



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mariana Paravani Palaçon

**Expressão de calreticulina em neoplasias malignas e desordens
potencialmente malignas**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mariana Paravani Palaçon

**Expressão de calreticulina em neoplasias malignas e desordens
potencialmente malignas**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na Áreas de Diagnóstico e Cirurgia

Orientadora: Andreia Bufalino

Araraquara

2022

P153e

Palaçon, Mariana Paravani

Expressão de calreticulina em neoplasias malignas e desordens potencialmente malignas / Mariana Paravani Palaçon. -- Araraquara, 2022

57 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Andreia Bufalino

1. Leucoplasia oral. 2. Calreticulina. 3. Imuno-histoquímica. 4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Mariana Paravani Palaçon

**Expressão de calreticulina em neoplasias malignas e desordens
potencialmente malignas**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Diagnóstico e Cirurgia

Andreia Bufalino

Michele Agostini

Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 14 de fevereiro de 2022.

DADOS CURRICULARES

Mariana Paravani Palaçon

NASCIMENTO: 20/12/1993 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Vera Lucia Paravani Palaçon
Edson Luis Palaçon

2015-2019: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP.

2017-2019: Iniciação Científica no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP.

2020-2022: Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas na área de Diagnóstico e Cirurgia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”- UNESP.

Dedico esta dissertação à Deus por ter me dado suporte emocional para conseguir forças nos momento difíceis.

Dedico também aos meus pais, os principais responsáveis pela minha criação, pelo incentivo e apoio, para que eu possa estar seguindo o meu caminho, e correr atrás dos meus sonhos

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, e pela sua bondade de nos proporcionar tantas coisas boas.

Aos meus pais, Vera Lucia Paravani Palaçon e Edson Luis Palaçon, que não me deram só amor, mas toda a colaboração e apoio para que eu siga os meus objetivos e sonho.

Agradeço a toda a minha família Paravani-Palaçon, que comemora e vibra a cada conquista, e por sempre proporcionarem momentos que deixamos de lado a preocupação do dia a dia.

As minhas amigas Lais Dorighello e Hamile Vioto, que desde a graduação são amigas especiais que dão apoio e fazem acreditar no meu potencial e incentivam para eu crescer a cada dia mais.

As minhas amigas de infância, Daniela Pereira de Freitas, Amanda Leal Sendreti, Bruna Resende Toso que mesmo de longe ou com os afazeres do dia a dia estão de alguma forma presente.

Agradeço ao Gabriel Zampieri de Aranda Amado e a Carolina Gaspar que por muitas vezes aguentaram meu estresse e preocupação, e sempre me fazerem acreditar que não fim tudo da certo.

À minha professora e orientadora Andreia Bufalino, que acreditou, incentivou, e compartilhou seu conhecimento para que pudéssemos executar e concluir essa pesquisa.

Agradeço ao Tulio Morandim Ferrisse, que também ajudou a realizar esta pesquisa.

A minha amiga de pós-graduação, Camila de Oliveira Barbeiro, por ter me ensinado, compartilhado seus conhecimentos, além da companhia no dia-a-dia deixando os momentos de estresse mais tranquilo.

A minha outra amiga da pós-graduação, Gabriela Biagioni, que compartilhou comigo os momentos de estresse e por acreditar que juntas no final daria tudo certo.

Agradeço a CAPES. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, bolsa de mestrado, para que eu investisse nos meus conhecimentos na área acadêmica.

Agradeço à Rede de Laboratórios Multiusuários – RELAM/PROPP-UFU que nos abriu as portas para realizamos parte desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Ciências Odontológicas que compartilharam seus conhecimentos nas aulas e proporcionaram meu crescimento na área acadêmica.

Agradeço os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial o Cristiano Afonso Lamounier que sempre foi muito atencioso em responder minhas duvidas.

Palaçon MP. Expressão de calreticulina em neoplasias malignas e desordens potencialmente malinas [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Dentre as neoplasias que acometem a cavidade oral, 95% delas são diagnosticadas como carcinoma espinocelular e muitas vezes, estes tumores são precedidos por alterações clínicas que apresentam uma taxa de transformação maligna, chamadas de desordens potencialmente malignas orais (DPMOs). Dentre elas, a mais comum é a leucoplasia oral (LO) que é definida como "uma placa branca de risco questionável definida após a exclusão de outras doenças ou distúrbios conhecidos que mimetizam este aspecto, mas que não carregam nenhum risco conhecido para o câncer", e sua taxa de transformação maligna de 0,3 a 13,8%. A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é caracterizada por múltiplas placas brancas que apresentam um comportamento clínico persistente e progressivo para malignidade, sendo a sua taxa de transformação maligna de 70%. A calreticulina (CRT) é uma proteína multifuncional que pode apresentar propriedades anti-oncogênicas e oncogênicas. Apesar de seu mecanismo em neoplasias da cavidade oral não ser bem elucidado, existem estudos que mostram que a expressão elevada da CRT está relacionada com um prognóstico desfavorável da doença. Contudo, ainda não existem trabalhos que avaliam a expressão de CRT em DPMOs. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos específicos: (1) realizar uma revisão sistemática da literatura com intuito de avaliar a expressão de CRT e o seu valor prognóstico em pacientes com diferentes tipos de carcinomas; (2) avaliar a expressão imuno-histoquímica de CRT em DPMOs; (3) avaliar a expressão gênica de CRT em DPMOs. Na revisão sistemática foram encontrados 2100 artigos, mas somente 13 estavam dentro dos critérios de inclusão do nosso trabalho. Na meta-análise obtivemos uma diferença estatística significativa em que homens apresentam 2.13 vezes mais chances de apresentar alta expressão de CRT. Na análise imuno-histoquímica foram utilizadas 190 amostras parafinadas adquiridas através de biopsias de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO, LVP, e hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI). As amostras foram avaliadas segundo a intensidade de marcação na qual apresentou um aumento na expressão de CRT no grupo LVP em relação ao grupo LO. Na análise da expressão genica da CRT realizou-se por meio da técnica de reação de PCR quantitativo em tempo real. Neste experimento foram utilizados fragmentos de tecidos lesionais congelados de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de HFI, LO, LVP no qual revelou uma modulação na expressão de CRT, na qual houve uma redução na expressão no grupo LO quando comparado ao grupo HFI e um aumento da expressão de CRT no grupo LVP quando comparado ao grupo LO. Com os nossos resultados concluímos que há uma superexpressão de CRT na LVP e que este achado pode estar correlacionado com o sua alta taxa de transformação maligna.

Palavras – chave: Leucoplasia oral. Calreticulina. Imuno-histoquímica. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

Palaçon MP. Calreticulin expression. In malignant neoplasms and potentially malignant disorders. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The neoplasms that affect the oral cavity 95% of them are diagnosed as squamous cell carcinoma and these tumors are often preceded by clinical changes that present a rate of malignant transformation, called potentially malignant oral disorders (OPMDs). Among them, the most common is oral leukoplakia (OL) which is defined as "a white plaque of questionable risk defined after excluding other known diseases or disorders that mimic this aspect but carry no known risk for cancer. ", and its malignant transformation rate from 0.3 to 13.8%. Proliferative verrucous leukoplakia (PVL) is characterized by multiple white plaques that present a persistent and progressive clinical behavior towards malignancy, with a malignant transformation rate of 70%. In the early phases of LVP, it can clinically and histopathologically mimic other DPMOs, such as oral lichen planus and/or oral lichenoid lesions. Calreticulin (CRT) is a multifunctional protein that may have anti-oncogenic and oncogenic properties. Although its mechanism in oral cavity neoplasms is not so well elucidated, there are studies that show that the high expression of CRT is related to a poor prognosis of the disease. However, there are still no works evaluating the expression of CRT in OPMDs. Thus, the present study had the following specific objectives: (1) to carry out a systematic review of the literature in order to evaluate the expression of CRT and its prognostic value in patients with different types of carcinomas; (2) to evaluate the immunohistochemical expression of CRT in OPMDs; (3) to evaluate CRT gene expression in OPMDs. In the systematic review, 2100 articles were found, but only 13 were within the inclusion criteria of our work. In the meta-analysis, we obtained a statistically significant difference in that men are 2.13 times more likely to have high CRT expression. In the immunohistochemical analysis, 190 paraffin samples acquired through biopsies of patients with clinicopathological diagnosis of LO, PVL, and inflammatory fibrous hyperplasia (HFI) were used. The samples were evaluated according to the labeling intensity which showed an increase in CRT expression in the LVP group compared to the LO group. The analysis of CRT gene expression was performed using the technique of real-time quantitative PCR reaction. In this experiment, fragments of frozen lesional tissues from patients with clinical-pathological diagnosis of HFI, LO, LVP were used, which revealed a modulation in the expression of CRT, in which there was a reduction in expression in the LO group when compared to the HFI group and an increase of CRT expression in the LVP group when compared to the LO group. With our results, we conclude that there is an overexpression of CRT in LVP and that this finding may be correlated with its high rate of malignant transformation.

Keywords: Leukoplakia, Oral. Calreticulin. Immunohistochemistry. Real-Time Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Desordens Potencialmente Malignas da Mucosa Oral	15
3.2 Calreticulina	16
4 MATERIAL E MÉTODO	20
4.1 Estudo 1: Revisão Sistemática da Literatura	20
4.1.1 Extração de dados e questão do estudo	20
4.1.2 Critérios de elegibilidade	20
4.1.3 Estratégia de busca	21
4.1.4 Taxa de risco de viés	21
4.1.5 Meta-análise	21
4.2 Estudo 2: Expressão Imuno-Histoquímica de CRT em DPMOs.....	22
4.2.1 Amostras para análise imuno-histoquímica	22
4.2.2 Reação de imuno-histoquímica	22
4.2.3 Digitalização e análise da marcação imuno-histoquímica	23
4.2.4 Análise estatística	24
4.3 Estudo 3: Avaliação da Expressão Gênica de CRT em DPMOs	24
4.3.1 Isolamento do RNA total ..	24
4.3.2 Análise da concentração e integridade do RNA	25
4.3.3 Síntese de cDNA	25
4.3.4 Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	26
4.3.4 Análise estatística	26

5 RESULTADO	27
5.1 Revisão Sistemática e Meta-análise	27
5.1.1 Resultado da pesquisa	27
5.1.2 Síntese de resultado	29
5.1.3 Taxa de risco de viés para estudos não-randomizados	35
5.1.4 Meta-análise	35
5.2 Análise Imuno-Histoquímica de CRT em DPMOs	40
5.3 A Expressão Gênica de CRT está Aumentada na LVP Quando Comparada com a LO	42
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO	53

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular oral (CECO) ou também conhecido como carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide representa de 92 a 95% das neoplasias que acomete a cavidade oral^{1,2}. Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) no Brasil para o triênio de 2020-2022 é estimado 15190 novos casos de câncer de boca e orofaringe³. Mesmo com o avanços nos tratamentos das neoplasias malignas, a taxa de sobrevivência de 5 anos para o CECO continua de 50 a 60% dos casos¹. Desta forma, prevenir e diagnosticar lesões em estágios iniciais leva a um prognóstico melhor do paciente e conseqüentemente, uma melhor qualidade de vida. Sendo assim, o estudo das desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) é importante para buscar entender mecanismos moleculares e o processo de carcinogênese destas lesões.

As DPMOs são definidas como um significativo grupo de desordens da mucosa oral que podem preceder o diagnóstico de CEC⁴. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) são classificadas como DPMOs: leucoplasia, eritoplasia, eritroleucoplasia, queilite actínica, líquen plano, queratose do tabaco sem fumaça, lesões no palato associadas ao fumo invertido, candidíase crônica, além de outras como fibrose submucosa oral, disqueratose congênita, lúpus eritematoso discóide e glossite sifilítica⁵. Recentemente houve uma revisão na classificação e nomenclatura das DPMOs, na qual foram adicionadas duas novas lesões: lesões liquenóides orais, e a doença do enxerto *versus* hospedeiro⁶.

Dentre os fatores de risco que as DPMOs estão associadas, podemos destacar o tabaco e o álcool, nóz de areca e até mesmo aquelas que tem uma etiologia desconhecida. Estas desordens podem acometer toda a cavidade oral, porém cada lesão tem uma predileção por um sítio⁵.

A leucoplasia (LO) é a DPMO mais comum, possui uma prevalência de 2% das lesões que acometem a cavidade oral⁷. Ela é definida como uma placa branca não raspável que pode apresentar 2 tipos, sendo homogênea ou não homogênea, de risco questionável, após a exclusão de outras lesões conhecidas⁵. Sendo assim, o termo LO é um termo clínico que para o diagnóstico final depende da realização de biopsia e análise histopatológica. Os sítios de maior acometimento são o vermelhão do lábio, mucosa jugal e gengiva, e ainda tem uma predileção pelo homens com mais de 40 anos⁸. Os fatores de risco relacionados a LO são semelhantes ao do CECO, como o

tabagismo e o consumo de álcool, e a exposição a radiação ultravioleta em casos que acometem o vermelhão do lábio⁸.

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é apresentada como uma placa branca, não raspável, de aspecto verrucoso, exofítico, multifocal, com prevalência para a gengiva, palato e mucosa alveolar⁵. Diferente da LO, esta lesão apresenta um comportamento clínico agressivo, sendo a sua taxa de transformação maligna de 70 a 100% dos casos, e persistente uma vez que possui alta taxa de recorrência^{8,9}. A LVP tem uma prevalência em mulheres acima de 60 anos, e na maioria das vezes não fumantes¹⁰. O diagnóstico depende da associação clínica e histopatológica a longo prazo e o acompanhamento clínico é essencial para observar o curso desta lesão pois não é possível prever quais irão progredir para CECO⁹.

A LO e LVP apresenta características histopatológicas semelhantes, caracterizando-se como lesões displásicas, uma vez que elas podem se apresentar desde uma hiperplasia epitelial com presença ou não de displasia até um carcinoma *in situ*. O grau de displasia encontrado nestas duas DPMOs podem ser divididos em: displasia leve, displasia moderada e displasia severa sendo que a última apresenta um potencial de malignidade maior quando comparado as que apresentam displasia leve^{9,10}.

Partindo deste princípio, entender melhor as DPMOs é uma estratégia importante para elucidar os mecanismos moleculares relacionados a carcinogênese oral. Com base nos trabalhos citados anteriormente e em conjunto com resultados preliminares da análise do epitélio por meio de análise proteômica realizada pelo nosso grupo de pesquisa, foi identificado um grupo de proteínas mais expressa na LVP em relação a LO e o grupo controle. Dentre este grupo de proteínas, a calreticulina (CRT) foi identificada, apresentando um fold change grupal de 1,7 quando comparada às amostras de LO e 1,6 em relação ao controle.

A calreticulina (CRT) é uma proteína multifuncional encontrada principalmente no lúmen do retículo endoplasmático (RE), mas que pode se deslocar para a membrana plasmática, citoplasma e núcleo^{11,12}. Sua estrutura é formada por 3 domínios: domínio N, domínio P, domínio C¹¹. As funções da CRT dependem da sua localização nas estruturas celulares, sendo que no RE apresenta a sua principal função que é o armazenamento e homeostase de cálcio, já fora do RE a CRT pode participar na adesão celular, ativação do sistema complemento, na fagocitose de células apoptóticas e na estabilidade de RNA¹²⁻¹⁴.

Quando relacionada com o câncer a CRT apresenta papel na sinalização fagocítica, na morte celular imunogênica, na proliferação celular, na regulação da atividade das integrinas, na adesão e migração celular¹³. A exposição da CRT é uma característica da morte celular imunogênica a qual ativa o sistema imunológico contra as células tumorais, emitindo um sinal fagocítico para identificar estas células e conseqüentemente eliminá-las^{15,16}. Bem como, estudos mostram também a relação da CRT com o câncer na ativação do sistema imune ativando linfócitos T e B e algumas vias de sinalização¹⁷⁻¹⁹.

Além disso, há outra propriedade oncogênica desta com a mutação que ocorre no gene da CRT. Há 2 tipos, a do tipo 1 que é a deleção de 52 pares de bases e a do tipo 2 que é a inserção de 5 pares de bases²⁰. Estas mutações geralmente mudam a estrutura da CRT que traz conseqüências na ligação do cálcio e aumento do crescimento celular, de modo que a CRT mutante se ligará às células dendríticas inibindo a fagocitose das células tumorais^{11,21}.

Sendo assim, é notado que a CRT apresenta dupla ação: oncogênica e anti-oncogênica. Mesmo que o papel da CRT no câncer não foi muito bem elucidado ainda estudos mostram que esta proteína tem uma baixa ou alta expressão em alguns tumores quando comparados com tecido normal, podendo ainda estar relacionado positivamente ou negativamente com o prognóstico destes tumores^{11,12,16}. Sendo assim, a CRT pode ser um biomarcador e/ou um agente terapêutico importante para algumas neoplasias. Portanto, estudar o mecanismo de ação da CRT em DPMOs é uma possível forma de entender o curso clínico da lesão bem como o seu potencial de transformação maligna.

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste trabalho estão apresentados a seguir.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão e o papel da CRT no prognóstico de diferentes tipos de carcinomas orais e extra-orais, assim como analisar a expressão desta proteína em DPMOs.

2.2 Objetivos Específicos

Objetivo 1: Realizar uma revisão sistemática da literatura para acessar o valor prognóstico da expressão de CRT em diferentes tipos de carcinomas orais e extra-orais.

Objetivo 2: Comparar a expressão imuno-histoquímica da CRT em DMPOs e carcinoma para tentar correlacionar com o potencial de transformação maligna.

Objetivo 3: Avaliar a expressão gênica de CRT em DPMOs e carcinoma por meio da Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Desordens Potencialmente Malignas da Mucosa Oral

As DPMOs são apresentações clínicas que carregam um risco de transformação para uma neoplasia maligna, mais comumente o CEC⁴. Segundo a Organização Mundial da Saúde, são consideradas DPMOs a leucoplasia oral (LO), eritroplasia, eritroleucoplasia, queilite actínica, líquen plano, queratose do tabaco sem fumaça, lesões no palato associadas ao fumo invertido, candidíase crônica, além de outras como fibrose submucosa oral, disqueratose congênita, lúpus eritematoso discóide e glossite sífilítica⁵.

A taxa mundial de prevalência das DPMOs varia de 1% a 5%^{22,23}. Existem diferentes fatores de risco que podem levar ao aparecimento das DPMOs, bem como o uso de tabaco e consumo de álcool no caso das leucoplasias, noz de areca nos casos de fibrose submucosa, porém várias DPMOs não possuem fator etiológico conhecido. As diferentes DPMOs podem acometer qualquer sítio da cavidade oral, porém cada lesão parece apresentar uma predileção por um sítio específico^{5,24}. O diagnóstico depende da associação clínica com o exame histopatológico, sendo que este pode apresentar hiperplasia, hiperqueratose, e displasia epitelial, ou CEC quando houve a transformação maligna²³.

A LO, a mais comum dentre as DPMOs, é definida como “placa branca de risco questionável que exclui outras doenças ou distúrbios conhecidos e que não apresentam risco aumentado de câncer” e possui uma prevalência de aproximadamente de 2% e a taxa de transformação maligna é de 0,3 a 13,8%^{7,25}. Há uma predileção pelo sexo masculino, de meia idade à idosos, com etiologia advinda do uso de tabaco, álcool, e algumas vezes de origem idiopática². Apresenta duas formas clínicas: homogêneas e não-homogêneas, sendo que a segunda apresenta maior potencial de malignidade. Quando comparada a taxa de transformação maligna, as LO homogêneas possuem um risco de 3% de transformação, já a forma não homogênea de 13,4 a 14,5%¹⁰. Microscopicamente é possível identificar 5 aspectos histopatológicos que variam de hiperplasia epitelial com presença ou não de displasia (podendo ser leve, moderada e severa) até um carcinoma in situ⁹.

O termo leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) foi definido pela primeira vez por Hansen e colaboradores (1985), que descreveram uma desordem agressiva de etiologia desconhecida e tendência a se tornar multifocal ao longo do tempo.

Inicialmente as lesões de LVP são assintomáticas, pequenas, bem definidas, com ou sem espessamento superficial e, com a progressão da doença, passa a ser caracterizada por placas brancas difusas e múltiplas, envolvendo várias áreas da mucosa oral, sendo que a gengiva é a área de maior acometimento¹⁰. A prevalência é quatro vezes maior no gênero feminino, sendo frequentemente diagnosticada a partir da sexta década de vida em indivíduos usualmente não fumantes. Apresenta alta taxa de recorrência e um índice de transformação maligna que varia de 70% até 100% dos casos após acompanhamento a longo prazo^{9,26,27}. O diagnóstico da LVP não pode ser baseado na análise histopatológica de uma lesão clinicamente isolada, e sim no decorrer da evolução clínica e patológica para conclusão do diagnóstico, uma vez que inicialmente esta lesão pode ter aspectos clínicos e microscópicos que caracterizam outros tipos de lesão, por exemplo o líquen plano oral e/ou lesões liquenóide oral²⁸.

3.2 Calreticulina

A calreticulina (CRT) é uma proteína multifuncional que foi descrita pela primeira vez em 1974¹⁶. A CRT possui um peso molecular de 46KDa e é encontrada principalmente no lúmen do retículo endoplasmático, podendo se deslocar para membrana plasmática, citosol e núcleo^{11,12}. Sua estrutura é composta por 3 domínios: domínio N, domínio P e domínio C. O primeiro deles é de formato globular, faz interação com as α -integrinas e liga-se ao DNA do receptor; o segundo domínio é rico em prolina, e é a região de ligação de cálcio; por fim, o domínio C é uma região em que o cálcio se liga e interage com proteínas chaperonas^{12,13}. Dentre as funções da CRT, temos que dividi-las conforme a sua localização. Dentro do lúmen do retículo endoplasmático (RE), tem a finalidade de dobramento de proteínas (proteína chaperona) e na homeostase e armazenamento de cálcio, contribuindo para a adequada contração, expressão, síntese proteica e sinal de estresse celular. Fora do lúmen do RE a CRT participa da adesão celular, reparo tecidual, resposta imune adaptativa, ativação do sistema complemento, fagocitose de células apoptóticas e estabilidade do RNA¹²⁻¹⁴.

Sabe-se que a expressão da CRT tem relação com o câncer, com alguns estudos mostrando que esta proteína está mais expressa em tecidos tumorais em relação aos tecidos normais, bem como podem estar associadas positivamente ou negativamente com o prognóstico destes tumores^{11,12,16}. Atualmente, existem estudos

que avaliam a expressão da CRT em câncer de pulmão, ovário, gastrointestinal, mama, trato urinário¹³. Estes estudos indicam que a CRT possui um papel tanto na promoção como na supressão do câncer, bem como no CECO a expressão da proteína CRT é relacionada ao prognóstico da lesão^{12,30}. Um estudo utilizando a técnica da imuno-histoquímica revelou que a expressão elevada da CRT está associada com uma baixa sobrevida e conseqüentemente um pior prognóstico de paciente com CECO³⁰. Contudo, são necessários estudos adicionais para investigar quais os mecanismos da CRT estão de fato relacionados com o desenvolvimento do CECO.

Dentre as funções da CRT no câncer podemos destacar a sua expressão como um sinal fagocítico, morte celular imunogênica (MCI), proliferação celular, regulação da atividade de integrinas, adesão celular e migração celular¹³. A morte celular imunogênica é definida como a capacidade de estímulos específicos para matar células, sendo mediada por padrões moleculares associados a danos (DAMPs), isto é, moléculas que não são acessíveis pelo sistema imunológico em condições normais. A exposição da CRT é uma característica da MCI, a qual proporciona a ativação do sistema imunológico contra o câncer^{15,16}. O uso de agentes terapêuticos para o câncer, por exemplo a quimioterapia e a radioterapia, provocam um estresse no RE levando a translocação de CRT para a superfície das células cancerígenas. Em conseqüência, a CRT atua como um sinal fagocítico, sendo estas células reconhecidas e eliminadas pelos fagócitos. Este reconhecimento facilita a apresentação de antígenos tumorais pelas células dendríticas (CD), e as respostas de linfócitos T citotóxicos específicos e posteriormente células B^{31,32}. Estudos sobre a exposição da CRT na superfície celular são de grande importância, uma vez que estão envolvidos com tratamentos para câncer. Contudo, muitos mecanismos no direcionamento da CRT para a superfície celular ainda são pouco descritos. A maior hipótese é que inicialmente há o estresse do RE ativando uma série de proteínas, em especial aquelas relacionadas com a via da apoptose celular, incluindo fatores como a caspase 8, Bax, Bac, Bcl-2. Finalmente, esse processo termina com a exocitose por meio da via dependente de SNARE (proteína de tráfego vesicular), onde a CRT e o ERp57 são trazidos para a superfície externa da membrana plasmática pelas vesículas do Complexo de Golgi¹⁴.

Além disso, estudos mostram que a expressão da CRT está associada a mecanismos do sistema imune. Duo et al, em seu estudo revelou que a CRT induz a

transcrição ativa do mRNA através da ativação das vias de sinalização da MAPK e NFκB em macrófagos, e por consequência, ativa a produção de TNF-α e IL-6¹⁷. Da mesma forma, a baixa expressão de CRT pode estar associada com um infiltrado inflamatório de células T, e consequentemente, isto pode gerar uma via anti-oncogênica no câncer de cólon¹⁸. Outro estudo mostrou que a CRT pode ser um alvo molecular de células B em algumas neoplasias, como por exemplo em algumas neoplasias gastrointestinais¹⁹.

Podemos destacar também as propriedades oncogênicas relacionadas com as mutações que ocorrem no gene que sintetiza a CRT. São encontradas mais de 50 tipos de mutações que envolvem a CRT e todas elas são encontradas no exon 9. Há dois tipos de mutação: a do tipo deleção (tipo 1), em que há a exclusão de 52 pares de bases (pb), ou do tipo de inserção (tipo 2), a qual se tem a adição de 5 pb. Estes tipos de mutação representam 84% (50% tipo 1 e 34% tipo 2) daquelas que envolvem a CRT^{20,33}. Estas mutações produzem proteínas modificadas no terminal C que trazem como consequência a falta de um sinal de retenção no RE (sinalizador KDEL) e sua localização pode ser alterada, ocorrendo sua secreção no complexo de Golgi³¹. Essa modificação na estrutura da proteína traz como consequências problemas na ligação com o cálcio e desencadeamento do aumento do crescimento celular, uma vez que a CRT mutante se ligará as CD inibindo a fagocitose das células tumorais^{11,31}. A grande maioria dos estudos relacionados com a mutação da CRT são feitos em neoplasias mieloproliferativas. Estes estudos iniciaram em 2013 e levaram os pesquisadores a entenderem melhor o papel da CRT no processo de transformação maligna de lesões mieloproliferativas e consequentemente, a OMS passou a adotar estas mutações como um marcador diagnóstico para este grupo de lesões³⁴. Estudos com pacientes saudáveis revelaram que apenas uma pequena parte de indivíduos saudáveis possuíam o gene CRT mutado e como resultado, observou-se um aumento de células T CD4+, caracterizando uma resposta imune eficiente. Isto quer dizer que estas células T ativadas eram de memória, uma vez que anteriormente houve um contato prévio com a CRT mutada e o sistema imunológico combateu o desenvolvimento errôneo desta proteína³⁵.

Sendo assim, notamos que a CRT apresenta dupla propriedade, isto é, ações oncogênicas e anti-oncogênicas³⁶. Apesar de não existirem estudos muito amplos sobre a expressão de CRT e seu envolvimento com os diversos tipos de carcinomas, tem sido demonstrado que sua alta expressão pode comprometer a proliferação e

migração destas células tumorais. Concluindo, assim, que a CRT possui uma função importante nas células epiteliais e que ela pode ser considerada como um biomarcador ou alvo terapêutico para carcinomas¹².

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado na sessão de 09 de novembro de 2021 e foi realizado de acordo com a Resolução de nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do CNS e aprovado pelo CEP/FOAr – Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (protocolo CAAE 35883320.2.0000.5416; Anexo A).

4.1 Estudo 1: Revisão Sistemática da Literatura

4.1.1 Extração de dados e questão do estudo

A estratégia PICO guiou o planejamento do revisão sistemática assim como os critérios de inclusão de artigos, sendo que P: pacientes diagnosticados com carcinomas humano; I: expressão de CRT em pacientes com ou sem carcinoma humano; C: pacientes sem carcinoma humano e diferente expressão de CRT em parâmetros clínico-patológico e prognósticos de pacientes diagnosticados com carcinoma; O: Desfecho principal: os níveis de expressão de CRT em pacientes com carcinoma. Desfecho secundário: níveis de expressão de CRT em pacientes diagnosticados com carcinoma associando com parâmetros clínico-patológico e prognóstico. O presente estudo buscou responder a seguinte pergunta “Há uma diferença nos níveis de expressão de CRT em carcinomas e estes níveis podem estar relacionado com o parâmetros clinico-patológico e prognóstico?”

4.1.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão do presente estudo foram estudos humanos observacionais, pacientes diagnosticados com carcinomas e estudos que avaliaram a expressão de CRT em carcinomas humano. Não foi determinada restrição sobre a localização do carcinoma e a linguagem aplicada. Os critérios de exclusão foram estudos *in vitro*, estudo em animais, estudos que avaliaram a expressão de CRT em outra origem do câncer (por exemplo adenocarcinoma), pacientes que foram diagnosticados com carcinoma e que apresentavam imunodeficiência, relatos de caso e capítulos de livros.

4.1.3 Estratégia de busca

A seguinte palavra chave foi utilizada para a busca nas bases de dados: ((Calreticulin) OR (CALR)) AND (Squamous cell carcinoma). A busca foi realizada nas seguintes bases de dados: PUBMED, SCOPUS, COCHRANE, WEB OF SCIENCE, LILACS e SCIENCE DIRECT. Dois pesquisadores realizaram a primeira seleção dos artigos pela leitura de título e resumo. Os artigos selecionados para leitura completa foram adicionados em uma tabela. O software Rayyan for Systematic Reviews Software® foi utilizado para remover os artigos em duplicatas.

4.1.4 Taxa de risco de viés

A ferramenta de avaliação de risco de viés para estudos não randomizados (RoBANS) foi usada ³⁷. Resumidamente, esta ferramenta tem seis domínios; seleção de participantes (viés de seleção causado por seleção inadequada de participantes), variáveis de confusão (viés de seleção causado por confirmação inadequada e consideração de variável de confusão), medição de intervenção / exposição (viés de desempenho causado por medição inadequada de intervenção / exposição), mascaramento do resultado avaliado (viés de detecção causado por cegamento inadequado da avaliação de resultados), dados de resultados incompletos (viés de atrito causado pelo manuseio inadequado de dados de resultados incompletos) e relatórios de resultados seletivos (viés de relatórios causados por relatórios de resultados seletivos). Por fim, para cada domínio, existem apenas três respostas possíveis sobre o risco de viés (baixo, pouco claro e alto).

4.1.5 Meta-análise

A meta-análise foi realizada no software R (versão 3.6.3) sendo $\alpha=0.05$. O gênero (feminino e masculino) relatado na baixa e alta expressão de CRT, assim como gênero (feminino vs. masculino), presença de linfonodos metastáticos e estágio clínico (I-II vs. III-IV) para altos níveis de CRT foram usados nos desfechos da meta-análise. O odds ratio foi a medida de efeito selecionada, os resultados foram interpretados usando o método aleatório e método de variância inversa foi usado para realizar a meta-análise. No caso de dados esparsos, foi utilizado o método "Peto" (uma variante do método da variância inversa). Para detectar o viés de publicação relacionado ao efeito do pequeno estudo na meta-análise, o método trim-and-fill foi conduzido. Alto nível de heterogeneidade foi considerado para $I^2 >50\%$.

4.2 Estudo 2: Expressão Imuno-Histoquímica de CRT em DPMOs

4.2.1 Amostras para análise imuno-histoquímica

O presente estudo pretendeu avaliar aproximadamente 190 amostras parafinadas de DPMOs (LO e LVP) e hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) que será nosso grupo controle. Essas amostras são oriundas de pacientes da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade de Santiago de Compostela (Espanha) e Universidade de Helsinki (Finlândia). As amostras da Espanha e Finlândia foram doações de pesquisadores responsáveis para aprimorar os resultados, completar validação e consolidar pesquisas multicêntricas. Todos os pacientes incluídos neste estudo tiveram seu diagnóstico estabelecido com base nos achados clínico-patológico proposto pela classificação de 2017 da OMS para tumores de cabeça e pescoço.

Uma vez incluídos no estudo, os blocos de parafina foram submetidos a dois novos cortes com 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) e posteriormente analisados para descrição morfológica e confirmação do diagnóstico. O grau de displasia epitelial foi determinado com base nos critérios propostos pela OMS. A análise do risco de transformação maligna dos casos de LO e LVP foi feita conforme os critérios propostos por Kujan e colaboradores (2006), os quais foram recomendados em uma última reunião patrocinada pela OMS, sugerindo classificar às DPMOs em dois tipos: (i) baixo risco (nenhuma alteração/questionável/displasia leve) e (ii) alto risco (displasia moderada e severa).

4.2.2 Reação de imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas com a técnica da estraptavidina-biotina-peroxidase. Os cortes histológicos foram diafanizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool, tratados com peróxido de hidrogênio a 3%, seguido por incubação com 10nM ácido cítrico pH=6 em panela de pressão elétrica tipo Pascal. Depois de lavados com salina tamponada com fosfato (PBS), os cortes foram tratados com 1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS por 1h e incubados com anticorpo primário monoclonal contra CRT humana (ABCAM), seguidos pelo método ABC (Dako Corp.). As reações foram relevadas com solução de 0,06 mg/ml de 3,3'-diaminobenzina tetrahidrocloreto (DAB, Sigma-Aldrich) acrescida de 1% de H₂O₂ e 1% de DMSO. As lamínas foram contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos foram sempre realizados.

Quadro 1 – Anticorpo primário utilizado na análise de imuno-histoquímica

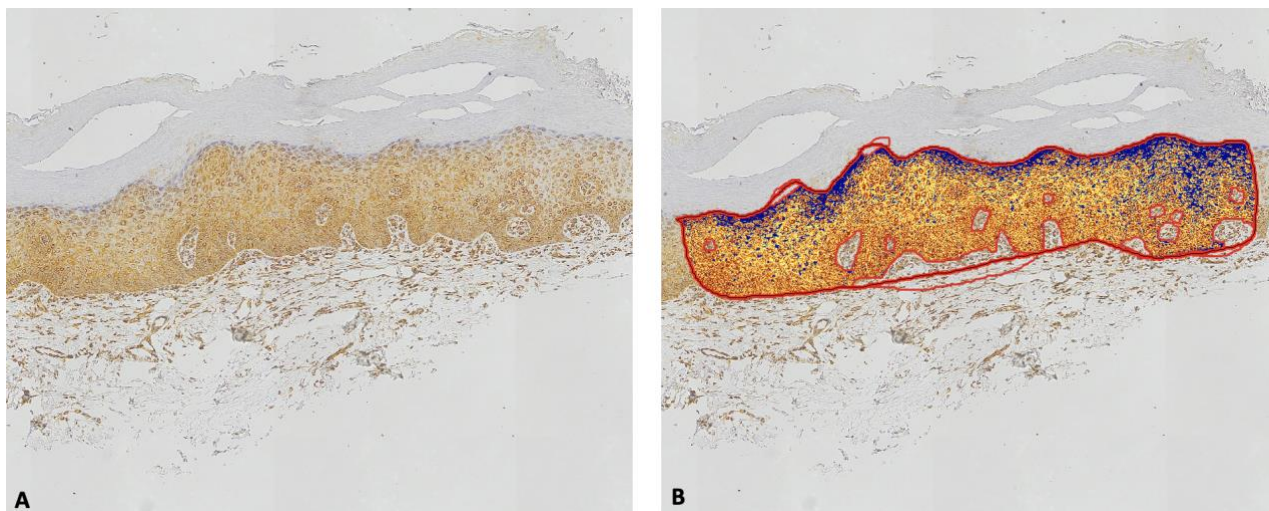
Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
Cal-reticulín	FMC 75	Abcan (ab22683)	1:2.000

Fonte: Elaboração própria.

4.2.3 Digitalização e análise da marcação imuno-histoquímica

As lâminas foram digitalizadas por meio do Scanner ScanScope AT Turbo na Rede de Laboratórios Multiusuários – RELAM/PROPP-UFU. A análise da expressão da CRT foi avaliada com auxílio do Software do Aperio ImageScope 12.4.3 (Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc., EUA). A análise da imuno-histoquímica foi realizada as cegas e os grupos foram divididos após a quantificação da intensidade de marcação. O algoritmo “positive pixel count V9” (Aperio ImageScope 12.4.3, EUA) foi utilizado para definir a pontuação qualitativa para a expressão da CRT no tecido epitelial levando em consideração a intensidade de pixel e a porcentagem de células marcadas. O cálculo da intensidade de marcação foi determinada segundo o estudo realizado por Chang et al. (2010)³⁸. Em síntese, as intensidades de marcação forte, média, fraca e negativa foram pontuadas como 3, 2, 1, e 0, respectivamente, e a porcentagem de células para cada uma das intensidades foi estimada a partir da intensidade total de pixels de cada marcação. A pontuação resultante foi calculada por meio das somas das porcentagens de células marcadas multiplicadas pelas pontuação estabelecida para cada intensidade de marcação, obtendo-se uma pontuação mínima possível igual a 100 e máxima de 300. A figura 1 representa uma imagem representativa da quantificação da intensidade de marcação imuno-histoquímica da CRT.

Figura 1 – Imagem representativa da quantificação por pixel da intensidade de marcação imuno-histoquímica da CRT



A) Representação da marcação da intensidade de CRT. **B)** Representação da quantificação por pixel da intensidade de marcação imuno-histoquímica da CRT (azul-negativo; amarelo-baixa intensidade; laranja- intensidade moderada; vermelho-alta intensidade).

Fonte: Elaboração própria.

4.2.4 Análise estatística

Os dados das análises foram tabulados e inicialmente realizou-se a estatística descritiva. A distribuição normal foi avaliada pela assimetria e curtose e a presença de outliers foi verificada. A homocedasticidade foi avaliada por meio da variância pelo teste de Brown-Forsythe. Por fim, foi realizada a análise multivariada (ANOVA) com pós teste de Tukey. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ($p=0.05$) e o software IBM SPSS Statistics 20.0 ($p=0,05$) e a imagem gráfica foi construída usando GraphPad Prism versão 6.0.

4.3 Estudo 3: Avaliação da Expressão Gênica de CRT em DPMOs

4.3.1 Isolamento do RNA total

Para análise da expressão gênica de CRT foram utilizadas amostras de cada de tecidos congelados previamente coletados de pacientes com diagnóstico de LO, LVP e HFI. Essas amostras foram divididas em 3 grupos, sendo o grupo 1 representado pelo grupo controle (HFI), o grupo 2 pela LO e o grupo 3 pela LVP, e para cada um deles foi utilizado 10 amostras coletadas. Os tecidos foram incubados com 700 μ l do reagente Trizol (Invitrogen, EUA), macerados com o uso de um pistilo

e mantidos por 5 min em temperatura ambiente. Após, foi adicionado de 140 µl de clorofórmio para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 segundos foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 min em 9000g em temperatura de 4° C. A fase aquosa da solução foi transferida para os tubos novos e 350 µl de álcool isopropanol foram adicionados para precipitação do RNA. Esta mistura foi homogeneizada, incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 9000 g a 4° C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 700 µl de 15% etanol gelado. Após nova centrifugação a 6000 g a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspenso em água livre de DNase e de RNase e estocado na temperatura de -80° C até o momento de utilização.

4.3.2 Análise da concentração e integridade do RNA

A concentração de RNA foi determinada pelas absorbâncias com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA). A pureza e integridade do RNA foram confirmadas com eletroforese em gel de agarose a 1,2% contendo 1,8 ml de formaldeído na concentração de 37% E 0,2 µg de brometo de etídio. Dois microgramas de RNA foram com tampão de aplicação (solução aquosa de 30% glicerol, 0,25% azul de bromefenol e 0,25% xilenocianol) e aquecidos durante 5 min a 65° C. Após a separação eletroforética o gel foi documentado com o sistema Kodak Digital Science™ equipado com câmera digital DC40 (Eastman Kodak Co., EUA).

4.3.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, 1 µg de RNA total foi reversamente transcrito com o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, EUA) em uma reação com volume final de 20 µL. Foi pipetado 10 µL de amostra com concentração de 1 µg total e 10 µL de Master Mix contendo: 2,0 µL de tampão 10x RT Buffer, 0,8 µL de mistura de 25x de dNTP, 2,0 µL de 10x Random Primers, 1,0 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 1,0 µL de RNase Inhibitor). As reações foram realizadas em termociclador a 15°C por 10 min, 37° C por 120 min e 85° C por 5 min.

4.3.4 Reação de PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas pelo método de quantificação relativa ao gene normalizador GAPDH. As reações foram preparadas em triplicata em placas de 96 poços, utilizando o sistema de detecção GoTaq® qPCR and RT-qPCR Systems (Promega) no aparelho StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Inglaterra) em um volume final de 10 µL. Em cada poço da placa foi pipetado 4 µL do cDNA resultante e foi amplificado na reação 6 µL de Master Mix (5 µL de GoTaq qPCR Mix; 0,5 de cada primer em uma concentração final de 200nM e 0,1 µL de Rox). As condições de amplificação foi de 2 min a 50° C para ativação da enzima AmpErase, 10 min a 95° C durante 15 s e 1 min a 60° C para pareamento dos primers e extensão. Ao final da amplificação, uma etapa adicional de dissociação foi realizada (40 ciclos com um decréscimo de 1° C a 15 s, iniciando-se a 95° C) para geração de uma curva de dissociação (curva de melting) necessária para confirmação da especificidade da amplificação.

As sequencias do gene de interesse e do controle interno utilizados nas reações estão descritos na quadro 2. As reações de qRT-PCR, foram baseadas na concentração ótima de cada primer utilizado, através de diferentes diluições do gene normalizador específico.

Quadro 2 - Pares de primers que serão utilizados nos ensaios de qRT-PCR

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
CRT	AGGATGAGTTTACACAC	TCATCGATCTTGGCCCGCTC

Fonte: Elaboração própria.

4.3.4 Análise estatística

Os dados das análises foram tabulados e inicialmente realizou-se a estatística descritiva. A distribuição normal foi avaliada pela assimetria e curtose e a presença de outliers foi verificada. A homocedasticidade foi avaliada por meio da variância pelo teste de Brown-Forsythe. Por fim, foi realizada a análise multivariada (ANOVA) com pós teste de Tukey. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% (p=0.05) e o software IBM SPSS Statistics 20.0 (p=0,05) e a imagem gráfica foi construída usando GraphPad Prism versão 6.0.

5 RESULTADO

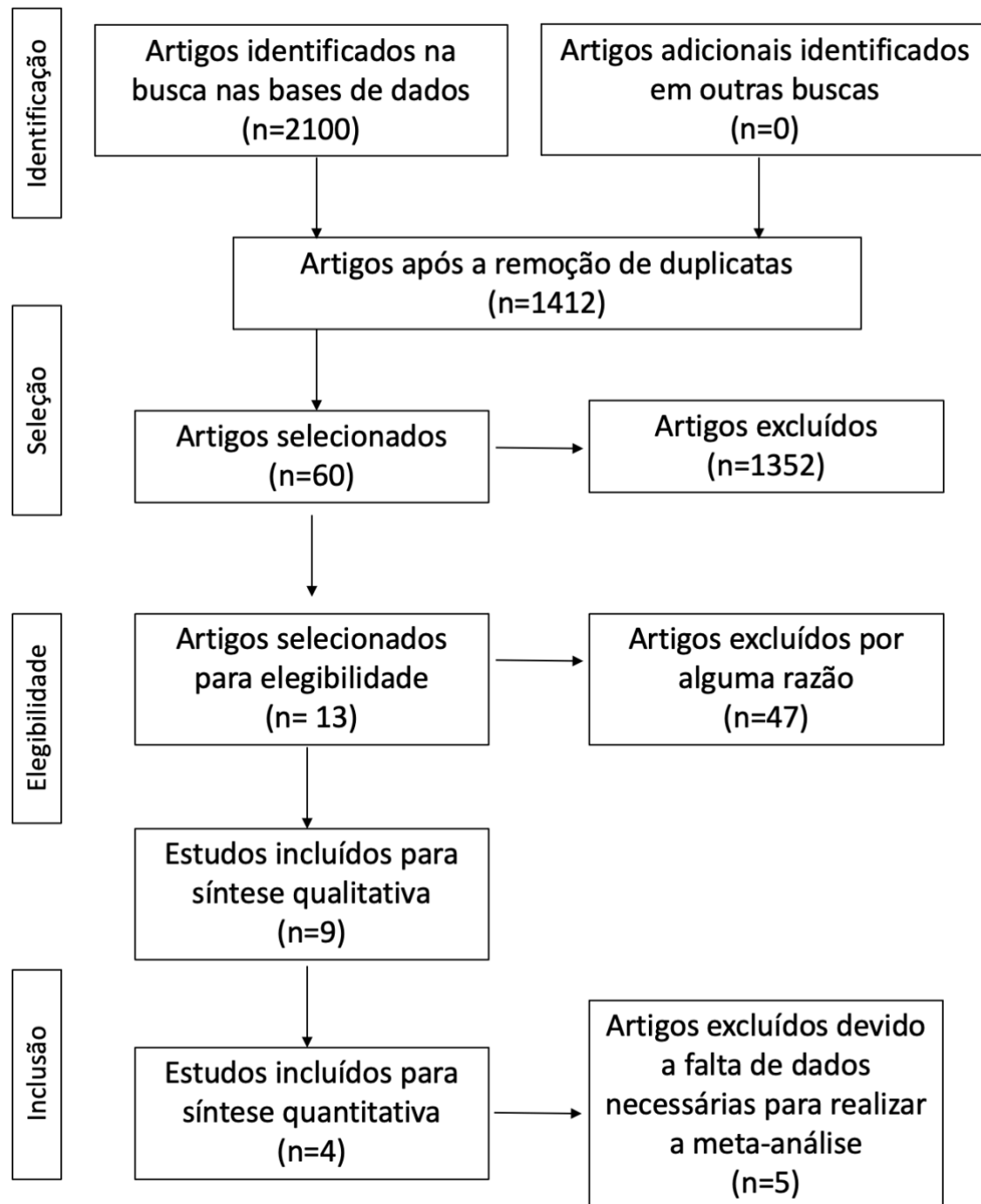
Os resultados obtidos nesse trabalho estão descritos nas seções abaixo.

5.1 Revisão Sistemática e Meta-análise

5.1.1 Resultado da pesquisa

A busca nas bases de dados identificaram: 132 artigos no PUBMED, 165 no SCOPUS, 17 na COCHRANE, 101 no LILALS, 1556 no SCIENCE DIRECT e 129 artigos no WEB OF SCIENCE, totalizando 2100 artigos. Dentre esses, 688 artigos estavam em duplicatas foram removidos, deixando um total de 1412 artigos para a primeira seleção. A primeira seleção realizada pela leitura de título e resumo excluiu 1352 artigos, então para a leitura completa ficaram 60 artigos dos quais 47 foram excluídos pelos critérios de inclusão determinado anteriormente. Sendo assim, somente 13 artigos de estudos observacionais foram selecionados para o nosso trabalho para a extração dos dados (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma do PRISMA detalhando a busca de dados, seleção por título e resumo, e texto completo e estudos incluídos na revisão sistemática



Fonte: Elaboração própria

5.1.2 Síntese de resultados

A extração de dados dos artigos foi realizada pela leitura completa dos estudos, distribuindo os dados em uma tabela (Quadro 3) contendo: autor e o ano de publicação do estudo, a população na qual foi realizada o estudo, a idade dos pacientes que participaram da amostra, o estágio TNM quando presente, o tamanho da amostra do estudo e por fim os resultados que foram apresentado em cada estudo.

Todos os artigos inclusos no nosso trabalho são estudos observacionais que relatam a expressão (alta ou baixa) de CRT em diferentes neoplasias. A neoplasia mais presente no nosso estudo foi o câncer de mama e de cólon. A idade dos pacientes participantes dos estudos variaram de pacientes pediátricos (1-15 anos) até adultos mais velhos (> 29 anos). Bem como, o estágio TNM quando presente nos estudos variou entre eles. A expressão da CRT nos carcinomas presente em nosso estudo foi na grande maioria de alta expressão, sendo que poucos artigos apresentaram uma baixa expressão da CRT.

Quadro 3 – Dados extraídos dos artigos selecionados para o nosso estudo

Autor/Ano	População	Idade	Estágio TNM	Tamanho da amostra	Desfecho
Cooney et al. 2017	Amostra de pacientes da Universidade de Stanford, Departamento de Patologia	45 anos e jovens		G1: n=9 amostras de carcinoma hepatocelular fibrolamelar (FL-HCC) e tecido normal adjacente. G2: n=21 carcinoma hepatocelular (HCC) e tecido normal adjacente.	G1: 100% apresentaram moderada e forte expressão de CRT no tumor e hepatócitos normais adjacentes. G2: 71% apresentaram moderada e forte expressão, 19% fraca e 10% sem expressão de CRT.
Yang et al. 2013	China	CRT baixa expressão: 45 anos CRT alta expressão: 37 anos		Proteômica: n=12 adrenocortical carcinomas primários (ACC) e tecido normal adjacente. Imuno-histoquímica: G1: n=39 ACC e tecido adrenocortical normal. G2: n=31 adenoma adrenocortical (ACA). G3: n=39 tecido adrenocortical normal.	CRT é super-regulada no ACC identificada pela análise proteômica. Há uma alta expressão de CRT no ACC comparada a tecido adrenocortical normal. CRT está superexpressa e mais frequente em estágios avançados de adrenocortical carcinoma do que em estágios iniciais (65% vs 31.6%).
Ye et al. 2021	First Affiliated Hospital of Zhengzhou University	<60: n=9 ≥60: n=23	Estágio N: N0: 28 N1/2: 13 Tamanho do tumor (cm): <5: 21 ≥ 5: 11 Estágio clínico: I-II: 7 III-IV: 25	n=32 tecido de câncer de vesícula e tecido normal adjacente	CRT está aumentada em 25/32 nos tecidos de câncer de vesícula comparada ao tecido normal e a tecidos de colecistite crônica. A expressão mRNA de CRT estava mais expressa em pacientes com tumor ≥5cm comparado com pacientes com tumor de <5cm. Pacientes com alta expressão de CRT têm a prognóstico ruim

					e alto risco de morte comparado a baixa expressão de CRT. A expressão de CRT não tem associação com linfonodos metastáticos, estágio TNM, grau histológico e outros parâmetros clinico-patológico.
Lee, et al. 2012	Penang General Hospital	36-85 anos	N0: n=13 pacientes N1: n=13 pacientes N2: n=12 pacientes	38 pares tecidos de carcinoma de ducto infiltrado (IDC) comparado com tecido normal e tumoral	Proteomica: CRT está superexpressão nos 3 estágios N: N0 - 77%, N1 - 92%, N2 – 83% . Western Blotting: CRT teve alta expressão no tecido tumoral comparado ao tecido normal.
Kabbage et al. 2013	Tunisia	Pacientes com câncer de mama: 29-85 anos (média=48 anos) Mulheres voluntárias saudáveis (controle): 26-75 anos (média=45 anos)		n=66 tecido de tumor de mama e seu soro n=65 soro de mulheres voluntárias saudáveis (controle). Proteomica e ELISA: n=15 tumores e arredores de tecido normal. Imuno-histoquímica: n=35 amostras de carcinomas de ducto mamário infiltrado (IDCAs) e outros tipos de câncer de mama.	Houve uma elevada expressão de CRT nas células epiteliais do tumor quando comparada com o ductos normais. CRT expressa nos IDCAs está restrita ao citoplasma.. A superexpressão de CRT foi encontrada em 3 subtipos de Câncer de mama: 5/7 carcinoma de infiltrado lobular, 2/6 carcinoma medular, 1/3 carcinoma de ducto <i>in situ</i> .
Vaksman et al. 2013.	Noruega	39-79 anos (média=61)		102 espécimes de carcinoma de ovário (55 efusão, 47 espécimes sólido)	RT-PCR mostrou uma expressão de CRT em mRNA em 54 de 55 efusões e todos espécimes sólidos.

					mRNA CRT estava superexpressa em metástases sólidas comparada com efusão e carcinomas primários. A expressão de CRT estava significativamente maior nas metástases sólidas e carcinomas primários comparadas com as efusões. CRT secretada possuía níveis elevados no peritônio comparado com efusão pleural.
Peng et al. 2010.	China	<60 years = 44,1% ≥60 years = 55.9%	T3N1M0	68 amostras de câncer de colón.	A CRT estava marcada no citoplasma. A expressão de CRT estava baixa e no câncer de colón comparado ao epitélio normal adjacente. 61,8% de amostra estavam positivas na CRT.
Du et al. 2007	China			Proteomica n=41 tecido fresco de carcinoma espinocelular de esôfago (ESCC) e tecido normal adjacente. Western blotting: n=4 tecido tumoral e tecido normal de esôfago. Imuno-histoquímica: n=89 amostras de tecido de ESCC parafinado.	Proteomica: CRT estava superregulada no ESCC. Western blotting: CRT estava elevada em todos os tecidos de ESCC. Imuno-histoquímica: Células epiteliais normal de esôfago mostraram marcação negative no citoplasma na maioria dos casos. Células tumorais mostram forte marcação positive no citoplasma.

					A expressão elevada de CRT foi encontrada em 65 de 89 de tumores comparado com células normais do esôfago. A superexpressão de CRT estava relacionada com prognóstico ruim.
Chiang et al.2013	E-Da Hospital			110 amostras de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.	A expressão de CRT estava maior em 6 linhas de OSCC cell lines comparado com o grupo controle. Imuno-histoquímica: 96,1% estava positivo para CRT.
Liu et al. 2012	China	25 - 75 (media de idade, 57 anos)		80 tecidos de câncer de pulmão, 10 tecidos normal de pulmão	A CRT estava significativamente maior no câncer de pulmão do que pacientes saudáveis.
Lwin et al.	Singapura General Hospital	23 - 89 (media de idade, 55.6 anos)		Tecidos de 228 pacientes diagnosticados com carcinoma ducto mama invasivo.	A expressão de CRT no mRNA estava com níveis alto no MDA-MB-231 comparado a MCF-7. A CRT estava localizada no citoplasma das células MCF-7 e MDA-MB23, especificamente na região perinuclear.
Chignard et al.				Tecidos tumorais e não tumorais de 7 pacientes com carcinoma hepatocelular. Soros obtidos de 27 indivíduos saudáveis, 33 pacientes com hepatite crônica, 28 de pacientes com cirrose, 34 de pacientes com carcinoma hepatocelular.	As isoformas de CRT foram reduzidas no carcinoma hepatocelular em comparação com os tecidos não tumorais. Diferença estatisticamente altamente significativa nos níveis séricos de CRT18 entre pacientes com carcinoma hepatocelular e pacientes saudáveis.

Vera et al. 2020	Chile			67 amostras de ovário de mulheres	Houve um aumento nos níveis de mRNA de CRT em amostras de câncer de ovário em comparação com ovários inativos normais, tumores benignos e tumores limítrofes. A análise semi-quantativa dos níveis de proteína CRT revela um aumento desta proteína em amostras de câncer epitelial de ovário em comparação com tumores limítrofes e tumores benignos. Houve uma coloração positiva em todos os humanos
---------------------	-------	--	--	-----------------------------------	---

Fonte: Elaboração própria.

5.1.3 Taxa de risco de viés para estudos não-randomizados

Nesta etapa foi utilizado o critério de pedágio RoBANS. Houve vieses relacionados à seleção dos participantes, o que pode ser explicado pelo fato de alguns Fonte: Elaboração própria os controle pareados, ou pela pequena amostra ou diferença significativa entre o tamanho da amostra do grupo experimental em relação ao grupo de controle. Além disso, para todos os artigos incluídos na revisão sistemática, foram detectados vieses relacionados à avaliação do cegamento (Quadro 4).

Quadro 4 – Ferramenta de risco de viés (RoBANS) para os artigos inclusos no estudo

Estudo	Seleção de participantes	Variáveis confusas	Medida da intervenção	Mascaramento do resultado avaliado	Dados de resultado incompleto	Relatório de resultados seletivos
Chignard et al. 2006	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Du et al. 2007	Pouco claro	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Lwin et al. 2010	Pouco claro	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Peng et al. 2010	Pouco claro	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Lee et al. 2012	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Liu et al. 2012	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Vera et al. 2020	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Chiang et al. 2013	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Kabbage et al. 2013	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Vaksman et al. 2013	Pouco claro	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Yang et al. 2013	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Cooney et al. 2017	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo
Ye et al. 2021	Baixo	Baixo	Baixo	Alto	Baixo	Baixo

Fonte: Elaboração própria.

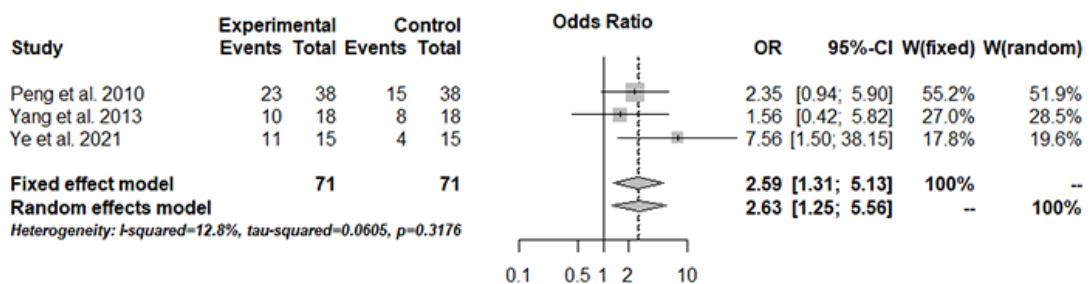
5.1.4 Meta-análise

Após a análise podemos observar que os homens afetados por carcinomas tem 2.613 [1.2456; 5.5590] mais chances de apresentar altos níveis de CRT do que baixos níveis de CRT ($p=0.0112/ I^2=12.8\%$) (Figura 3A). Além disso, não houve viés de publicação e, conseqüentemente, não houve viés de meta-análise para esses resultados (Figura 3B). Em contrapartida, não foram encontrados resultados significativos para o gênero feminino ($p=0,1401 / I^2=83,7\%$) (Figura 4A) e quando comparado se os níveis de CRT poderiam ser influenciados por diferenças entre os sexos ($p=0,8816 / I^2= 0\%$) (Figura 5A). Embora dos altos níveis de CRT serem encontrados com mais frequência em linfonodos metastáticos e em estágio clínico avançado em neoplasias, nenhum resultado significativo na meta-análise (Figura 6).

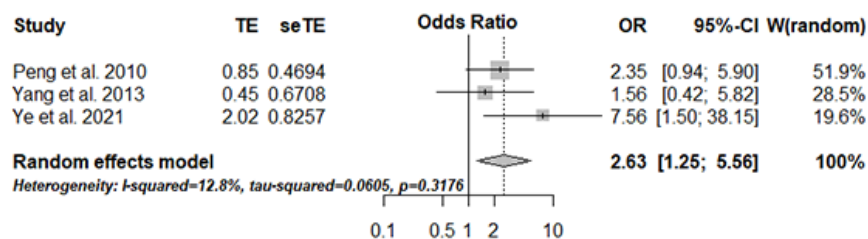
Bem como, foram encontrados vieses de publicação para o gênero feminino (Figura 4B) e diferença entre os sexos (Figura 5B)

Figura 3 – Resultado da meta-análise em relação ao gênero masculino

A



B

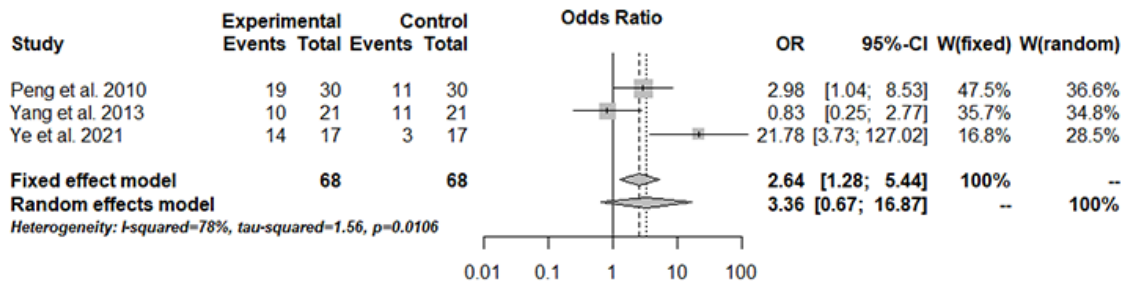


- A)** Resultado da meta-análise do gênero masculino ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado por níveis alto e positivo de CRT, enquanto o grupo controle foi formado por níveis baixos e negativos de CRT. **B)** Resultado do método Trim-and-fill ilustrado em um gráfico tipo forest plot. OR=odds ratio; CI= intervalo de confiança; W=peso; TE= valores estimados para a média; seTE= valores estimados para o desvio padrão.

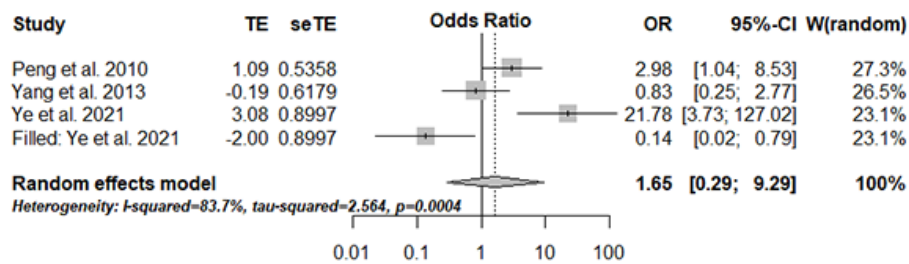
Fonte: Elaboração própria.

Figura 4 – Resultados da meta-análise em relação ao gênero feminino

A



B

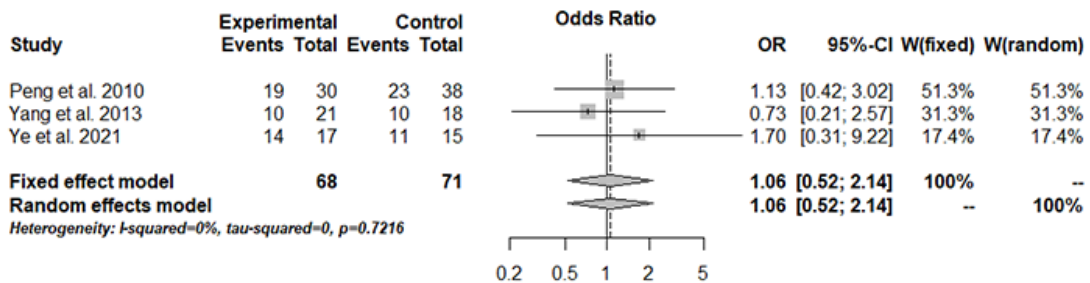


A) Resultados da meta-análise do gênero feminino ilustrados em um gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado por níveis alto e positivo de CRT, enquanto o grupo controle foi formado por níveis baixos e negativos de CRT. **B)** Resultados do método de Trim-and-fill ilustrados em um gráfico do tipo forest plot. OR=odds ratio; CI= intervalo de confiança; W=peso; TE= valores estimados para a média; seTE= valores estimados para o desvio padrão.

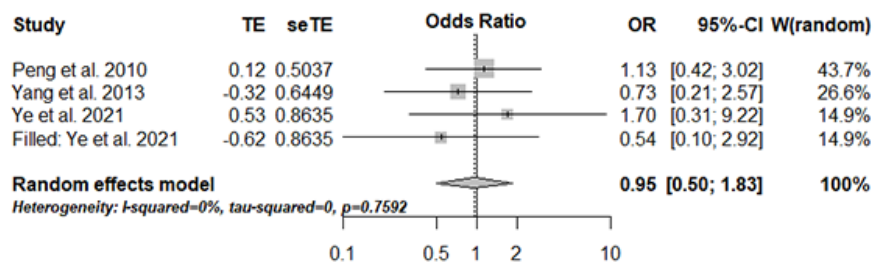
Fonte: Elaboração própria.

Figura 5 – Resultado da meta-análise comparando os gêneros masculino e feminino

A



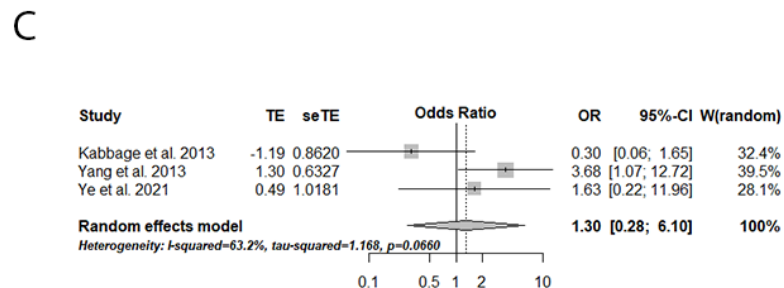
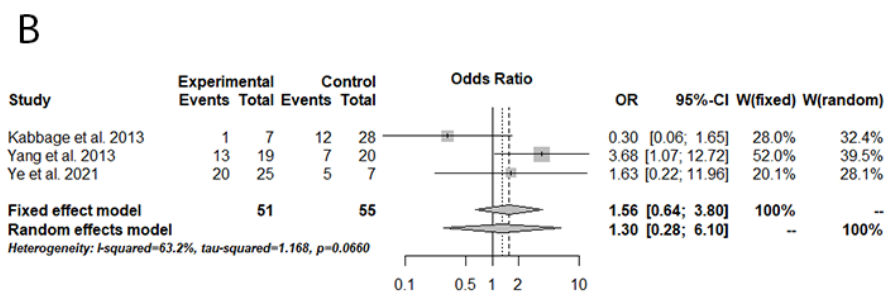
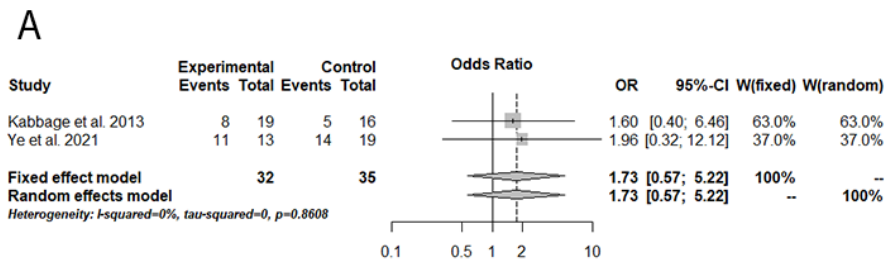
B



A) Resultados da meta-análise da diferença entre os gêneros para altos níveis de CRT ilustrados em um gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado pelo gênero feminino, enquanto o grupo controle foi formado pelo gênero masculino. **B)** Resultados do método de Trim-and-fill ilustrados em um gráfico do tipo forest plot. OR=odds ratio; CI= intervalo de confiança; W=peso; TE= valores estimados para a média; seTE= valores estimados para o desvio padrão.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 6 – Resultado da meta-análise em relação a linfonodos metastáticos



- A)** Resultado da meta-análise da presença de linfonodos metastáticos com alto nível de CRT. O grupo experimental foi formado pela presença de linfonodos metastáticos enquanto o grupo controle foi formado pela ausência de linfonodos metastáticos. **B)** Resultados da meta-análise do estágio clínico da doença tumoral com alta expressão de CRT. O grupo experimental foi formado pelos estágios clínicos avançados (III-IV), enquanto o grupo controle foi formado pelos estágios clínicos iniciais (I-II). **C)** Resultado do método Trim-and-fill ilustrado em um gráfico do tipo forest plot para o estágio clínico da doença tumoral com alto nível de CRT. OR=odds ratio; CI= intervalo de confiança; W=peso; TE= valores estimados para a média; seTE= valores estimados para o desvio padrão.

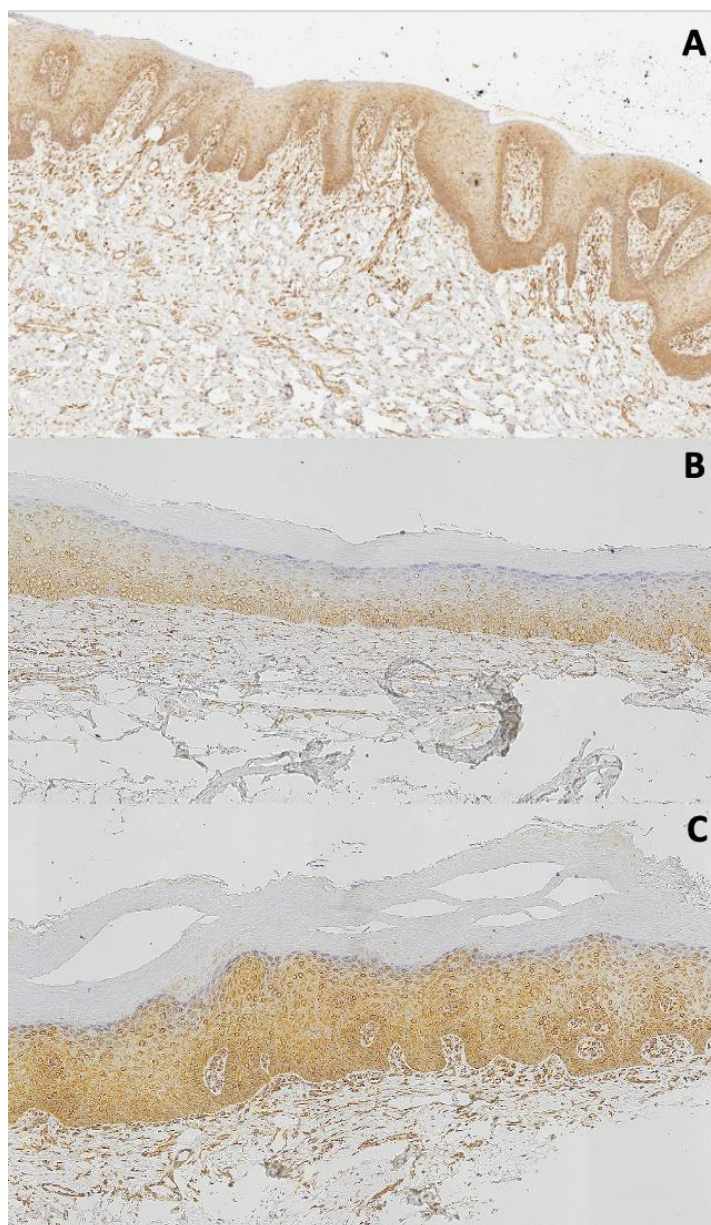
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise Imuno-Histoquímica de CRT em DPMOs

Após a quantificação da expressão da CRT por imuno-histoquímica, dos dados foram tabulados e realizou-se inicialmente a estatística descritiva. A partir desta análise checamos que os dados são normais através da assimetria e curtose. Posteriormente realizou-se o teste de Brown-Forsythe o qual determinou que os dados são homocedásticos. Após a realização dos testes ANOVA one-way e o pós teste de Tukey.

Notamos que há uma diferença de expressão de CRT entre os grupos HFI, LVP e LO, como representado na Figura 7. Contudo, observamos que houve uma diferença estatística relevante somente entre os grupos LO e LVP no qual houve um aumento na expressão de CRT na LVP quando comparada com o grupo da LO ($p=0,0043$) (Figura 8).

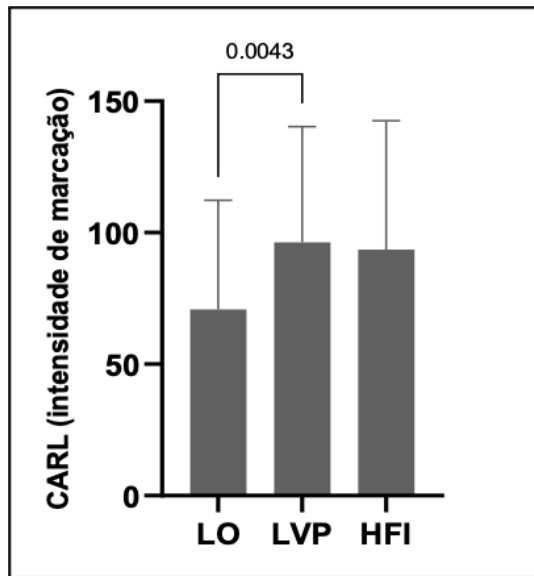
Figura 7 – Representação da marcação imuno-histoquímica entre os grupo HFI, LO e LVP



A) Representação da marcação imuno-histoquímica de CRT no grupo controle (HFI); **B)** Representação da marcação imuno-histoquímica de CRT no grupo LO; **C)** Representação da marcação imuno-histoquímica no grupo LVP.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Determinação dos níveis de expressão de CRT nos grupos LO, LVP e HFI



Podemos observar a diferença nos níveis de expressão de CRT entre os grupos LO, LVP e HFI.

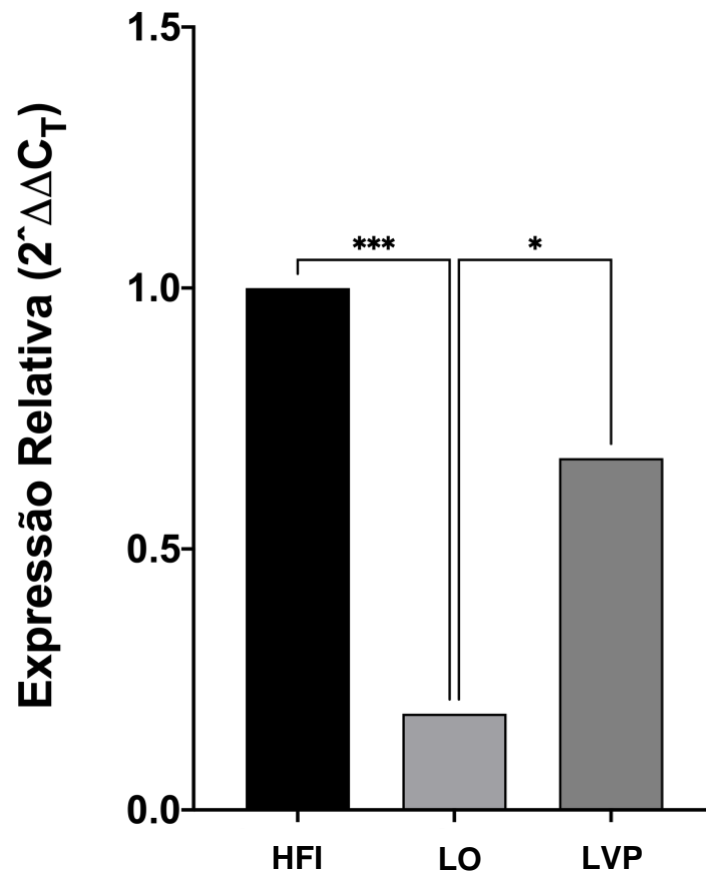
Fonte: Elaboração própria.

5.3 A expressão Gênica de CRT Está Aumentada na LVP Quando Comparada Com a LO

A análise estatística dos dados de quantificação por qRT-PCR nas amostras de HFI, LO e LVP revelou algumas modulações na expressão de CRT (Figura 9).

Podemos observar uma redução na expressão da CRT nos grupos LO e LVP em relação ao grupo controle. Houve uma diferença estatística relevante entre os grupos LVP e LO, sendo que na LVP teve-se o aumento na expressão da CRT (aumento de ~ 0,5 vez ; $p=0,05$) em relação a LO. Além disso, observamos uma redução significativa na expressão de CRT no grupo LO (redução de ~0,8 vez; $p=0,01$) em relação ao grupo HFI.

Figura 9 – qRT-PCR para marcador de CRT



Expressão gênica de CRT em HFI (controle), LO, LVP evidenciada por qRT-PCR. * p<0,05

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O câncer ao longo do século XXI é a principal causa de morte prematura e conseqüentemente uma barreira para o aumento da expectativa de vida. É esperado que o número na incidência de câncer duplique em 2070 comparado a 2020, e isto está relacionado ao envelhecimento e crescimento da população bem como nas mudanças demográficas⁴⁰. Embora se tenha muitas pesquisas de neoplasias malignas, é necessário uma mudança no cenário de forma a acentuar programas de prevenção do câncer uma vez o diagnóstico precoce é essencial para um melhor prognóstico do paciente.

Estudos que buscam compreender o mecanismo da oncogênese e a busca por biomarcadores é uma forma de entender melhor o curso clínico das neoplasias bem como desenvolver novas terapias terapêuticas para uma melhor qualidade e expectativa de vida do paciente. Desta forma, o estudo da CRT pode ser uma boa forma de entender os mecanismos da tumorigenese na qual ela está envolvida.

A CRT é uma proteína multifuncional que apresenta dupla propriedade: ação anti-oncogênica e ação oncogênica³⁶. Quando esta proteína está relacionada com as células cancerígenas ela pode apresentar uma alta expressão ou uma baixa expressão, dependendo do comportamento na neoplasia em questão, de forma que esta expressão pode estar relacionada a um prognóstico favorável ou desfavorável da doença.

Na revisão sistemática obtivemos como resultado que a grande maioria das neoplasias apresentaram uma superexpressão de CRT quando comparadas com tecidos normais. Apenas três estudos que foram inclusos na nossa revisão sistemática apresentaram uma baixa expressão de CRT como no câncer de endométrio, em tumor de cérebro, carcinoma de ovário.

Uma das ações da CRT que está envolvido na tumorigenese é a sua ação pró-fagocitose, a qual facilita a absorção de células apoptóticas através das células apresentadoras de antígeno, em especial as células dendríticas, que posteriormente ativarão células T e células B para combater a progressão do tumor³¹. Além disso, outra atividade oncogênica da CRT é relacionada com a mutação presente no gene que sintetiza esta proteína. Estas mutações produzem uma mudança na estrutura da proteína, em específico no domínio C no qual afetará o sinalizador KDEL e como consequência ativarão as vias de sinalização JAK2 e MAPK^{31,41}. Bem como a alteração

na estrutura afeta ainda a sua atividade na função homeostase de cálcio, na apresentação de antígenos as células MHC classe I, na sinalização de sinais fagocíticos⁴¹.

Além disso, a meta-análise revelou que em pacientes do sexo masculino há 2.613 vezes mais probabilidade de expressar altos níveis de CRT do que baixos níveis. Podemos hipotetizar que esse achado seria responsável pelo diferente curso da doença e pelo diferente prognóstico em pacientes do sexo masculino, variando de acordo com o tipo de tumor. Contudo este achado não teve relevância estatística em pacientes do sexo feminino e também na análise entre ambos os sexos, o que consolida que a alta expressão da CRT no sexo masculino pode ser um sinalizador de prognóstico desfavorável para a doença.

O câncer de pâncreas, mais comum em homens adultos, é um tipo de câncer agressivo, de difícil diagnóstico em seus estágios iniciais e, conseqüentemente, consegue afetar outros órgãos⁴². Estudos mostram que a superexpressão de CRT nesse tipo de câncer está associada ao estágio de UICC e metástase linfonodal, sendo assim pode ser um indicador de prognóstico desfavorável para essa neoplasia⁴³. Assim como no carcinoma espinocelular de esôfago, que também apresenta prevalência para o sexo masculino e alta expressão de CRT com prognóstico desfavorável da doença⁴⁴. Outro tipo de neoplasia mais comum em homens e com alta expressão de CRT é o câncer gástrico. Chen et al. em seu estudo conclui que a associação da superexpressão de CRT com eventos de angiogênese facilita a proliferação de células tumorais, invasão de metástases linfonodais tumorais e, conseqüentemente prognóstico ruim⁴⁵.

Há poucos estudos na literatura que relatam a expressão da CRT com CECO. Hadara et al, em seu estudo mostrou que a alta expressão com o CECO está associada com um prognóstico desfavorável e uma alta progressão tumoral³⁰. Porém, é necessário outros estudos para elucidar a ação da CRT e a possibilidade desta proteína ser um biomarcador no CECO. Este carcinoma representa 95% das lesões malignas que acometem a cavidade oral e tem como fatores de risco associado o consumo excessivo de álcool e tabaco¹. Apesar das pesquisas sobre CECO há ainda uma alta incidência e a taxa de sobrevivência de 5 anos permanece em 50% dos casos¹. Sendo assim, é de extrema importância prevenir e diagnosticar a doença em estágios iniciais para um bom prognóstico ao paciente.

Partindo deste princípio, o entendimento dos mecanismos moleculares relacionados a taxa de transformação maligna das DPMOs é uma estratégia primordial. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa através da análise proteômica que revelou uma alta expressão de CRT em LVP quando comparada com a LO e o grupo controle. Desta forma, buscamos estudar a expressão desta proteína em DPMOs para correlacionar com o potencial de transformação maligna destas lesões.

A LO é a mais comum dentre as DPMOs e possui uma taxa de transformação maligna de 0,6 a 61% dos casos²⁶. Já a LVP, mais rara e tem um curso clínico agressivo e desafiador, apresenta um índice maior de transformação maligna acima de 63,9%⁴⁶. A alta expressão de CRT em LVP comparada a LO observada tanto pela marcação imuno-histoquímica quanto pelo qRT-PCR no nosso estudo pode ser devido aos seguintes mecanismos: a ativação do sistema imunológico, a ação pro-fagocitose ou também com a presença da CRT mutada, sendo que estes podem estar correlacionados com a alta taxa de transformação maligna da LVP.

Quando a CRT se transloca do RE e se expressa na superfície celular das células tumorais como também antígenos através de moléculas MHC classe I⁴¹. Desta forma, a exposição da CRT pelas células cancerígenas caracteriza a MCI, isto é, há uma mudança na composição da superfície celular mediada por padrões moleculares associados a danos (DAMPs) bem como uma diminuição de CD47 e consequentemente há o início da fagocitose de células neoplásicas^{15,16,32}. Deste modo, quando a CRT está expressa na superfície de células tumorais ela emite um sinal de "coma-me", isto é, um sinal pró-fagocítico para as células apresentadoras de antígenos, em particular células dendríticas e posteriormente células T CD8+ serem ativadas e atuarem na supressão do tumor⁴¹. Sendo assim, a provável associação dessa expressão da CRT o papel que esta proteína assume nas células tumorais, isto é, estas células que não expressam CRT selvagem ou expressam a CRT mutada elas apresentam pouca quantidade ou nenhuma quantidade de antígeno para as células MHC classe I, favorecendo assim a imunoevasão e consequentemente um prognóstico desfavorável⁴¹.

Já a atividade pro-fagocitose da CRT pode apresentar dois possíveis mecanismos. Um já descrito anteriormente, que é a expressão de CRT em células neoplásicas que apresentam antígeno e ativam posteriormente células T e células B³¹. O outro mecanismo pode ser através da superexpressão de CD47 em relação a

CRT, de modo que há uma inibição da fagocitose de células cancerígenas e consequentemente tem-se um aumento tumoral e um maior risco de metástase⁴⁷.

Embora em nossos resultados ainda não tenha uma diferença estatística relevante entre a diferença de expressão de CRT entre HFI e LVP, notamos que no nosso grupo controle há uma alta expressão desta proteína. Por ser uma lesão que possui um infiltrado inflamatório, e não possuir características de neoplasia, a CRT nesta lesão está relacionada com o a sua ação anti-oncogênica, isto é, ela atua na morte celular imunogênica através dos efeitos pró-fagocitose, de modo que ela se expressa nas células para que os fagócitos encontrem as células que precisam ser eliminadas⁴¹.

Apesar de ainda não estudada na literatura a ação oncogênica da CRT mutada em DPMOs é um mecanismo que precisa ser elucidado. As doenças mieloproliferativas são exemplo de que a mutação da CRT pode ser um marcador diagnóstico da doença e até mesmo prognóstico dela, uma vez que pacientes que possuem a mutação no gene da CRT do tipo 1, tem na doença um comportamento mais agressivo^{34,41}. Portanto, é necessário estudos adicionais para buscar entender melhor o mecanismo de ação da CRT nas DPMOs e correlaciona-la melhor com o seu processo de transformação maligna.

7 CONCLUSÃO

- A expressão de CRT nas neoplasias diferem quanto a sua localização, podendo apresentar alta ou baixa expressão;
- Os níveis de CRT está aumentado em mais de duas vezes em paciente do gênero masculino;
- Há um aumento na expressão de CRT na LVP comparada a LO;
- Pela expressão gênica da CRT ela está aumentada no comparada a LO, e reduzida na LO quando comparada a LVP;
- A alta expressão de CRT na LVP pode estar associada com a sua alta taxa de transformação maligna.

REFERÊNCIAS*

1. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15(6): 388-99.
2. Ganesh D, Sreenivasan P, Öhman J, Wallström M, Braz-Silva PH, Giglio D et al. Potentially malignant oral disorders and cancer transformation. *Anticancer Res.* 2018; 38(6): 3223-29.
3. INCA. **Tipos de câncer.** Inca; [2021]. [Acesso em: 03 Jan. 2022]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-boca/profissional-de-saude>.
4. Warnakulasuriya S, Jonson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(10): 575-80.
5. El Naggar AK, Chan JCK, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017.
6. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis.* 2021 Nov;27(8):1862-80.
7. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med.* 2016 Mar;45(3):155-66.
8. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003 Dec;39(8):770-80.
9. Gillenwater AM, Vigneswaran N, Fatani H, Saintigny P, El-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia (PVL): a review of an elusive pathologic entity! *Adv Anat Pathol.* 2013 Nov;20(6):416-23.
10. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Jun;125(6):612-27.
11. Lu YC, Weng WC, Lee H. Functional roles of calreticulin in cancer biology. *Biomed Res Int.* 2015;2015:526524.
12. Chiang WF, Hwang TZ, Hour TC, Wang LH, Chiu CC, Chen HR, et al. Calreticulin, an endoplasmic reticulum-resident protein, is highly expressed and essential for

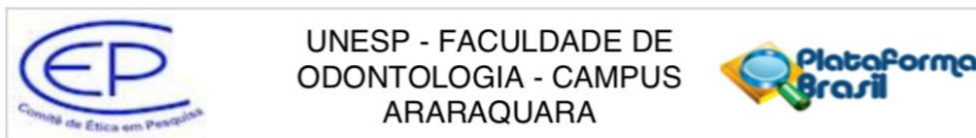
* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

- cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2013 Jun;49(6):534-41.
13. Venkateswaran K, Verma A, Bhatt AN, Shrivastava A, Manda K, Raj HG, Prasad A, Len C, Parmar VS, Dwarakanath BS. Emerging Roles of Calreticulin in Cancer: Implications for Therapy. *Curr Protein Pept Sci.* 2018 Feb 13;19(4):344-57.
 14. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Jun;44(6):842-6.
 15. Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. *Oncoimmunology.* 2014 Dec 13;3(9):e955691.
 16. Fucikova J, Kasikova L, Truxova I, Laco J, Skapa P, Ryska A, et al. Relevance of the chaperone-like protein calreticulin for the biological behavior and clinical outcome of cancer. *Immunol Lett.* 2018 Jan;193(2018):25-34.
 17. Duo CC, Gong FY, He XY, Li YM, Wang J, Zhang JP, et al. Soluble calreticulin induces tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-6 production by macrophages through mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF κ B signaling pathways. *Int J Mol Sci.* 2014 Feb 20;15(2):2916-28.
 18. Peng RQ, Chen YB, Ding Y, Zhang R, Zhang X, Yu XJ, et al. Expression of calreticulin is associated with infiltration of T-cells in stage IIIB colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2010 May 21;16(19):2428-34.
 19. Pekáriková A, Sánchez D, Palová-Jelínková L, Simsová M, Benes Z, Hoffmanová I, et al. Calreticulin is a B cell molecular target in some gastrointestinal malignancies. *Clin Exp Immunol.* 2010 May;160(2):215-22.
 20. Accetta R, Elli L, Libera L, Siracusa C, Cassavia F, Orsini F, et al. Analysis of three screening methods for the detection of calreticulin gene mutations. *Int J Lab Hematol.* 2020 Apr;42(2):e76-9.
 21. Liu P, Zhao L, Kroemer G, Kepp O. Secreted calreticulin mutants subvert anticancer immunosurveillance. *Oncoimmunology.* 2019 Dec 28;9(1):1708126.
 22. Ranganathan K, Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: Classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019 Jan-Apr;23(1):19-27.
 23. Tilakaratne WM, Jayasooriya PR, Jayasuriya NS, De Silva RK. Oral epithelial dysplasia: Causes, quantification, prognosis, and management challenges. *Periodontol 2000.* 2019 Jun;80(1):126-47.
 24. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):317-23.
 25. Wetzel SL, Wollenberg J. Oral Potentially Malignant Disorders. *Dent Clin North Am.* 2020 Jan;64(1):25-37.

26. Villa A, Sonis S. Oral leukoplakia remains a challenging condition. *Oral Dis*. 2018 Mar;24(1-2):179-83.
27. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, De Virgilio A, et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity and oral dysplasia: A systematic review and meta-analysis of malignant transformation rate by subtype. *Head Neck*. 2020 Mar;42(3):539-55.
28. Gilligan G, Garola F, Piemonte E, Leonardi N, Panico R, Warnakulasuriya S. Lichenoid proliferative leukoplakia, lichenoid lesions with evolution to proliferative leukoplakia or a continuum of the same precancerous condition? A revised hypothesis. *J Oral Pathol Med*. 2021 Feb;50(2):129-35.
29. Chiang WF, Hwang TZ, Hour TC, Wang LH, Chiu CC, Chen HR, et al. Calreticulin, an endoplasmic reticulum-resident protein, is highly expressed and essential for cell proliferation and migration in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013 Jun;49(6):534-41.
30. Harada K, Takenawa T, Ferdous T, Kuramitsu Y, Ueyama Y. Calreticulin is a novel independent prognostic factor for oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2017 Jun;13(6):4857-62.
31. Liu P, Zhao L, Loos F, Marty C, Xie W, Martins I, et al. Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells. *Mol Cell*. 2020 Feb 20;77(4):748-60.
32. Schcolnik-Cabrera A, Oldak B, Juárez M, Cruz-Rivera M, Flisser A, Mendlovic F. Calreticulin in phagocytosis and cancer: opposite roles in immune response outcomes. *Apoptosis*. 2019 Apr;24(3-4):245-55.
33. Holmström MO, Cordua S, Skov V, Kjær L, Pallisgaard N, Ellervik C, et al. Evidence of immune elimination, immuno-editing and immune escape in patients with hematological cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2020 Feb;69(2):315-24.
34. Prins D, González Arias C, Klampfl T, Grinfeld J, Green AR. Mutant Calreticulin in the Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere*. 2020 Jan 15;4(1):e333.
35. Holmström MO, Hasselbalch HC, Andersen MH. Neo-antigen specific memory T-cell responses in healthy individuals. *Oncoimmunology*. 2019 Apr 19;8(7):1599640.
36. Houen G. COMMENTARY: Calreticulin - Oncogene, Anti-oncogene, or Both? *Curr Protein Pept Sci*. 2019;20(1):111-2.
37. Park J, Lee Y, Seo H, Jang B, Son H, Kim S, et al. Risk of Bias Assessment tool for Non-randomized Studies (RoBANS): Development and validation of a new instrument. In: *Abstracts of the 19th Cochrane Colloquium; 2011 19-22 Oct; Madrid, Spain*. John Wiley & Sons; 2011.
38. Chang KP, Kao HK, Liang Y, Cheng MH, Chang YL, Liu SC, et al. Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jul;17(7):1945-56.

39. Soerjomataram I, Bray F. Planning for tomorrow: global cancer incidence and the role of prevention 2020-2070. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Oct;18(10):663-72.
40. Fucikova J, Spisek R, Kroemer G, Galluzzi L. Calreticulin and cancer. *Cell Res*. 2021 Jan;31(1):5-16.
41. Goral V. Pancreatic Cancer: Pathogenesis and Diagnosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):5619-24.
42. Sheng W, Chen C, Dong M, Zhou J, Liu Q, Dong Q, et al. Overexpression of calreticulin contributes to the development and progression of pancreatic cancer. *J Cell Physiol*. 2014 Jul;229(7):887-97.
43. Du XL, Hu H, Lin DC, Xia SH, Shen XM, Zhang Y, et al. Proteomic profiling of proteins dysregulated in Chinese esophageal squamous cell carcinoma. *J Mol Med (Berl)*. 2007 Aug;85(8):863-75.
44. Chen CN, Chang CC, Su TE, Hsu WM, Jeng YM, Ho MC, et al. Identification of calreticulin as a prognosis marker and angiogenic regulator in human gastric cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 Feb;16(2):524-33.
45. Torrejon-Moya A, Jané-Salas E, López-López J. Clinical manifestations of oral proliferative verrucous leukoplakia: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2020 May;49(5):404-8.
46. Cooney T, Wei MC, Rangaswami A, Xu L, Sage J, Hazard FK. CD47 is not Over-Expressed in Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. *Ann Clin Lab Sci*. 2017 Aug;47(4):395-402.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Expressão de calreticulina em neoplasias malignas e desordens potencialmente malignas.

Pesquisador: Andreia Bufalino

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 35883320.2.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.092.643

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apresentação de emenda acompanhada de relatório parcial cujo resumo consta: "Dentre as neoplasias que acometem a cavidade oral 95% delas são diagnosticadas como carcinoma espinocelular, e muitas vezes estes tumores são precedidos por alterações clínicas que apresentam uma taxa de transformação maligna, chamadas de desordens potencialmente malignas orais (DPMO). Dentre elas, destacamos a leucoplasia (LO) que é definida como "uma placa branca de risco questionável definida após a exclusão de outras doenças ou distúrbios conhecidos que mimetizam este aspecto, mas que não carregam nenhum risco conhecido para o câncer", e sua taxa de transformação maligna de 0,3 a 13,8%. A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) caracterizada por múltiplas placas brancas que apresentam um comportamento clínico persistente e progressivo para a malignidade, sendo a sua taxa de transformação maligna de 70%. A calreticulina (CRT) é uma proteína multifuncional, que pode apresentar propriedades anti-oncogênicas e oncogênicas. Apesar de não bem estudado seu mecanismo em neoplasias da cavidade oral, já é relatado que a expressão elevada da CRT está relacionada com um prognóstico desfavorável da doença. Contudo, não existem trabalhos que avaliaram a expressão de CRT em DPMO. Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica de CRT, como também avaliar a expressão gênica da CRT através da técnica qRT-PCR em DPMOs (LO, LVP, Líquen Plano (LP), Lesão Líquenóide (LL)), carcinoma e Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI). Ao todo serão utilizadas 301 amostras, sendo que destas 241 são amostras

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512

Bairro: CENTRO

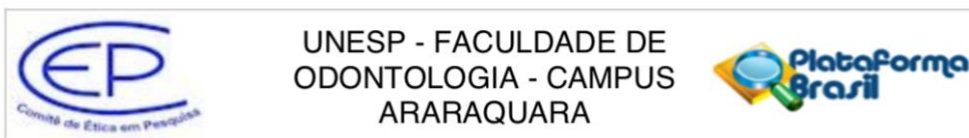
UF: SP

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.092.643

parafinadas para a realização da técnica da imuno-histoquímica, e 60 amostras congeladas doadas para a realização da técnica do qRT-PCR. A reação de imuno-histoquímica será através da técnica de estraptavidina-biotina-peroxidase. Serão utilizadas 241 amostras parafinadas, sendo que 97 amostras são oriundas da Faculdade de Odontologia de Araraquara, 31 da Universidade de São Tiago de Compostela (Espanha) e 113 da Universidade de Helsinki (Finlândia). A quantificação das células positivas será feita às cegas através da intensidade de marcação, e posteriormente os grupos serão divididos conforme o diagnóstico clínico e histopatológico. Na análise da intensidade de expressão gênica da CRT através do qRT-PCR serão utilizadas 60 amostras congeladas de biopsias incisivas/excicionais de pacientes diagnosticados alguma das DPMOs, carcinoma e HFI oriundos do Serviço de Medicina Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Cada grupo será composto por 10 amostras, sendo o grupo 1 será representado pela LO, o grupo 2 será pela LVP, grupo 3 LP, grupo 4 LL, grupo 5 carcinoma e grupo 6 HFI, que será o grupo controle. Os dados de cada objetivo serão tabulados e posteriormente a análise estatística será realizada, levando em consideração o nível de significância de 95% ($p=0.05$) e o software utilizado será o Prism 4, GraphPad Software Inc.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar a expressão imuno-histoquímica da CRT em DMPOs para tentar correlacionar com o potencial de transformação maligna. Bem como, analisar a associação da expressão da CRT com os parâmetros clinicopatológicos em DPMOs. E por fim, avaliar a expressão genica de CRT em DPMOs e Carcinoma por meio do qRT-PCR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

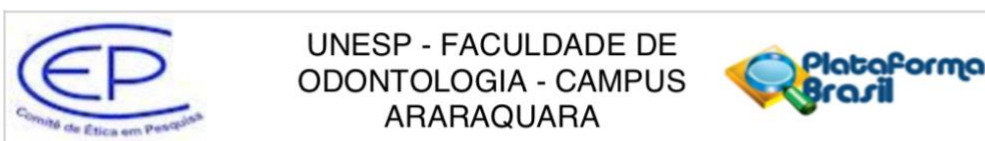
Riscos:

A pesquisa utilizará amostras já coletadas de pacientes atendidos em nossa clínica e amostras doadas pela Espanha e Finlândia, apresentando risco mínimo, uma vez que a pesquisa manterá a privacidade dos indivíduos, bem como evitará exposição dos dados dos prontuários já que apenas os pesquisadores terão acesso as informações. Além disso, todos os procedimentos serão sempre realizados de acordo com as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos aos pacientes neste estudo, uma vez que os pacientes já foram tratados e diagnosticados. Na literatura não há estudos que correlacionam a calreticulina e as desordens potencialmente malignas, sendo assim, será um estudo que poderá entender melhor o comportamento clínico destas lesões e poder correlacionar com o seu potencial de malignidade.

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.092.643

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está em andamento, e ainda não há resultados, pois a etapa de imuno-histoquímica não está finalizada. As pesquisadoras solicitam aumento do número de participantes/amostras da pesquisa de 90 para 301 e adição de um novo objetivo ao projeto. O novo objetivo será avaliar a expressão gênica da Calreticulina por meio do qRT-PCR. Do total de 301 amostras, 241 são amostras parafinadas para a realização da técnica da imuno-histoquímica e 60 são amostras congeladas de biopsias de pacientes que foram atendidos no Serviço de Medicina Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, que serão utilizadas para realização do ensaio de qRT-PCR. Essas amostras congeladas são oriundas de doação presente em um projeto anteriormente aprovado pelo comitê de ética (CAAE 39015420.2.0000.5416).

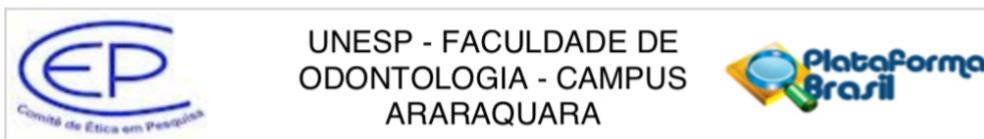
Em relação às amostras para realização de imuno-histoquímica, houve alteração da sua procedência, que anteriormente seriam da FOAr (parecer nº 4.214.869, emitido em 15 de agosto de 2015) e, na versão atual do projeto de pesquisa (inserido na PB em 17/09/2021), 97 serão oriundas de pacientes da FOAr, 31 da Universidade de São Tiago de Compostela (Espanha) e 113 da Universidade de Helsinki (Finlândia). As amostras oriundas da Finlândia e da Espanha foram doadas por pesquisadores responsáveis por elas.

Em resumo, trata-se de um estudo nacional a ser realizado em Araraquara-SP, unicêntrico (Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP; FOAr), retrospectivo e de caráter acadêmico. Serão utilizadas de 301 amostras, das quais 241 são amostras parafinadas para a realização da técnica da imuno-histoquímica [97 são oriundas da FOAr, 31 da Universidade de São Tiago de Compostela (Espanha) e 113 da Universidade de Helsinki (Finlândia)] e 60 são amostras congeladas para realização do ensaio de qRT-PCR, oriundas de biopsias de pacientes que foram atendidos no Serviço de Medicina Bucal da FOAr. Além disso, serão coletadas, dos prontuários dos prontuários dos pacientes atendidos no Serviço de Medicina Bucal da FOAr, informações clínicas, demográficas, de tratamento, recidiva e transformação maligna da lesão. O estudo será patrocinado/financiado pelo CNPq, e será realizado de 02/11/2020 a 31/05/2022, de acordo com o cronograma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados relatório parcial, PB informações básicas do projeto, carta resposta, projeto de pesquisa, carta de doação das amostras de professores das duas Faculdades do exterior, folha de rosto, cronograma, autorização para uso das amostras, solicitação de dispensa do TCLE e orçamento .

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459	E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.092.643

Outros	cartarespostaMARIANA.pdf	05/11/2021 11:46:38	PALACON	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/11/2021 11:46:27	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	05/11/2021 11:46:14	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAO.pdf	05/11/2021 11:45:58	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Outros	relatorioparcialcepfinal.pdf	17/09/2021 11:14:11	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetocep.pdf	17/09/2021 11:13:47	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	17/09/2021 11:13:25	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Outros	cartadoacao.pdf	10/09/2021 16:21:52	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	28/08/2021 06:25:04	MARIANA PARAVANI PALACON	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cumprimento_de_normas.pdf	17/07/2020 18:37:03	Andreia Bufalino	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_Lab.pdf	17/07/2020 18:36:25	Andreia Bufalino	Aceito

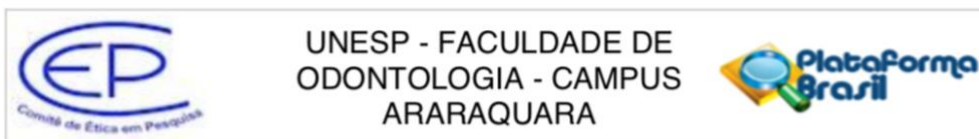
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512
 Bairro: CENTRO CEP: 14.801-903
 UF: SP Município: ARARAQUARA
 Telefone: (16)3301-6459 E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 5.092.643

ARARAQUARA, 09 de Novembro de 2021

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680, SALA 512
Bairro: CENTRO **CEP:** 14.801-903
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301-6459 **E-mail:** cep@foar.unesp.br

**Autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data da
defesa**

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 14 de fevereiro de 2022

Mariana Paravani Palaçon