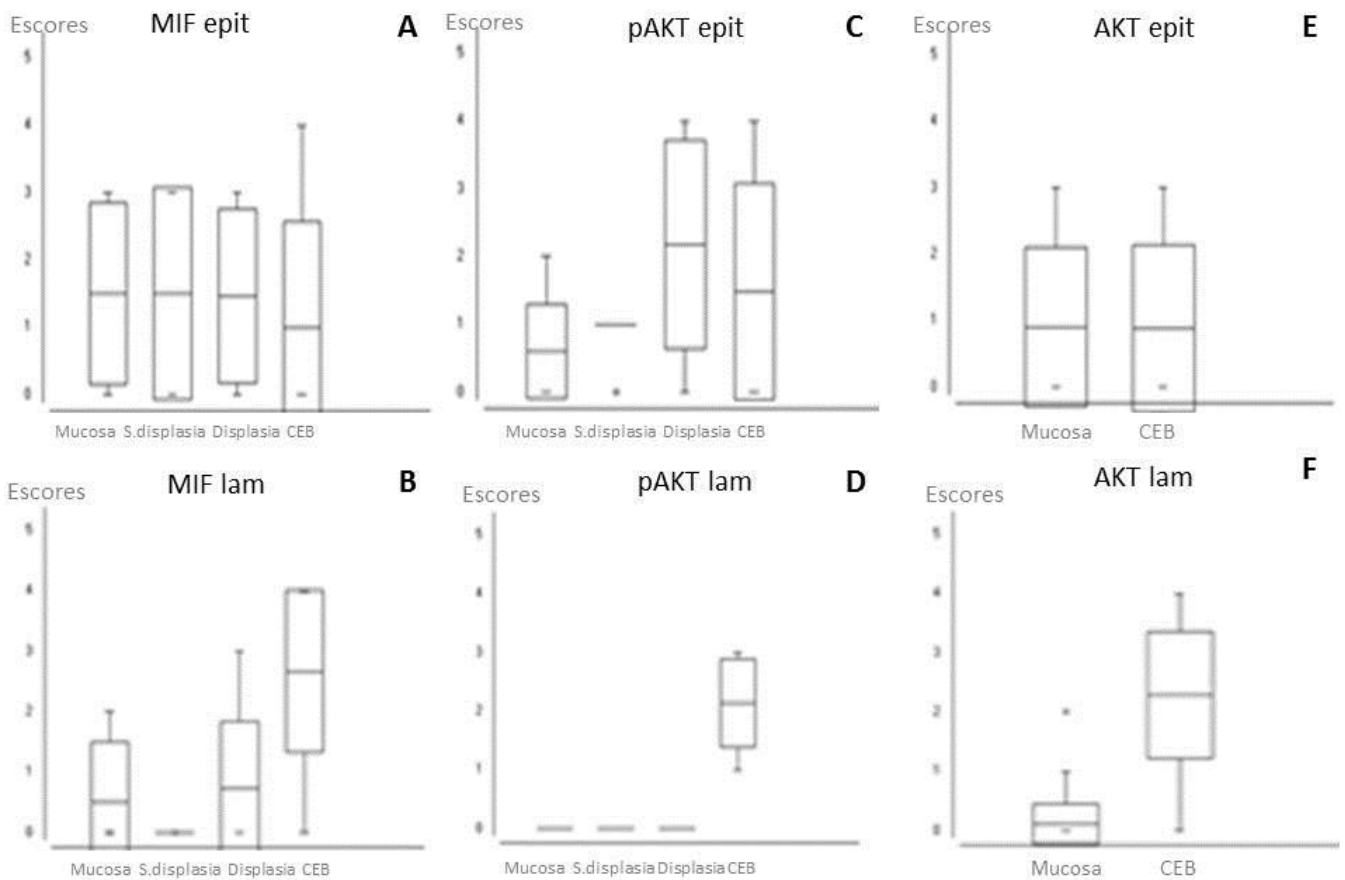
Tabela 5.2 - Correlação da expressão dos anticorpos com dados clínico epidemiológico

			MIF epit	MIF lâm	pAKT epit	pAKT lâm	AKT epit	AKT lâm
Fragmento de mucosa	Sexo	Masculino X	p=0,0028*	p=0,6742	p=0,1487	0	p=0,5767	p=0,6677
		Feminino						
	Raça	Leucoderma X	p=0,3305	0	0	0	p=0,0414*	p=0,7015
		Não leucoderma						
	Fator de risco	Tabagista X	p=0,8059	0	p=0,5761	0	p=0,5914	0
		Não tabagista						
Fator de risco	Etilista X	p=0,8059	0	p=0,5761	0	p=0,5914	0	
	Não etilista							
Sem displasia	Sexo	Masculino X	p=0,6298	p=0,8052	p=0,1634	0	0	0
		Feminino						
	Raça	Leucoderma X	p=0,0097*	p=0,4865	p=0,0825	0	0	0
		Não leucoderma						
	Fator de risco	Tabagista X	p=0,1303	p=0,7004	p<0,0001*	0	0	0
		Não tabagista						
Fator de risco	Etilista X	p=0,1303	p=0,7004	p<0,0001*	0	0	0	
	Não etilista							
Localização	Língua X	p=0,8272	p=0,6867	p=0,6254	0	0	0	
	Assoalho de boca							
Com displasia	Sexo	Masculino X	p=0,3596	p=0,4899	p=0,1095	0	0	0
		Feminino						
	Raça	Leucoderma X	p=0,3929	0	p=0,0256*	0	0	0
		Não leucoderma						
	Fator de risco	Tabagista X	p=0,5318	p=0,6744	p=0,4441	0	0	0
		Não tabagista						
Fator de risco	Etilista X	p=0,5318	p=0,6744	p=0,4441	0	0	0	
	Não etilista							
Localização	Língua X	p=0,6466	p=0,5590	p=0,0416*	0	0	0	
	Assoalho							

			MIF epit	MIF lâm	pAKT epit	pAKT lâm	AKT epit	AKT lâm
Carcinoma Epidermoide	Sexo	Masculino X Feminino	p=0,7275	p=0,3806	p=0,4891	p=0,1487	p=0,5476	p=0,2891
	Raça	Leucoderma X Não leucoderma	p=0,5404	p=0,5785	p=0,6964	p=0,2788	p=0,5259	p=0,5733
	Fator de risco	Tabagista X Não tabagista	p=0,4025	p=0,4341	p=0,5242	p=0,9941	p=0,0228*	p=0,6915
	Fator de risco	Etilista X Não etilista	p=0,4025	p=0,4341	p=0,6348	p=0,8385	p=0,0385*	p=0,7080
	Localização	Língua X Assoalho de boca	p=0,6765	p=0,3311	p=0,2649	p=0,4068	p=0,8615	p=0,1285

Correlação de Pearson. * P>0,05%

Figura 5.1 - Média e desvio padrão da porcentagem de marcação representada pelos escores de cada grupo do estudo. A) MIF no epitélio B) MIF na lâmina própria C) pAKT no epitélio D) pAKT na lâmina própria E) AKT no epitélio F) AKT na lâmina própria



Escore: 0 (sem células coradas); 1 (1-5% de células coradas); 2 (6-20% de células coradas); 3 (21-50% de células coradas); 4 (> 50% de células coradas)

As características principais de cada anticorpo estão descritas a seguir:

- MIF:

Resumido no Quadro 5.1 a diante.

Quadro 5.1: Características da imunomarcção do anticorpo MIF

MIF	Casos positivos n (%)	Marcação Epitélio/Lâmina própria	Escore Predominante	Imunopositividade Citoplasmática/Nuclear	Camadas Epiteliais
Fragmento de mucosa	8 (80)	Epitélio	2	Citoplasmática e nuclear	Basal e parabasal
S/ displasia	5 (50)	Epitélio	2	Citoplasmática e nuclear	Basal e parabasal
C/ displasia	9 (81)	Epitélio e lâmina própria	2	Citoplasmática	Todas
Carcinoma Epidermoide	38 (90,5)	Epitélio e lâmina própria	2 (epitélio) e 3 (lâmina própria)	Citoplasmática e nuclear	Todas

No fragmento de mucosa foi positivo em 80% (8) dos casos estudados, expressando mais no epitélio, com 70% (7), com escore 2 da classificação (ente 6-20% da células coradas) como mostra na figura 5.1. A imunopositividade citoplasmática e nuclear exibiu dentro das camadas basais e parabasais (Figura 5.2).

Nos casos de hiperqueratose sem displasia, 50% (5) foram positivos e todos expressando somente no epitélio com a média classificada no escore 2 (Figura 5.2). Exibindo marcação citoplasmática e nuclear nas camadas basal e parabasal (Figura 5.2).

Oitenta e um por cento (9) de hiperqueratose com displasia foram positivas, expressando na sua maioria de 6-20% da células coradas (escore 2), representado na figura 5.1. Sua marcação foi tanto no epitélio como na lâmina própria, 63,63% (7) e 36,36% (4), respectivamente. E imunopositividade em meio a todas as camadas do epitélio no citoplasma da célula (Figura 5.2).

Nos espécimes de CEB, 90,5% tiveram imunopositividade, expressando mais no estroma com 21-50% das células coradas (escore 3) do que no epitélio (escore 2), figura 5.1. No epitélio, todas as camadas foram marcadas com mais expressão do que nos casos de hiperqueratose com displasia com marcação no citoplasma e núcleo das células (Figura

5.2). A figura 5.3 mostra expressão citoplasmática tanto em parte periférica e meio das ilhas tumorais como em células isoladas.

Observou-se somente que a expressão nos casos de hiperqueratose sem displasia teve associação com a variável raça (leucoderma ou não), tabela 5.2. Houve diferença estatisticamente da imunopositividade entre fragmento de mucosa e o CEB, tanto no epitélio como na lâmina própria ($p=0,05$ e $p<0,0001$, respectivamente), mostrado pela tabela 5.3. E teve diferença na lâmina própria entre os grupos sem displasia e CEB e também entre com displasia e CEB, ambos $p<0,0001$ (Tabela 5.4).

A partir destes resultados, concluiu-se que MIF ativou a via de sinalização PI3K/AKT no processo da carcinogênese oral e no CEB (Tabela 5.5).

- pAKT

No quadro 5.2, mostra resumido as características.

Quadro 5.2: Características da imunomarcção do anticorpo PAKT

pAKT	Casos positivos n (%)	Marcação Epitélio/Lâmina própria	Escore Predominante	Imunopositividade Citoplasmática/Nuclear	Camadas Epiteliais
Fragmento de mucosa	5 (50)	Epitélio	1	—	Queratina
S/ displasia	5 (50)	Epitélio	1	Citoplasmática	Superficial
C/ displasia	9 (81,81)	Epitélio	3	Citoplasmática	Basal ao terço médio
Carcinoma Epidermoide	42 (100)	Epitélio e lâmina própria	2 (epitélio) e 3 (lâmina própria)	Citoplasmática	Todas

No fragmento de mucosa 50% (5) foram positivas com expressão somente no epitélio em média 1-5% de células coradas (escore 1), figura 5.1, na camada de queratina mostrada na figura 5.2.

Com 50% (5) das hiperqueratoses sem displasia positivas, verificou-se que sua expressão também foi somente no epitélio nas camadas superficiais classificadas como escore 1 (Figura 5.1). A imunopositividade citoplasmática é mostrada na figura 5.2.

Nos casos de hiperqueratose com displasia, 81,81% (9) foram positivas e todas expressando no epitélio. Sua maioria com 21-50% de células coradas classificadas como

escore 3 (Figura 5.1). Exibindo marcação citoplasmática da camada basal ao terço médio do epitélio (Figura 5.2).

Todos os espécimes dos CEB estudados foram positivos, porém 69,04% (29) apresentaram somente expressão no estroma tumoral. A média das células coradas no epitélio foi de 6-20% (escore 2) e na lâmina própria foi 21-50% (escore 3) representado na figura 5.1. No epitélio todas as camadas foram marcadas com expressão no citoplasma (Figura 5.2) e na figura 5.3 mostra imunopositividade tanto na periferia como em meio as ilhas tumorais.

Observou-se que a imunopositividade nos casos de hiperqueratose sem displasia teve influência com hábitos de fatores de risco, como ser tabagista ou não e etilista ou não, ambos $p < 0,0001$. Além disso, nos casos com displasia teve associação com variável raça, leucoderma ou não e o tipo da localização, língua ou assoalho de boca (Tabela 5.2). Houve diferença estatística da expressão de marcação entre os grupos de fragmento de mucosa com hiperqueratose com displasia em relação ao epitélio ($p = 0,045$) e entre fragmento de mucosa com o CEB, tanto no epitélio como na lâmina própria ($p = 0,0078$ e $p < 0,0001$, respectivamente), tabela 5.3. Teve diferença de marcação no epitélio dos grupos sem e com displasia ($p = 0,01$). Já entre sem displasia e CEB houve diferença tanto no epitélio como na lâmina própria, $p = 0,0007$ e $p < 0,0001$, respectivamente. Além disso, existiu diferença na lâmina própria entre com displasia e CEB, $p < 0,0001$ (Tabela 5.4).

Figura 5.2 Expressão imuno-histoquímica de MIF e pAKT entre os grupos

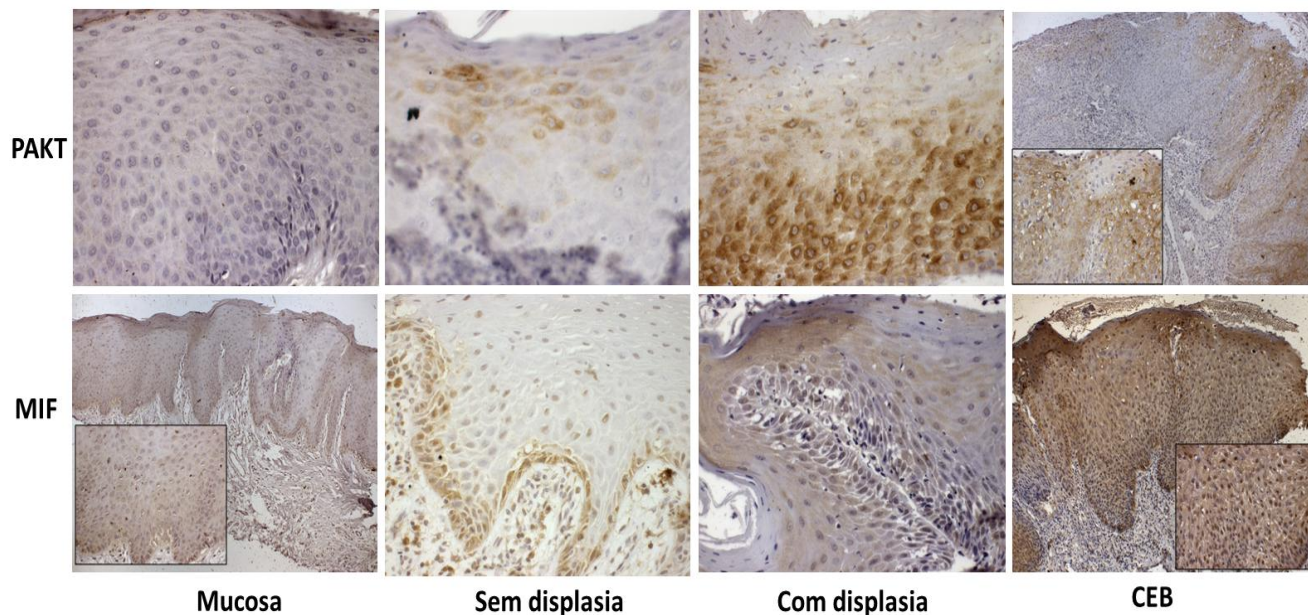


Figura 5.3 Expressão imuno-histoquímica de AKT, pAKT e MIF no CEB

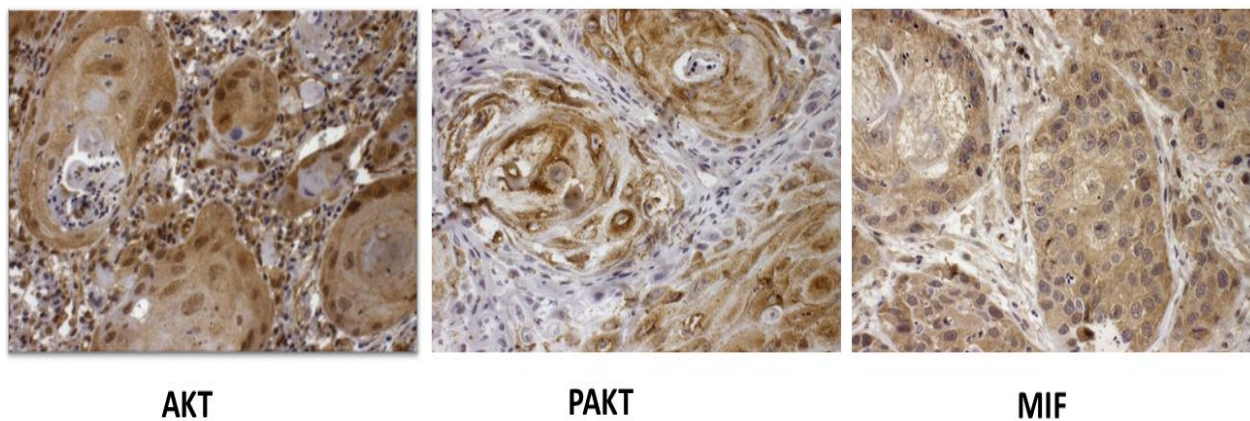


Figura 5.4 Expressão imuno-histoquímica de AKT na mucosa normal e CEB

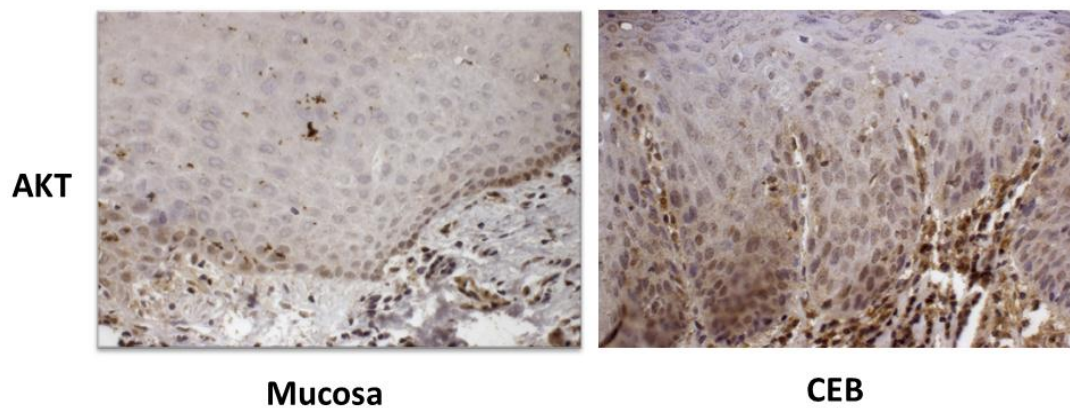


Tabela 5.3 - Comparação da marcação imuno-histoquímica entre os grupos fragmento de mucosa, sem displasia, com displasia e carcinoma epidermoide

	Fragmento de mucosa X Sem Displasia	Fragmento de mucosa X Com Displasia	Fragmento de mucosa X CEC
MIFepit.	p=0,3527 ¹	p=0,4336 ¹	p=0,05¹
MIFlâm.	p=0,1182 ²	p=0,4433 ²	*p<0,0001²
pAKTepit.	p=0,1629 ¹	*p=0,045¹	*p=0,0078¹
pAKTlâm.	p=0,1205 ²	p=0,12 ²	*p<0,0001²
AKTepit.	-	-	p=0,3390 ²
AKTlâm.	-	-	*p<0,0001²

¹Teste não paramétrico ²Teste paramétrico *p<0,05%

Tabela 5.4 - Comparação da marcação imuno-histoquímica entre os grupos sem displasia, com displasia e carcinoma epidermoide

	Sem Displasia X Com Displasia	Sem Displasia X CEC	Com Displasia X CEC
MIFepit.	p=0,3363 ¹	p=0,3007 ²	p=0,0724 ¹
MIFlâm.	p=0,0676 ²	*p<0,0001²	*p<0,0001²
pAKTepit.	*p=0,01¹	*p=0,0007²	p=0,4670 ¹
PAKTlâm.	-	*p<0,0001²	*p<0,0001²

¹Teste não paramétrico ²Teste paramétrico *p<0,05%

Tabela 5.5 - Correlação de MIF com via PI3K/AKT

	Mucosa	Sem displasia	Com displasia	Carcinoma Epidermoide
MIF epit X pAKT epit	p=0,1728	p=0,0665	p=0,9471	p=0,6215
MIF lâm X pAKT lâm	0	0	0	p=0,0795
pAKT epit X AKT epit	p=0,3511	0	0	p=0,0008*
pAKT lâm X AKT lâm	0	0	0	p=0,0868
MIF epit X AKT epit	p=0,9894	0	0	p=0,0004*
MIF lâm X AKT lâm	p=0,0348*	0	0	p=0,071

Correlação de Pearson. * P>0,05%

- AKT

A seguir, o quadro 5.3 resume as características.

Quadro 5.3 - Características da imunomarcação do anticorpo AKT

AKT	Casos positivos n (%)	Marcação Epitélio/Lâmina própria	Escore Predominante	Imunopositividade Citoplasmática/Nuclear	Camadas Epiteliais
Fragmento de mucosa	6 (60)	Epitélio e lâmina própria	3 (epitélio) e 1 (lâmina própria)	Citoplasmática	Basal e parabasal
Carcinoma Epidermoide	40 (95,23)	Epitélio e lâmina própria	1 (epitélio) e 3 (lâmina própria)	Citoplasmática e nuclear	Basal e parabasal

No fragmento de mucosa 60% (6) foram positivas, expressando mais no epitélio com 21-50% das células coradas (escore 3) do que na lâmina própria com 1-5% das células coradas (escore 1), mostrado na figura 5.1. A expressão citoplasmática e nuclear variou tanto nas camadas basais e parabasais do epitélio. Já na lâmina própria houve marcação nuclear das células mononucleadas (Figura 5.4).

Com 95,23% (40) dos CEB positivos, verificou-se maior expressão de células coradas no estroma tumoral, com média de 21-50% (escore 3). Ao contrário, no epitélio mostrou em média de 1-5% das células (escore 1), figura 5.1. No epitélio a imunopositividade citoplasmática e nuclear foi encontrada predominantemente nas células basais e parabasais (Figura 5.4) e na figura 5.3 mostra tanto na periferia como em meio as ilhas tumorais e também em células isoladas.

Observou-se que a imunopositividade nos casos estudados de fragmento de mucosa teve influência com o tipo de raça, leucoderma ou não ($p=0,0414$). Também houve associação dos casos de CEB com os fatores de risco, como tabagista ou não e etilista ou não, $p=0,0228$ e $p=0,0385$, respectivamente (tabela 5.2). Em relação a diferença entre os grupos estudados, mostrou haver diferença significativa entre fragmento de mucosa e CEB somente na lâmina própria ($p<0,0001$) como mostrado na tabela 5.3.

6 DISCUSSÃO

Exceto para pAKT, a imunexpressão de AKT e MIF não está bem demonstrada no processo de carcinogênese oral. Este foi o primeiro estudo a tentar avaliar o padrão imuno-histoquímico destas proteínas associadas em casos de lesões displásicas comparando com fragmento de mucosa, CEB e não displásicas para avaliar a sua contribuição na carcinogênese oral.

Uma grande maioria dos CEB surge a partir de desordens potencialmente malignas e a detecção precoce nesta fase resultaria no melhor prognóstico da doença. Imunorreatividade aumentada de mucosa normal para CEB foram vistas no estudo nos três anticorpos analisados, MIF, pAKT e AKT. Neste contexto pode ser apropriado sugerir mudanças moleculares no início das lesões potencialmente malignas e malignas que auxiliam a classificar em relação ao alto risco e baixo risco de transformação maligna.

Em várias lesões potencialmente malignas e malignas tem sido relatado aumento da expressão de MIF correlacionando com a evolução e mau prognóstico da doença (6). Esta proteína atua não somente a migração e invasão celular (46), mas também na proliferação, evasão de apoptose e invasão (25), mostrando que a sua baixa expressão reduz a invasão tumoral (53).

Como demonstrado no estudo, esta citocina teve alta expressão no CEB em relação à mucosa normal, e também em relação aos grupos sem e com displasia mostrando papel importante na carcinogênese oral, corroborando com outros estudos (66); (67).

Foi expressa em 83% das amostras estudadas e teve aumento da localização de marcação mostrada pela evolução de epitélio para lâmina própria, e também, em relação à quantidade de células expressas, das camadas basal e parabasal para todas as camadas do epitélio confirmando a correlação com a evolução do CEB.

Ao contrário do apresentado pelo estudo de França et al. (62) onde esta expressão no epitélio do fragmento de mucosa mostrou imunomarcagem em todas as camadas, em nosso estudo ocorreu nas células das camadas basais e

parabasais somente, suspeitando que no trabalho de França et al. (62) possa ter ocorrido fundo de marcação.

A marcação desta citocina nas amostras foi predominantemente citoplasmática e nuclear, outros estudos tiveram imunomarcação na membrana celular (62) ou somente no citoplasma (68) mostrando o processo de ativação diante diferentes estágios em que as células se encontram.

Com 90,5% dos espécimes de CEB MIF-positivos tanto no parênquima do tumor como no estroma e também no epitélio de lesões potencialmente malignas, observadas independente do grau de displasia (sem ou com), observa-se relação com o processo da carcinogênese oral, como também observado no estudo de França et al. (62).

Comparando parâmetros clínico epidemiológicos e imuno-histoquímicos a expressão de MIF foi influenciada nos casos sem displasia, que houve maior expressão nos leucodermas devido ao maior número desta amostra no estudo. Além disso, houve influência em relação ao tipo de gênero nos casos de fragmento de mucosa ($p=0,0028$) levando a acreditar que a expressão de MIF nesta amostra tem atividade com hormônios femininos, estrógeno e progesterona. Já Kindt et al. (61) mostraram haver alta expressão somente nas amostras de etilistas, o que não foi verificado.

Estudos recentes verificaram que MIF promove e estimula a proliferação de células tumorais a partir da via PI3K / AKT (29) (25) (57), através da interação com o receptor CD74 e conseqüentemente a sinalização da cascata intracelular (50). O que também foi confirmado em nosso estudo, através da alta expressão de AKT e pAKT correlacionada com a proteína MIF.

Esta via é resistente a tratamentos conservadores, sugerindo terapias combinadas para tornar o tratamento mais efetivo (4); (77). De acordo com Oliveira et al. (25) a baixa expressão de MIF resultou na diminuição do pAKT. Sugerindo e enfatizando que terapias MIF-dirigidas podem ter valores para o manejo do CEB (61); (64); (67).

Em relação as proteínas estudadas desta via, AKT foi mais expressa no CEB do que na mucosa normal. Confirmando hipóteses sugeridas que ocorre mutação no gene AKT1 envolvidas no início ou na propagação do câncer. Esta mutação resulta em translocação para a membrana celular e a ativação. No entanto, a frequência desta mutação em várias neoplasias mostrou-se ser incomum (85). Cohen et al.

(86) investigou a frequência na carcinogênese oral e revelou que é realmente um evento raro. Porém no nosso estudo, 95,23% dos CEB mostraram ser positivas tanto no parênquima tumoral quanto no estroma.

A marcação de AKT foi positiva tanto no epitélio quanto na lâmina própria das amostras estudadas, porém a porcentagem de células expressas foi diferente. No epitélio do fragmento de mucosa houve maior expressão do que no epitélio do CEB, ao contrário dos casos de CEB, que houve maior imunomarcação na lâmina própria, mostrando haver relação da ativação desta proteína na carcinogênese oral.

Em relação à localização da marcação, há tanto no citoplasma quanto no núcleo, isto ocorre de acordo com o processo de ativação.

Uma vez ativado, AKT pode promover a sobrevivência da célula através da cascata de sinalização (74). Observamos que 50% das hiperqueratoses sem displasia foram pAKT-positiva nas camadas superficiais do epitélio. No entanto, percebemos que houve aumento desta expressão em relação aos casos com displasia, mostrando positividade em 81,81%, com marcação citoplasmática da camada basal ao terço médio. E todos os espécimes de CEB foram positivos, aumentando conseqüentemente sua expressão, com imunopositividade tanto na periferia em meio as ilhas tumorais como em todas as camadas do epitélio. Confirmando que esta proteína é ativa no processo de carcinogênese oral.

A porcentagem de células expressas com pAKT variou de acordo com a amostra estudada. Nos casos de fragmento de mucosa e sem displasia tiveram aproximadamente a mesma porcentagem de marcação (score1). Já nos casos com displasia houve aumento desta expressão no epitélio (score3) passando de poucas células para camada basal até o terço médio superior do epitélio. No entanto, nos espécimes de CEB a marcação foi encontrada tanto no epitélio, em todas as camadas, como na lâmina própria. Porém, a porcentagem foi maior na lâmina própria do que no epitélio, confirmando mais uma vez pelos resultados, que esta proteína está relacionada a evolução do CEB.

Martins et al. (21) também mostrou que a alta expressão de pAKT durante a carcinogênese oral, exibiu diferença também entre os grupos de lesões displásicas e de carcinoma epidermoide quando comparados com lesões não displásicas e fragmento de mucosa. Enquanto 62,2% das amostras do grupo de displasia exibiram positividade no citoplasma das células da camada basal e parabasal, na amostra de CEB, 83,3% mostraram expressão tanto na porção periférica quanto nas ilhas

tumorais (21), como em nosso estudo. Portanto, verificamos maior número de casos com expressão positiva de pAKT do que nos estudos citados anteriormente, correspondendo a 85% dos casos estudados.

Já Massarelli et al. (22) observaram que em lesões pré-neoplásicas, a expressão citoplasmática de pAKT foi homoganeamente distribuída entre todas as camadas do epitélio e que esta marcação foi mais frequentemente expressa em graus leve e moderado de displasia em comparação com displasia grave, podendo ter ocorrido fundo de marcação.

A imunopositividade nos casos de hiperqueratose sem displasia foi associada a fatores de risco como tabagismo e etilismo e, os casos com displasia tiveram influência da variável etnia, o grupo leucoderma mostrou maior marcação. Lima et al. (19) mostraram ter influência com o aumento de número de cigarros por dia. No entanto, Massarelli et al. (22) mostrou que nenhuma correlação significativa foi encontrada entre características clínico-patológico.

Em resumo, este estudo demonstrou que há aumento na expressão de MIF, AKT e pAKT durante a carcinogênese da mucosa oral através da análise da imunomarcção havendo diferença entre a fragmento de mucosa, hiperqueratose sem displasia e com displasia e o CEB. Estas proteínas podem ser consideradas como potenciais marcadores de diagnóstico preditor para o CEB.

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que através da análise de imuno-histoquímica a hiperexpressão de MIF, PAKT e AKT está relacionada à evolução do carcinoma epidermoide de boca, mostrando que o aumento da expressão de MIF ativa a via de sinalização intracelular PI3K/AKT na carcinogênese oral. O estudo também mostrou que a proteína AKT1 foi altamente expressa tanto no parênquima como no estroma do CEB, podendo sugerir que há risco de alteração no gene levando sua ativação. Além disso, fatores como tabagismo, etilismo e etnia influenciam na marcação da proteína. Portanto, estas proteínas podem ser consideradas como potenciais marcadores de diagnóstico preditor de carcinoma de boca.

REFERÊNCIAS¹

1. Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer*. 2002;38(1):99-166.
2. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett*. 2014;8(1):7-11.
3. Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;102(1):67-76.
4. Ettl T, Viale-Bouroncle S, Hautmann MG, Gosau M, Kolbl O, Reichert TE, et al. AKT and MET signalling mediates antiapoptotic radioresistance in head neck cancer cell lines. *Oral oncology*. 2015;51(2):158-63.
5. Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem*. 1999;274(25):18100-6.
6. Klobucar M, Sedic M, Gehrig P, Grossmann J, Bilic M, Kovac-Bilic L, et al. Basement membrane protein laminin-1 and the MIF-CD44-beta1 integrin signaling axis are implicated in laryngeal cancer metastasis. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1862(10):1938-54.
7. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011;23(8):633-41.
8. Rautava J, Luukkaa M, Heikinheimo K, Alin J, Grenman R, Happonen RP. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. *Oral Oncol*. 2007;43(9):911-9.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

9. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):612-9.
10. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(11):1143-54.
11. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral oncology.* 2010;46(6):414-7.
12. Ries LAG, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner M-J (editors). *SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics.* National Cancer Institute, SEER Program, 2007; NIH Pub. No. 07-6215, Bethesda, MD
13. Gomez I, Seoane J, Varela-Centelles P, Diz P, Takkouche B. Is diagnostic delay related to advanced-stage oral cancer? A meta-analysis. *Eur J Oral Sci.* 2009;117(5):541-6.
14. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc.* 2002;68(10):617-21.
15. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2007;36(10):575-80.
16. Thomson PJ. Field change and oral cancer: new evidence for widespread carcinogenesis? *International journal of oral and maxillofacial surgery.* 2002;31(3):262-6.
17. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists.* 2003;14(1):47-62.

18. Krishnan L, Karpagaselvi K, Kumarswamy J, Sudheendra US, Santosh KV, Patil A. Inter- and intra-observer variability in three grading systems for oral epithelial dysplasia. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2016;20(2):261-8.
19. Lima JS, Correa L, Klingbeil MF, de Sousa SC. c-Jun, pc-Jun, and p27 are differently expressed in oral leukoplakias in smokers and never-smokers. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2016;121(1):73-80.
20. Al-Dhohorah T, Mashrah M, Yao Z, Huang J. Aberrant DKK3 expression in the oral leukoplakia and oral submucous fibrosis: a comparative immunohistochemical study. *Eur J Histochem*. 2016;60(2):2629.
21. Martins F, de Sousa SC, Dos Santos E, Woo SB, Gallottini M. PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016.
22. Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, El-Naggar AK, Lo Muzio L, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer*. 2005;104(11):2430-6.
23. David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966;56(1):72-7.
24. Grieb G, Merk M, Bernhagen J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker. *Drug News Perspect*. 2010;23(4):257-64.
25. Oliveira CS, de Bock CE, Molloy TJ, Sadeqzadeh E, Geng XY, Hersey P, et al. Macrophage migration inhibitory factor engages PI3K/Akt signalling and is a prognostic factor in metastatic melanoma. *BMC Cancer*. 2014;14:630.
26. Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*. 2003;197(11):1467-76.

27. Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*. 2006;25(4):595-606.
28. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zernecke A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med*. 2007;13(5):587-96.
29. Mitchell RA. Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumourigenesis. *Cell Signal*. 2004;16(1):13-9.
30. Flaster H, Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor-glucocorticoid dyad: regulation of inflammation and immunity. *Mol Endocrinol*. 2007;21(6):1267-80.
31. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*. 1994;179(6):1895-902.
32. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, et al. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7849-54.
33. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*. 1999;189(2):341-6.
34. Baugh JA, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. *J Endocrinol*. 2003;179(1):15-23.
35. Conroy H, Mawhinney L, Donnelly SC. Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link. *QJM*. 2010;103(11):831-6.
36. Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel R, Bacher M. Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology*. 2008;75(3-4):127-33.

37. Mizue Y, Ghani S, Leng L, McDonald C, Kong P, Baugh J, et al. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(40):14410-5.
38. Magi B, Bini L, Perari MG, Fossi A, Sanchez JC, Hochstrasser D, et al. Bronchoalveolar lavage fluid protein composition in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis: a two-dimensional electrophoretic study. *Electrophoresis*. 2002;23(19):3434-44.
39. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hültner L, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*. 2000;6(2):164-70.
40. Chatterjee M, Borst O, Walker B, Fotinos A, Vogel S, Seizer P, et al. Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circ Res*. 2014;115(11):939-49.
41. Müller I, Schönberger T, Schneider M, Borst O, Ziegler M, Seizer P, et al. Gremlin-1 is an inhibitor of macrophage migration inhibitory factor and attenuates atherosclerotic plaque growth in ApoE^{-/-} Mice. *J Biol Chem*. 2013;288(44):31635-45.
42. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med*. 1998;4(11):707-14.
43. Baugh JA, Gantier M, Li L, Byrne A, Buckley A, Donnelly SC. Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347(4):895-903.
44. McFarlane S, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, Waugh DJ. CD44-mediated activation of alpha5beta1-integrin, cortactin and paxillin signaling underpins adhesion of basal-like breast cancer cells to endothelium and fibronectin-enriched matrices. *Oncotarget*. 2015;6(34):36762-73.
45. Taher TE, Smit L, Griffioen AW, Schilder-Tol EJ, Borst J, Pals ST. Signaling through CD44 is mediated by tyrosine kinases. Association with p56lck in T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1996;271(5):2863-7.

46. Rendon BE, Roger T, Teneng I, Zhao M, Al-Abed Y, Calandra T, et al. Regulation of human lung adenocarcinoma cell migration and invasion by macrophage migration inhibitory factor. *J Biol Chem.* 2007;282(41):29910-8.
47. Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med.* 1999;190(10):1375-82.
48. Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circ Res.* 2003;93(4):321-9.
49. Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, Lackowski NP, et al. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood.* 2006;107(6):2252-61.
50. Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim HS, Min BS, Kim NK, et al. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(5):772-9.
51. Choudhary S, Hegde P, Pruitt JR, Sielecki TM, Choudhary D, Scarpato K, et al. Macrophage migratory inhibitory factor promotes bladder cancer progression via increasing proliferation and angiogenesis. *Carcinogenesis.* 2013;34(12):2891-9.
52. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol.* 2006;177(12):8730-9.
53. Hagemann T, Balkwill F. MIFed about cancer? *Gastroenterology.* 2005;129(5):1785-7.
54. Petrenko O, Fingerle-Rowson G, Peng T, Mitchell RA, Metz CN. Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to Ras-mediated transformation. *J Biol Chem.* 2003;278(13):11078-85.

55. Chen YC, Zhang XW, Niu XH, Xin DQ, Zhao WP, Na YQ, et al. Macrophage migration inhibitory factor is a direct target of HBP1-mediated transcriptional repression that is overexpressed in prostate cancer. *Oncogene*. 2010;29(21):3067-78.
56. Winner M, Koong AC, Rendon BE, Zundel W, Mitchell RA. Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization. *Cancer Res*. 2007;67(1):186-93.
57. Lue H, Thiele M, Franz J, Dahl E, Speckgens S, Leng L, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene*. 2007;26(35):5046-59.
58. Meyer-Siegler K, Hudson PB. Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology*. 1996;48(3):448-52.
59. Kamimura A, Kamachi M, Nishihira J, Ogura S, Isobe H, Dosaka-Akita H, et al. Intracellular distribution of macrophage migration inhibitory factor predicts the prognosis of patients with adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2000;89(2):334-41.
60. Ren Y, Tsui HT, Poon RT, Ng IO, Li Z, Chen Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2003;107(1):22-9.
61. Kindt N, Preillon J, Kaltner H, Gabius HJ, Chevalier D, Rodriguez A, et al. Macrophage migration inhibitory factor in head and neck squamous cell carcinoma: clinical and experimental studies. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013;139(5):727-37.
62. França CM, Batista AC, Borra RC, Ventiades-Flores JA, Mendonça EF, Deana AM, et al. Macrophage migration inhibitory factor and oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(5):368-73.

63. DE Souza MB, Curioni OA, Kanda JL, DE Carvalho MB. Serum and salivary macrophage migration inhibitory factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2014;8(5):2267-75.
64. Kindt N, Laurent G, Nonclercq D, Journé F, Ghanem G, Duvillier H, et al. Pharmacological inhibition of macrophage migration inhibitory factor interferes with the proliferation and invasiveness of squamous carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2013;43(1):185-93.
65. Denz A, Pilarsky C, Muth D, Rückert F, Saeger HD, Grützmann R. Inhibition of MIF leads to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Surg Res.* 2010;160(1):29-34.
66. Chang KP, Lin SJ, Liu SC, Yi JS, Chien KY, Chi LM, et al. Low-molecular-mass secretome profiling identifies HMGA2 and MIF as prognostic biomarkers for oral cavity squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2015;5:11689.
67. Zeng J, Quan J, Xia X. [Corrigendum] Transient transfection of macrophage migration inhibitory factor small interfering RNA disrupts the biological behavior of oral squamous carcinoma cells. *Mol Med Rep.* 2016;14(1):614.
68. Cludts S, Decaestecker C, Johnson B, Lechien J, Leroy X, Kindt N, et al. Increased expression of macrophage migration inhibitory factor during progression to hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30(9):3313-9.
69. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat.* 2008;11(1-2):32-50.
70. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
71. Ding J, Du K. ClipR-59 interacts with Akt and regulates Akt cellular compartmentalization. *Mol Cell Biol.* 2009;29(6):1459-71.

72. Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:965-1014.
73. Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 2006;127(1):125-37.
74. Béraud C, Henzel WJ, Baeuerle PA. Involvement of regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase in NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(2):429-34.
75. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1995;1(10):1024-8.
76. Dai J, Peng L, Fan K, Wang H, Wei R, Ji G, et al. Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene.* 2009;28(38):3412-22.
77. Iida M, Brand TM, Campbell DA, Starr MM, Luthar N, Traynor AM, et al. Targeting AKT with the allosteric AKT inhibitor MK-2206 in non-small cell lung cancer cells with acquired resistance to cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(6):481-91.
78. Lin J, Sampath D, Nannini MA, Lee BB, Degtyarev M, Oeh J, et al. Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res.* 2013;19(7):1760-72.
79. Dumble M, Crouthamel MC, Zhang SY, Schaber M, Levy D, Robell K, et al. Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One.* 2014;9(6):e100880.
80. Abrahao AC, Giudice FS, Sperandio FF, Pinto Junior Ddos S. Effects of celecoxib treatment over the AKT pathway in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2013;42(10):793-8.

81. Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol.* 2004;24(4):893-900.
82. Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(3):184-92.
83. Rosen N, She QB. AKT and cancer--is it all mTOR? *Cancer Cell.* 2006;10(4):254-6.
84. Lyu J, Song H, Tian Z, Miao Y, Ren G, Guo W. Predictive value of pAKT/PTEN expression in oral squamous cell carcinoma treated with cetuximab-based chemotherapy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.* 2016;121(1):67-72.
85. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 2007;448(7152):439-44.
86. Cohen Y, Goldenberg-Cohen N, Shalmon B, Shani T, Oren S, Amariglio N, et al. Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology.* 2011;47(10):946-50.
87. Li N, Sui J, Liu H, Zhong M, Zhang M, Wang Y, et al. Expression of phosphorylated Akt/mTOR and clinical significance in human ameloblastoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(4):5236-44.
88. Pickhard A, Grober S, Haug AK, Piontek G, Wirth M, Strassen U, et al. Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.* 2014;117(6):733-42.
89. Won HS, Jung CK, Chun SH, Kang JH, Kim YS, Sun DI, et al. Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral oncology.* 2012;48(10):985-90.

90. Li GQ, Xie J, Lei XY, Zhang L. Macrophage migration inhibitory factor regulates proliferation of gastric cancer cells via the PI3K/Akt pathway. *World J Gastroenterol.* 2009;15(44):5541-8.

91. Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer.* 2002;99(1):63-7.

92. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7002-10.

93. Guo P, Wang J, Liu J, Xia M, Li W, He M. Macrophage immigration inhibitory factor promotes cell proliferation and inhibits apoptosis of cervical adenocarcinoma. *Tumour Biol.* 2015;36(7):5095-102.

ANEXO – PARECER COMITÊ DE ÉTICA



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DO FATOR INIBITÓRIO DA MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) ASSOCIADO A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT/MTOR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 53508016.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.788.436

Apresentação do Projeto:

estudo será realizado no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo onde encontram-se o arquivo de blocos parafinados. As análises serão desenvolvidas no Serviço de Anatomia Patológica da mesma instituição. Nesse estudo serão utilizados blocos de parafina com tecido de biópsia incisional de pacientes com carcinoma epidermoide de língua e/ou assoalho de boca. As amostras serão coletadas do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Patologia Oral da FOUSP entre janeiro de 2010 a dezembro de 2015. Os casos participantes do estudo serão classificados pelo Código Internacional de Doenças (CID-10) em C02 (língua) e C04 (assoalho de boca). Serão excluídos casos onde tenha sido colhido material proveniente de biópsias excisional, recidivas ou metástases, outros sítios anatômicos e blocos com materiais insuficientes. Após a seleção da amostra, os tecidos fixados em parafina serão cortados em seções de espessura de 4µm, desparafinados. Dois observadores independentes analisarão as lâminas classificarão de acordo com o grau de diferenciação; a infiltração vascular sanguínea e

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



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.788.438

linfática em presente e ausente; a invasão perineural em presente e ausente; infiltrado inflamatório peritumoral será avaliado semiquantitativamente e quanto às margens cirúrgicas em livres. Os dados clínicos epidemiológico serão obtidos em prontuários eletrônicos do Arquivo Laudo & Imagem do Departamento de Patologia da FOUSP e deverão incluir idade, gênero e história de consumo de álcool e/ou tabaco. As lâminas serão incubadas com os anticorpos primários anti-Akt, anti-pAkt e anti-MIF e realizadas análises descritiva, de imunomarcção e semi-quantitativa. Serão utilizados como controles, lâminas de tonsila e de tecido de mucosa normal em duplicata, que foram imunocoradas com e sem a adição do anticorpo primário.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo é analisar o padrão da expressão de alguns marcadores biológicos (pAkt, Akt e MIF) e suas relações com o prognóstico do carcinoma epidermoide de boca. São, ainda, objetivos secundários: 1) Investigar as características da carcinogênese em relação à avaliação dos tipos histológicos e profundidade de invasão tumoral por estimativa da imunomarcção e comparar se os achados moleculares estão correlacionados com o prognóstico da doença. 2) Relacionar se a superexpressão de MIF, pAkt e Akt está associada ao má prognóstico do carcinoma epidermoide de boca. 3) Avaliar a proteína MIF como marcador de prognóstico em carcinoma epidermoide de boca. 4) Relacionar características clínico epidemiológico histopatológico e sobrevida livre de doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos e benefícios diretos para os pacientes. Como benefício indireto, aponta-se o reconhecimento de diferentes perfis genéticos e moleculares pode permitir uma classificação mais específica do carcinoma epidermoide.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será utilizado o arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP. Os pesquisadores foram autorizados a utilizarem esse arquivo. Serão também consultados os prontuários eletrônicos dos pacientes cujos blocos forem incluídas no estudo. Na versão anterior apresentada, não se fazia

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepto@usp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.788.436

menção à guarda de sigilo das informações coletadas por parte do Serviço que permitiu a coleta. Essa pendência foi sanada, a informação sobre o sigilo foi incluída. Os pesquisadores informam que, após a realização da pesquisa, os blocos de parafina e lâminas coradas serão armazenados no arquivo do próprio serviço e não descartados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados a carta de autorização de uso dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP, devidamente assinada por seu responsável.

Recomendações:

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

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_665266.pdf	17/10/2016 13:38:11		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_de_infraestrutura.pdf	23/02/2016 10:40:56	Leticia Drumond de Abreu Guimarães	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	23/02/2016 10:39:12	Leticia Drumond de Abreu Guimarães	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	23/02/2016 10:08:29	Leticia Drumond de Abreu Guimarães	Aceito

Situação do Parecer:

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



**FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO**



Continuação do Parecer: 1.788.438

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 24 de Outubro de 2016

**Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)**

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7980 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br