



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



Mariana de Oliveira Melo

**Análise da expressão imuno-histoquímica da proteína 14-3-3 em desordens
potencialmente malignas orais**

Araraquara
2023



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mariana de Oliveira Melo

Análise da expressão imuno-histoquímica da proteína 14-3-3 em desordens potencialmente malignas orais

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do grau de Cirurgião-dentista.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andreia Bufalino

Araraquara
2023

M528a Melo, Mariana de Oliveira
Análise da expressão imuno-histoquímica da proteína 14-3-3 em distúrbios potencialmente malignos orais / Mariana de Oliveira Melo. -- Araraquara, 2023
34 f. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Odontologia) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Andreia Bufalino

1. Leucoplasia oral. 2. Neoplasias. 3. Imuno-histoquímica. 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.

**UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara**

Mariana de Oliveira Melo

**Análise da expressão imuno-histoquímica da proteína 14-3-3 em desordens
potencialmente malignas orais**

Orientador: Prof^a Dr^a Andreia Bufalino

Assinatura Orientador (a):

Assinatura Aluno (a):

Araraquara, 28 de fevereiro de 2023.

Dedico esse trabalho aos meus avós **Ana de Almeida Oliveira, Joaquim Garcia de Oliveira, Maria José Rodrigues de Melo e Urbano Alves de Melo**, que mesmo a maioria não presenciando minha formação, sei que torceram e vibraram por minha conquista de onde vocês estiverem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais **Luciene Cristina Garcia de Oliveira e Adilson Rodrigues de Melo**, por terem lutado esse sonho ao meu lado, e por não terem medido esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Sou grata por acreditarem em mim e por sempre me motivarem a não desistir do meu sonho. Em especial à minha mãe, que sempre esteve ao meu lado.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a **Andreia Bufalino** pela oportunidade de fazer parte de sua equipe, e por me apresentar a pesquisa científica. Por acreditar em meu potencial, me motivar e me ajudar nesses anos de Iniciação Científica ao seu lado. Serei eternamente grata por esses anos de pesquisa, e por todo o carinho.

Agradeço às alunas de pós-graduação **Camila de Oliveira Barbeiro e Mariana Paravani Palaçon**, que sempre me ajudaram em várias etapas da Iniciação Científica, por todo incentivo e apoio.

Às minhas amigas **Mayara Cristina Zunareli e Walleska Tayná de Lima Silva**, por sempre me acolherem desde o primeiro momento na graduação, por todos os momentos e dificuldades que passamos juntas e nunca nos afastamos. Agradeço à **Mayara** todos esses anos de dupla, por ter enfrentado e comemorado comigo cada etapa. Vocês foram muito importante na minha trajetória, irei levar para sempre em meu coração.

À **FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** (Processo nº 2022/00668-0) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, e seu diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos**, e sua vice-diretora Prof.^a Dr.^a **Patrícia Petromilli Nordi Sasso Garcia** e todos os funcionários, professores, por todo aprendizado e apoio ao longo da graduação.

A todos que não nomeei mas que fizeram parte da minha trajetória por esses anos em Araraquara, serei eternamente grata a cada um.

Melo MO. Análise da expressão de imuno-histoquímica da proteína 14-3-3 em distúrbios potencialmente malignos orais [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral e muitas vezes estes tumores são precedidos por alterações clínicas que apresentam um evidente potencial de transformação maligna, as quais são chamadas de distúrbios potencialmente malignos orais (DPMOs). Dentre estas podemos citar a leucoplasia oral (LO) e leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), as quais apresentam características clínicas e patológicas que se sobrepõem. A LVP apresenta um comportamento clínico persistente e progressivo para malignidade, com taxas de transformação maligna maiores que as observadas na LO. Além disto, foi descrito que a LVP particularmente nas fases iniciais da doença, pode revelar achados histopatológicos semelhantes ao líquen plano oral, outra DPMO com taxa de transformação maligna inferior, comprometendo o diagnóstico precoce da LVP. Adicionalmente, o grau histológico de displasia é insuficiente para prever a transformação maligna nos casos de lesões leucoplásicas de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO e LVP. Um estudo preliminar realizado por nosso grupo de pesquisa, identificou por meio de análise proteômica, uma expressão diferenciada da proteína 14-3-3 em amostras de LO e LVP. As proteínas da família 14-3-3 se ligam e regulam as proteínas vinculadas aos processos cancerígenos, tais como, capacidade de escapar da vigilância do sistema imunológico, aquisição de um potencial de proliferação descontrolada, capacidade de repelir estímulos que induzem apoptose e aumento de capacidades invasivas e metastáticas, e sua associação a proteínas cancerígenas modula a localização, estabilidade, interação com outras proteínas e sua atividade celular. Embora a participação das proteínas 14-3-3 em neoplasias da cavidade oral não seja bem esclarecida, é possível perceber que esta família de proteínas participa de vários processos cancerígenos relevantes. Neste contexto, este estudo tem como objetivo principal avaliar por meio de imuno-histoquímica a expressão da proteína 14-3-3 em amostras de LO e LVP, em diferentes fases clínico-patológicas destas DPMOs. Assim, os resultados deste estudo mostram que a proteína 14-3-3, que havia sido identificada no estudo proteômico como diferencialmente expresso nos grupos LVP comparado com controle e LO, não revelou diferença estatística na análise de validação imuno-histoquímica entre LVP e LO. Entretanto, esses dados suportam nossa hipótese de que essas proteínas estão envolvidas no processo de transformação maligna de DPMOs, particularmente na LVP.

Palavras – chave: Leucoplasia oral. Neoplasias. Imuno-histoquímica.

Melo MO. Analysis of immunohistochemical expression of 14-3-3 protein in oral potentially malignant disorders [Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Odontologia]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) represents more than 95% of all malignant neoplasms that affect the oral cavity and these tumors are often preceded by clinical alterations that have an evident potential for malignant transformation, which are called oral potentially malignant disorders (OPMDs). Among these we can mention oral leukoplakia (OL) and proliferative verrucous leukoplakia (PVL), which have clinical and pathological characteristics that overlap. PVL presents a persistent and progressive clinical behavior towards malignancy, with rates of malignant transformation higher than those observed in OL. In addition, it has been described that PVL, particularly in the early stages of the disease, can reveal histopathological findings similar to oral lichen planus, another OPMD with a lower rate of malignant transformation, compromising the early diagnosis of PVL. Additionally, the histological degree of dysplasia is insufficient to predict malignant transformation in cases of leukoplasic lesions in patients with a clinicopathological diagnosis of OL and PVL. A preliminary study carried out by our research group identified, through proteomic analysis, a differentiated expression of the 14-3-3 protein in OL and PVL samples. Proteins of the 14-3-3 family bind and regulate proteins linked to carcinogenic processes, such as the ability to evade the surveillance of the immune system, the acquisition of an uncontrolled proliferation potential, the ability to repel stimuli that induce apoptosis and an increase in invasive and metastatic capabilities, and its association with cancer proteins modulates localization, stability, interaction with other proteins and their cellular activity. Although the participation of 14-3-3 proteins in oral cavity neoplasms is not well understood, it is possible to perceive that this family of proteins participates in several relevant carcinogenic processes. In this context, the main objective of this study is to evaluate, by means of immunohistochemistry, the expression of the 14-3-3 protein in OL and PVL samples, in different clinicopathological phases of these OPMDs. Thus, the results of this study show that 14-3-3 protein, which had been identified in the proteomic study as differentially expressed in the PVL groups compared to the control and OL, did not reveal statistical difference in the immunohistochemical validation analysis between PVL and OL. However, these data support our hypothesis that these proteins are involved in the process of malignant transformation of OPMDs, particularly PVL.

Keywords: Leukoplakia, oral. Neoplasms. Immunohistochemistry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 PROPOSIÇÃO.....	10
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 Desordens potencialmente malignas orais.....	11
3.2 Leucoplasia oral.....	12
3.3 Leucoplasia verrucosa proliferativa.....	14
3.4 Displasias epiteliais.....	17
3.5 Proteínas 14-3-3.....	18
4 MATERIAL E MÉTODO.....	20
4.1 Amostras teciduais.....	20
4.2 Avaliação da expressão imuno-histoquímica da proteína 14-3-3.....	20
5 RESULTADO.....	23
5.1 Característica clínico-patológicas dos pacientes.....	23
5.2 Expressão de 14-3-3 em LO e LVP.....	24
6 DISCUSSÃO.....	27
7 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A.....	33

1 INTRODUÇÃO

Desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são entidades clínicas que apresentam maior potencial de transformação maligna em relação ao tecido clinicamente normal. As principais lesões que fazem parte deste grupo são leucoplasia oral (LO), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), eritroleucoplasia, líquen plano oral (LPO), estomatite nicotínica, queilite actínica, entre outras¹⁻³. Deve-se destacar que as diferentes DPMOs possuem taxa de transformação maligna e perfil epidemiológico distintos. A LO, por exemplo, possui uma incidência de 3,4% e taxa de transformação maligna de 0,2 a 17,5%^{3,4}. A LO é mais comumente encontrada em homens caucasianos acima de 40 anos, e sua prevalência aumenta com o avanço da idade, e quando associada a fatores de risco como o tabaco e o álcool⁵. Apesar de apresentarem características clínicas semelhantes, as LOs possuem um grau de heterogeneidade microscópica. 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 situ*⁶. Atualmente estes achados microscópicos são utilizados para prever o risco de transformação maligna deste grupo de lesões. No entanto, não há métodos objetivos ainda disponíveis para tipificar lesões displásicas e permitir resultados consistentes e reprodutíveis, uma vez que nem todas as lesões orais com displasia progridem para uma neoplasia maligna⁷. Outra DPMO, descrita pela OMS como a de maior risco para progressão para o CEC é a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP). Definida pela primeira vez por Hansen e colaboradores⁸ (1985), que descreveram a LVP como uma desordem agressiva de etiologia desconhecida e tendência a se tornar multifocal ao longo do tempo. A LVP é caracterizada por placas brancas difusas e múltiplas, com prevalência 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 prazo⁹. Além disto, o diagnóstico da LVP não pode ser baseado somente nos achados microscópicos que mimetizam outras lesões, como a LO, LPO e lesões líquenóides orais (LLO)^{9,10}

Neste contexto, estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, revelou que um grupo pequeno de amostras de lesões leucoplásicas oriundas de pacientes com diagnóstico clínico patológico de LO (n=5) e LVP (n=5) apresentam perfis

proteômicos completamente distintos. Revelando que amostras de LVP apresentam uma maior quantidade de proteínas sendo expressas em níveis mais elevados em relação a LO; sendo estas proteínas relacionadas com diversos sistemas que favorecem a tumorigênese, incluindo a ativação de vias do ciclo celular, apoptose, migração, reparo de DNA, sistema imunológico e outros. No entanto, resultados encontrados neste estudo proteômico necessitam ser validados com maior número de amostras de DPMOs. Uma das proteínas que revelou níveis elevados nas amostras de LVP em relação à LO e despertou o interesse do nosso grupo de pesquisa foi a proteína 14-3-3, uma família de proteínas celulares altamente conservadas que realizam um papel chave na regulação de vias fisiológicas centrais¹¹. O nome 14-3-3 deriva de designações numéricas usadas nos padrões de fracionamento originais das proteínas. A habilidade das proteínas 14-3-3 de se aderir e regular vários produtos de genes oncogênicos, assim como produtos de genes supressores de tumor indicam um papel importante no câncer¹¹. Em humanos existem sete proteínas 14-3-3 classificadas como β , γ , ϵ , η , ζ , σ e que formam uma família¹², as quais podem ser identificadas em grande parte das células animais e são codificados por genes distintos¹³. Os sinais nucleares e citoplasmáticos são controlados pelas proteínas 14-3-3, as quais também regulam o ciclo celular por meio de interações com proteínas relacionadas ao ciclo celular e da modulação de sua atividade ou localização celular¹³.

As proteínas da família 14-3-3 se ligam e regulam as proteínas vinculadas aos processos cancerígenos, tais eles, capacidade de esquivar da vigilância do sistema imunológico, aquisição de um potencial de proliferação descontrolada, capacidade de repelir estímulos que induzem apoptose e aumento de capacidades invasivas e metastáticas¹¹, e sua associação a proteínas cancerígenas modula a localização, estabilidade, interação com outras proteínas e sua atividade celular¹³. É possível perceber que as proteínas 14-3-3 participam de vários processos cancerígenos relevantes. A regulação negativa da subunidade σ de 14-3-3, também conhecida como estratifina, foi relatada em células de cabeça e pescoço¹⁴.

Então, surgiu um interesse do nosso grupo em avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas 14-3-3 em DPMOs, especificamente na LO e LVP, de modo a buscar compreender os diferentes potenciais de transformação maligna que existem entre essas duas DPMOs que compartilham aspectos clínicos e microscópicos, possibilitando entender mais profundamente o aspecto molecular existente entre elas.

2 PROPOSIÇÃO

Esse estudo teve como objetivo avaliar por meio de imuno-histoquímica a expressão do 14-3-3 em lesões displásicas de LO, lesões displásicas de LVP, carcinomas espinocelulares orais derivados de pacientes com diagnóstico prévio de leucoplasia verrucosa proliferativa e controles.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura será dividida conforme os assuntos que nela serão abordados, sendo eles: Desordens potencialmente malignas orais, Leucoplasia oral, Leucoplasia verrucosa proliferativa, Displasias epiteliais, Proteínas 14-3-3.

3.1 Desordens potencialmente malignas orais

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) podem anteceder o diagnóstico de carcinoma espinocelular oral¹⁵, são um grupo de lesões que apresentam um maior potencial de transformação maligna do que o tecido clinicamente normal¹. As DPMOs compete a um grupo de lesões que possuem um risco aumentado de desenvolver câncer na cavidade oral e no lábio¹⁵.

O conceito “pré-câncer” era empregado para descrever as lesões e condições clínicas que podem ter potencial de transformação maligna¹⁶. Foi proposto uma mudança em 2005 por Warnakulasuriya et al.¹⁶ para que esse conceito de “pré-câncer” fosse substituído para distúrbios potencialmente malignos¹⁵. Condições e lesões foram definidas como “distúrbios” devido ao fato de que essas manifestações geralmente existem em razão à exposição a agentes cancerígenos ambientais, na sua maioria no trato aerodigestivo superior, e que a pessoa em um todo pode ter alterações que induz o risco de desenvolvimento de câncer. E o termo “potencialmente maligno” pressupõe que nem todo paciente diagnosticado com alguma desses distúrbios evoluirão para uma malignidade oral¹⁵.

Pacientes que recebem o diagnóstico de alguma das DPMOs podem ter uma alta chance de desenvolver algum câncer em alguma parte da cavidade oral em algum momento da sua vida. Muitas das DPMOs não desenvolvem para um câncer, mas a sua presença oferece um tipo de anormalidade no qual o carcinoma se manifesta, e não necessariamente ocorre no mesmo local em que há presença de DPMOs¹⁵.

As DPMOs possuem uma grande quantidade de características clínicas como variabilidade de cor (vermelho, branco, uma mistura de ambas cores), alterações de fisionomia (placa, lisa, verrucosa, granulosa) e pode ser de qualquer extensão¹⁵.

As DPMOs mais comuns no Brasil são leucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, eritroplasia, queilite actínica, Líquen plano oral.

A leucoplasia oral é definida como “uma placa branca de risco questionável que exclui outras doenças ou distúrbios conhecidos que não apresentam risco aumentado

de câncer”^{2,15}. A leucoplasia pode acometer qualquer região de cavidade oral, sendo dividida clinicamente em tipo homogêneo e não homogêneo². Fumo e consumo de álcool são fatores de risco para leucoplasia, sendo esta 6 vezes mais evidente em fumantes do que não fumantes².

A leucoplasia verrucosa proliferativa é uma forma distinta da leucoplasia, apresenta-se como múltiplas leucoplasias simultâneas, e apresenta maior risco de transformação maligna se comparada com as outras DPMOs¹⁵. Uma grande parcela dos pacientes diagnosticados com leucoplasia verrucosa proliferativa desenvolvem carcinomas na cavidade oral, principalmente carcinoma espino celular, estima-se cerca de 49,5% dos pacientes¹⁵.

A eritroplasia é definida como “uma mancha vermelha que não pode ser caracterizada clínica ou patologicamente como qualquer outra doença definível”^{2,15}. Seu aspecto clínico pode ser plano ou desnivelado com superfície lisa ou granulosa². Ocorre na sua maior parte em adultos na meia-idade ou idosos, sem predileção por gênero, seus fatores etiológicos significativos são consumo de álcool e fumo². Qualquer região da cavidade oral pode ser atingida, geralmente é encontrada em um único sítio, isso ajuda a diferenciar de outras lesões como candidíase eritematosa, líquen plano erosivo, lúpus eritematoso^{2,15}. No exame histológico pode-se mostrar com algum grau de displasia ou então carcinoma invasivo ou carcinoma in situ².

A queilite actínica é causada por longas exposições a luz solar e radiação UV, acomete principalmente vermelhão do lábio inferior, geralmente acomete pessoas de meia-idade e trabalhadores que ficam a maior parte expostos ao sol¹⁵.

O líquen plano oral é caracterizado como “doença com manchas reticulares brancas bilaterais afetando mucosa bucal, língua, gengiva”¹⁵, geralmente bilateral. Suas manifestações clínicas incluem líquen plano reticular, que caracteriza por placas brancas difusas com aspecto rendilhado, e líquen plano erosivo, que é a forma mais grave e pode apresentar áreas de atrofia e presença de ulcerações¹⁵.

3.2 Leucoplasia oral

A leucoplasia oral é uma lesão pré-maligna descrita como uma “lesão branca predominante da mucosa oral que não pode ser definida como qualquer outra lesão conhecida”⁵. A taxa de transformação maligna não é igual para todos os tipos de leucoplasia, pois dependem de características como aparecimento de grau de displasia, tipo e local da lesão, esses fatores são os mais atualmente utilizados para

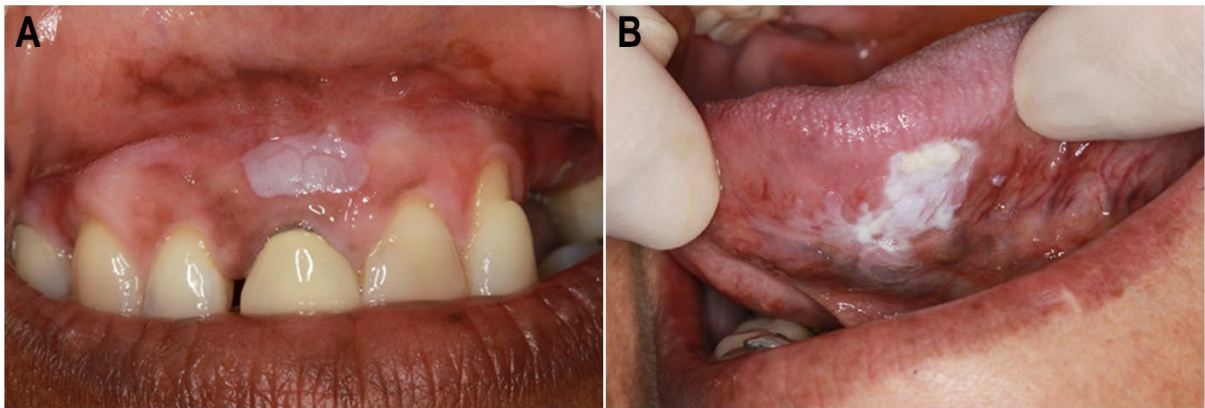
prever o risco de transformação maligna^{4,17}. Não possui alteração tecidual específica, seu diagnóstico se dá por aspectos clínicos e exclusão de outras condições que também se apresentam como placa branca porém não apresentam risco de transformação maligna, como queimadura por aspirina, candidíase pseudomembranosa, lúpus eritematoso, leucoplasia pilosa, estomatite nicotínica, leucoedema^{2,5}.

A epidemiologia da leucoplasia oral é frequentemente mais encontrada em homens com mais de 40 anos, e sua prevalência aumenta com o decorrer da idade⁵. Seus principais fatores etiológicos incluem uso de tabaco, consumo de álcool, radiação UV, esses fatores podem estar correlacionados ou não. A leucoplasia é 6 vezes mais frequente em fumantes do que em não fumantes. E o álcool independe do tipo de bebida consumida ou padrão de consumo².

Pode ser localizada em qualquer sítio da cavidade oral, sendo a língua, o local mais relatado na literatura, seguido por assoalho da boca, gengiva, lábio, palato, e dorso da língua¹⁸. As leucoplasias orais encontradas em língua, palato mole e lábio são consideradas lesões de alto risco de malignidade, enquanto as outras áreas podem ser consideradas de baixo risco⁵. E de acordo com a literatura, a maioria das lesões de leucoplasia oral que tiveram transformação maligna foram maiores que 2cm de extensão¹⁸.

Seus aspectos clínicos são divididos em leucoplasia homogênea e leucoplasia não homogênea. A leucoplasia homogênea (figura 1) é definida como plana branca, fina, uniforme, de mesma coloração e espessura em toda sua extensão², o risco de transformação maligna é relativamente baixo em comparação com as leucoplasias não homogêneas¹⁶. A leucoplasia não homogênea possui como característica placa branca ou avermelhada, com aspecto nodular, verrucoso, placas mais espessas, pode estar relacionada com placas brancas planas e delgadas².

Figura 1. Imagem clínica representativa de pacientes com LO.



Leucoplasia oral em dois pacientes fumantes com placa branca homogênea, não raspável, localizadas em gengiva inserida **(A)** e ventre e língua **(B)**.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Até hoje não existem fatores patognômicos que ajudam a prever com precisão quais LOs podem sofrer transformação maligna¹⁷. Porém há alguns fatores que podem contribuir com essa possibilidade de malignização, como: sexo do paciente, mulheres tendem a desenvolver mais a forma maligna da doença; LO localizadas em sítios de alto risco como língua, lábio, palato mole; presença da forma não homogênea da leucoplasia oral; LO com displasias moderadas e graves tem maior chances de desenvolver para um carcinoma do que LO sem displasia ou com displasia leve⁵.

No caso de leucoplasias com grau de displasia moderada e grave, o tratamento cirúrgico é uma opção recomendada, que pode ser por meio de cirurgia convencional, criocirurgia, eletrocauterização⁵. E no caso de displasias leve, é necessário avaliar localização, tamanho, se paciente é fumante ou não⁵. Existem também tratamentos não cirúrgicos para LO, como terapia fotodinâmica⁵. É muito importante o acompanhamento dos pacientes diagnosticados com leucoplasia oral, pois podem evoluir para malignidade em algum momento de suas vidas.

3.3 Leucoplasia verrucosa proliferativa

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é descrita como “uma doença de origem desconhecida e caracterizada por uma forte tendência a desenvolver áreas de carcinoma”⁸. Como possui algumas características semelhantes a leucoplasia oral ou outras DPMOs, a leucoplasia verrucosa proliferativa geralmente é diagnosticada tardiamente e se baseia na observação de sua progressão clínica¹⁰. Além disso, para

o diagnóstico da LVP é feita por suspeita clínica e importante comunicação entre clínico e patologista⁹.

Até os dias de hoje, a etiologia da leucoplasia verrucosa proliferativa permanece incerta, e os fatores biológicos acerca dessa DPMO também não são conclusivos⁹. Ademais, ao contrário da leucoplasia oral que tem como fatores de risco álcool e tabaco, nenhum fator de risco foi associado ao desenvolvimento da leucoplasia verrucosa proliferativa¹⁰. Entretanto, algumas características foram associadas que possibilitam um certo diagnóstico precoce da LVP, ocorre na sua maior parte em mulheres do que em homens, pacientes mais velhos (mais que 60 anos), sem fatores de risco associados, e podem acometer toda a cavidade oral, mas encontrada com maior frequência em mucosa bucal, língua e gengiva¹⁰.

O exame histopatológico não pode ser usado para definir o diagnóstico final de LVP isoladamente, a observação dos aspectos clínicos é importante para identificação dessa DPMO⁹. Há algumas características que podem servir de alerta para uma possível existência de LVP, como presença de inflamação liquenóide densa, configuração verrucosa exofíticas, hiperortoceratose ondulada⁹. Por exemplo, presença de uma leucoplasia plana, multifocal, no rebordo alveolar ou na gengiva de uma mulher idosa sem presença de fatores de risco, pode gerar suspeita de leucoplasia verrucosa proliferativa⁹.

Segundo Ann M et al.¹⁰ (2014) há 4 manifestações histopatológicas da LVP, “hiperplasia plana localizada e hiperqueratose, expansão multifocal/geográfica com ou sem displasia, desenvolvimento de hiperplasia verrucosa, progressão para carcinoma espinocelular”¹⁰, na figura 2 mostra imagens clínicas de leucoplasia verrucosa proliferativa.

Figura 2. Imagem clínica representativa de paciente com LVP.



Paciente do sexo feminino com diagnóstico de LVP apresentando múltiplas placas brancas de aspecto homogêneo, não raspável, localizadas em mucosa jugal bilateral (**A e B**) e soalho bucal (**B**).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Há outros distúrbios orais que podem ter características semelhantes a LVP, e devem ser consideradas como diagnóstico diferencial, como a leucoplasia oral, principalmente a não homogênea possui placas brancas multifocais, irregulares, mas sua etiologia inclui homens adultos, e possui fatores de risco como álcool e tabaco; hiperplasia verrucosa, a qual também possui predominância em mulheres idosas, o manuseio de ambos é semelhante; líquen plano oral, placa branca bilateral, simétrica presente na mucosa bucal, e pode se apresentar de forma reticular ou eritematosa; leucoplasia pilosa oral, que acomete principalmente borda lateral de língua, mas pode se espalhar por toda cavidade oral, porém está ligada ao vírus Epstein-Barr¹⁰.

Segundo a literatura, os pacientes que apresentam LVP, geralmente possuem múltiplas lesões, e frequentemente, múltiplas malignidades, com isso, muitas vezes esses pacientes são submetidos a várias intervenções, como excisão a laser, excisão cirúrgica, medicamentos, terapias fotodinâmicas, muitas biópsias, acompanhamento clínico rigoroso¹⁹. Não é fácil decidir qual melhor sítio da cavidade oral para realizar

biópsia em casos de LVP, a gengiva e mucosa bucal apresentam maior incidência dessa DPMO, sendo que a gengiva possui maior número de casos que sofrem transformação maligna¹⁹.

Neste momento, ainda não há um tratamento específico para leucoplasia verrucosa proliferativa, a doença é melhor contida quando ainda não há transformação maligna, com terapias fotodinâmicas ou ablação com laser de CO₂, tratamentos cirúrgicos conservadores não se obtiveram sucesso¹⁰. No momento, a melhor forma é acompanhamento clínico do paciente, de forma a detectar precocemente o câncer, e realizar a excisão cirúrgica do local¹⁰.

Entretanto, de acordo com a literatura, pouco se relata sobre o avanço da LVP, há ausência de critérios diagnósticos, curto período de acompanhamento, pouca informação sobre o acompanhamento, ou sobre a taxa de abandono dos pacientes, dificultando assim encontrar uma concordância sobre os aspectos que envolvem a leucoplasia verrucosa proliferativa, como etiologia, fatores de risco, fatores biológicos¹⁹.

3.4 Displasias epiteliais

É o termo usado para descrever alterações histopatológicas do epitélio da cavidade oral que indicam risco de transformação maligna, o qual indica o crescimento anormal²⁰. No entanto, a displasia não indica alterações necessariamente neoplásicas, mas sim um indicador de neoplasia, visto que a displasia apresenta alterações moleculares diferentes do carcinoma, pode permanecer sem progressão por décadas, e resolvida com tratamento conservador ou de forma espontânea²⁰.

As DPMOs são descritas como potencialmente malignas, pois a displasia pode ou não estar presente no histopatológico, e quando presente indica um risco de transformação maligna, os quais podem ou não se tornar carcinoma²⁰.

A displasia epitelial foi conceituada em 2003 pela OMS como “hiperplasia, leve, moderada, grave ou carcinoma in situ de acordo com a presença e gravidade da atipia celular e com características arquitetônicas baseadas na espessura das camadas displásicas em comparação com o epitélio total”⁷. Porém em 2017, as categorias foram reduzidas de cinco para três, sendo leve, moderada e grave, eliminando a hiperplasia, e sintetizando displasia grave com carcinoma in situ²⁰.

Há algumas características que envolvem a displasia epitelial, sendo elas, a proliferação alterada, que é o aumento da atividade mitótica; perda da organização

epitelial, resultando em estratificação irregular, desorganização de células basais; maturação alterada, ocasionando queratinização unicelular; atipia celular, causando anormalidade no tamanho e forma das células²⁰.

Na displasia leve da mucosa oral há células basais que geram células com citoplasma eosinofílico sem atipias, há presença de resposta imune liquenóide. Na displasia moderada é possível observar atipia citológica leve, acantose, resposta imune liquenóide, perda de polaridade das células basais, aumento da relação núcleo-citoplasma, pleomorfismo nuclear. Na displasia grave observa-se queratinização unicelular, perda de união das células nas camadas inferiores com atipia celular²⁰.

As características de displasia em leucoplasia verrucosa proliferativa são diferentes, em seu estágio inicial não apresenta citologia atípica, podendo se desenvolver em estágios avançados de LVP. Além disso, há presença de inflamação liquenóide, o que pode resultar em um falso diagnóstico de Líquen plano²⁰. Por isso para o diagnóstico de LVP é muito importante a relação clínico-patológico.

Para uma correta avaliação de grau de displasia é importante a realização de uma boa biópsia, com uma boa descrição clínica da lesão²⁰.

Os graus de displasia não devem ser usados para determinar o tipo de tratamento, deve ser avaliado o contexto em que o paciente se encontra, quais hábitos esse paciente possui, idade, sexo, aparência clínica da lesão. Um grau moderado ou grave pode indicar a presença de um possível carcinoma, sendo importante a realização de acompanhamento²⁰. Além disso, a ausência de displasia não exclui a presença de malignidade daquela lesão, o diagnóstico clínico de DPMO indica a presença de algum risco, mesmo que mínimo²⁰.

3.5 Proteínas 14-3-3

As proteínas 14-3-3 são importantes componentes na biologia do câncer, pois regulam processos celulares, como apoptose, sinalização mitogênica, progressão do ciclo celular¹². Elas também agem como moléculas reguladoras, regulando a resposta das células devido a prejuízos ao DNA¹³. Há 7 genes da proteína 14-3-3 presentes no organismo humano, sendo as β (beta), γ (gama), ϵ (épsilon), η (eta), σ (teta), Σ (sigma), e ζ (zeta). E duas delas, a proteína 14-3-3 σ e 14-3-3 ζ foram encontradas na etiologia do câncer. A maior parte desses genes são encontrados em todo o organismo, com exceção da σ que é encontrada no epitélio¹².

Essas proteínas da família 14-3-3 formam estruturas hetero ou homodiméricas, e se ligam às enzimas fosfoserina ou treonina, presentes na proteína alvo, também podem se ligar independente de fosforilação. Essa ligação com a proteína alvo pode provocar aumento da sua atividade, facilitar a fosforilação por quinases, modificar a capacidade das atividades enzimáticas¹³. Estudos mostram que 14-3-3 também desempenha papel importante da proliferação celular, etapa em que mais ocorre o desenvolvimento de câncer, contribuem com essa fase através de ligação e modulação da atividade proteica¹³. Uma via importante na proliferação celular é a Ras-Raf-MAPK, que contem as enzimas Raf, essa via é responsável pela transdução de sinais promotores de crescimento, e a atividade anormal dessa via pode estar relacionada a presença de malignidade¹³.

Acredita-se que a proteína 14-3-3 σ age como supressor de câncer, inibindo o curso do ciclo celular, fazendo com ocorra diferenciação celular. E além disso, a regulação negativa do 14-3-3 σ foi encontrada em vários tumores, como câncer de mama, câncer de pulmão²¹. Entretanto, sua superexpressão também foi relatada em tumores de pâncreas e próstata, e quando presente pode ser uma forma de alerta para malignidade, e também pode agir de forma a resistir a drogas que causam dano ao DNA em alguns tumores²¹. E foi observado que a perda dessa proteína em tumores de mama está relacionado com aumento da tumorigênese e capacidade metastática¹³.

A proteína 14-3-3 ζ tem sido estudada como potencial oncogênico, devido sua interação com proteínas alvo presente na iniciação do tumor. Sua superexpressão foi encontrada em alguns tumores, como câncer de mama, de pulmão, carcinoma de cabeça e pescoço e escamosos orais, e são relacionados com chance de recorrência desses tumores, além de baixa sobrevida do paciente²¹.

O nível celular dessas proteínas 14-3-3 presentes no organismo humano podem ajudar a diagnosticar e prever o prognóstico do carcinoma ou doença, e também para antecipar a resposta dos pacientes aos tratamentos¹³.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi submetido e aprovado pelo CEP/FOAr – Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (CAAE: 34361814.9.0000.5416), presente no anexo A.

4.1 Amostras teciduais

Este estudo avaliou 127 amostras parafinadas. Destas, 31 amostras foram oriundas do arquivo de amostras do Serviço de Medicina Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, 73 foram da Universidade de Helsinki (Finlândia) e 23 amostras foram da Universidade de Santiago de Compostela (Espanha). As amostras incluídas neste estudo são referentes a pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO e LVP que revelaram lesões displásicas e também amostras de carcinoma espinocelular ou verrucoso derivados de pacientes prévio de LVP, além de amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória (controle). Todos os pacientes incluídos neste estudo apresentaram tempo mínimo de 5 anos de acompanhamento e foram diagnosticados com base nos achados clínico-patológicos propostos pela classificação de 2017 da OMS para tumores de cabeça e pescoço¹.

As informações clínicas, demográficas, de tratamento, recidiva e transformação maligna foram coletados dos prontuários médicos. Uma vez incluídos nos estudos, os blocos de parafina foram submetidos a dois novos cortes com 5µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosin (H&E), e posteriormente analisados para descrição morfológica e confirmação do diagnóstico. O grau de displasia epitelial e/ou graduação histológica do tumor foi determinado com base nos critérios propostos pela OMS¹. Foi feito segundo os critérios de Kujan e colaboradores⁷ (2006), a análise do risco de transformação maligna nas amostras de lesão displásica, 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)¹⁶.

4.2 Avaliação da expressão imuno-histoquímica da proteína 14-3-3

As reações de imuno-histoquímica (IHQ) foram realizadas em cortes histológicos de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano e submetidos à técnica IHQ pelo método

da estreptavidina-biotina-peroxidase (Universal LSABTM+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat, K0690, Dako). Inicialmente os cortes foram desparafinizados em estufa a 70° durante 2 horas e após este período foram realizadas duas trocas de xilitol por 10 minutos cada uma. Em seguida, as amostras foram hidratadas em soluções com concentrações decrescentes de etanol (90%, 70% e 50%) e depois lavadas com água destilada por dois minutos. O procedimento para a recuperação antigênica foi realizado em solução aquosa de 10mM ácido cítrico pH 6,0 em panela de pressão elétrica por 15 minutos após o início da pressão. Seguindo o resfriamento do material, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com a incubação com peróxido de hidrogênio 0,1% por 5 minutos. Após a lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, os cortes foram então incubados com os diferentes anticorpos primários devidamente diluídos, em câmara úmida por 18h a 4°C. O anticorpo primário que foi utilizado neste estudo e sua respectiva diluição está descrito em detalhes no quadro 1. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi adicionado (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA) e incubação foi feita durante 30 minutos a 37°C, seguida de lavagem com PBS. Em seguida, foi realizada a exposição ao sistema amplificação (Strept AB Complex/HRP Duet, Dako, EUA) por 30 minutos a 37°. A revelação foi realizada em solução contendo 120 mg de 3,3 diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB, SigmaAldrich, EUA) diluído em 200 ml de PBS, 2 ml de peróxido de hidrogênio (10 volumes) e 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) a 37°C durante 3 minutos. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Carrazi durante 5 minutos, seguida de lavagens em água corrente por 8 minutos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em três trocas rápidas de álcoois absolutos, passadas em xilol diafanização e de montagem. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan Merck e com lamínulas devidamente limpas.

Quadro 1 - Anticorpos primários para os experimentos de imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
14-3-3 (YWHAS)	Policlona I	Sigma (A4377)	1:100

Fonte: Elaboração própria.

Após a reação de imuno-histoquímica, as lâminas histológicas de cada caso foram escaneadas utilizando objetiva 20x através do digitalizador histológico ScanScope CS (Aperio Solutions ePathology, CA, EUA), obtendo-se imagens digitais de alta resolução dos cortes histológicos. A intensidade de marcação intra-epitelial foi avaliada por meio do algoritmo “positive pixel Count V9”. Este método de pontuação levou em consideração a intensidade de pixels e porcentagem de células marcadas. O cálculo da intensidade de marcação foi determinada segundo orientações fornecidas em estudo prévio realizado por Bufalino et al.²² em 2015. As quantificações foram realizadas cegamente pela autora e posteriormente os resultados obtidos foram correlacionados com os respectivos diagnósticos e achados clínico-patológicos e demográficos. Os dados foram tabulados e a distribuição normal ou não-normal foi determinada por testes de normalidade e pela análise descritiva de Skewness and Kurtosis para posterior aplicação de testes estatísticos adequados. Quando apropriado, alguns resultados foram avaliados também de forma descritiva/qualitativa. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ($p=0.05$) utilizado o software estatístico SPSS versão 19.

5 RESULTADO

Os resultados das reações de imuno-histoquímica para 14-3-3 foram obtidos a partir de 127 amostras parafinadas, sendo 31 amostras de LO, 86 amostras de LVP, e 10 amostras de HFI (controle).

5.1 Características clínico-patológicas dos pacientes

O perfil epidemiológico dos pacientes incluídos neste estudo revelou que a maior parte dos indivíduos de leucoplasia oral pertence ao sexo feminino (n=19; 61,3%), não fumantes (n=18; 58,1%) e não consumidor de álcool (n=27; 87,1%). Além disso, a maior parte dos indivíduos de LO apresentaram lesão única na cavidade oral, sendo a língua o local com maior número de casos (n=16; 51,6%). E destes pacientes, apenas 3 sofreram transformação maligna (n=3; 9,7%). Analisando as características clínico-patológicas dos pacientes com leucoplasia verrucosa proliferativa, observamos que sua maioria é composta por pacientes do sexo feminino (n=61; 70,9%), não fumantes (n=67; 77,9%) e não consumidores de álcool (n=82; 95,3%). A maior parte dos pacientes apresentaram lesões múltiplas na cavidade oral, rebordo alveolar (n=19; 22,1%), língua (n=17; 19,8%) e mucosa gengival (n=15; 17,4%) foram os sítios que mais obtiveram lesões. Destas amostras, a maior parte sofreu transformação maligna (n=50; 58,1%). Na tabela 1 mostra as características clínicas dos grupos LO e LVP incluídos na análise de imuno-histoquímica.

Tabela 1 – Características clínico-patológicas dos indivíduos do grupo LO e LVP selecionados para a análise de imuno-histoquímica

Parâmetros	LO (n=31) n (%)	LVP (n=86) n (%)
Sexo		
Masculino	12 (38,7)	25 (29,1)
Feminino	19 (61,3)	61 (70,9)
Tabaco		
Não	18 (58,1)	67 (77,9)
Sim	13 (41,9)	19 (22,1)
Álcool		
Não	27 (87,1)	82 (95,3)
Sim	4 (12,9)	4 (4,7)
Sítios orais		
Mucosa jugal	5 (16,1)	9 (10,5)
Margem gengival	0 (0,0)	15 (17,4)
Assoalho bucal	1 (3,2)	7 (8,1)
Rebordo alveolar	0 (0,0)	19 (22,1)
Lábio	1 (3,2)	3 (3,5)
Mucosa bucal	1 (3,2)	10 (11,6)
Retrocomissura	3 (9,7)	3 (3,5)
Língua	16 (51,6)	17 (19,8)
Palato	4 (12,9)	3 (3,5)
Transformação maligna		
Não	28 (90,3)	36 (41,9)
Sim	3 (9,7)	50 (58,1)
Recidiva		
Não	26 (83,9)	9 (10,5)
Sim	5 (16,1)	77 (89,5)

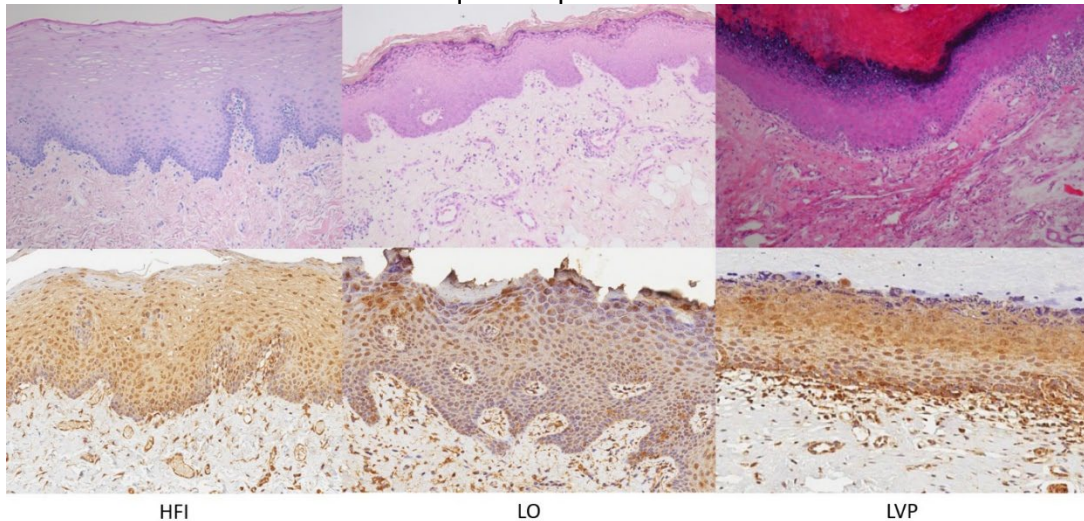
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Expressão de 14-3-3 em LO e LVP

Em nosso estudo os grupos LO, LVP e HFI foram considerados uma variável independente e a expressão de YWHAQ (14-3-3) foi considerada uma variável dependente. Assim, isso caracterizou uma ANOVA unidirecional. Pela análise de assimetria e curtose, os dados apresentam distribuição normal e heterocedasticidade segundo o Teste de Igualdade de Matrizes de Covariância de Box e o Teste de Igualdade de Variâncias de Levene (ambos $p < 0,001$). O 14-3-3 foi mais expresso em LO em comparação com HFI ($p = 0,033$) e mais expresso em LVP em comparação com HFI ($p = 0,000$), enquanto a expressão entre LVP e LO não houve diferença estatisticamente significativa entre as duas condições. Na figura 3, temos a imagem

representativa de coloração por hematoxilina-eosina, e marcação histoquímica para 14-3-3. Na figura 4, temos a imagem representativa do padrão de marcação de imunohistoquímica para amostras do nosso grupo de pesquisa. Na figura 5, mostra a diferença estatística entre as amostras de LO e LVP.

Figura 3 – Imagens representativas da coloração por H&E e marcação de histoquímica para 14-3-3



Fragmentos de tecidos corados com H&E e respectivos padrões de marcação de histoquímica para 14-3-3 em amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), leucoplasia oral (LO) e leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

Em um estudo prévio realizado por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado por meio de análise proteômica que amostras teciduais oriundas de paciente com diagnóstico clínico-patológico de LVP apresentaram uma maior quantidade de proteínas super expressas em relação às amostras de LO e controles (dados não publicados). Além disto, neste mesmo estudo foi demonstrado que existe uma diferença significativa entre LVP e LO ao comparar as vias estabelecidas com as proteínas descobertas, envolvendo principalmente vias do sistema imunológico que estão relacionadas com o processo de imunovigilância^{24,25}. Estes achados podem explicar porque a LVP apresenta alto risco de transformação maligna em comparação com LO²³.

Com base neste achado prévios do nosso grupo de pesquisa, os membros da família de proteínas YWHA foram destacados na análise contextual, refletindo o fato de que a atividade e a função das proteínas que compõe a matriz de amostras de LVP estão intimamente ligadas às suas interações. Além disso, a rede projetada através do STRING mostrou um agrupamento das mesmas proteínas, que foram implicadas na regulação de vários processos de sinalização intracelular, incluindo ciclo celular, proliferação celular, migração celular, ponto de verificação de dano ao DNA, apoptose, autofagia, modulação da expressão gênica e regulação de oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor, nestes últimos, ao se ligarem às proteínas YWHA, podem modular sua atividade, localização celular, estabilidade e interações^{11,13}. Ademais, a superexpressão de proteínas YWHA está fortemente associada ao desenvolvimento, baixas taxas de sobrevivência e piores resultados de tratamento em tumores de cérebro, pulmão, mama, fígado e bexiga^{13,26-29}.

Nesse estudo um membro da família 14-3-3 de proteínas, codificada pelo gene YWHAQ, também conhecida como proteína 14-3-3 tau (em humanos) ou 14-3-3 theta (em ratos), que havia sido identificado no estudo proteômico como diferencialmente expresso nos grupos LVP comparado com controle e LO, não revelou diferença estatística na análise de validação imuno-histoquímica entre LVP e LO. Entretanto, esses dados suportam nossa hipótese de que essas proteínas estão envolvidas no processo de transformação maligna de ambas DPMOs. A impossibilidade de estabelecer diferença estatística entre as lesões de DPMOs pode ser devido ao fato de que a presença dessa proteína, assim como da família YWHA, crie caminhos

compartilhados para ambas as lesões, e sua maior presença facilita o processo de transformação maligna.

De acordo com a literatura, a análise imuno-histoquímica da família da proteína 14-3-3 revelou que houve um aumento das isoformas teta, épsilon, zeta em meningiomas. E as isoformas sigma, eta, zeta, obtiveram uma diminuição significativamente estatística de RNAm em tecidos de tumores ao serem comparados aos tecidos sem tumores. Além disso, as isoformas épsilon e zeta mostraram uma alta expressão tanto em tecidos sem tumores, quanto em tecidos com tumores³⁰.

A isoforma sigma do 14-3-3 apresentou uma queda significativa de sua expressão, a qual também já foi relatada em tumor de mama, então se supõe que a baixa expressão dessa isoforma pode estar relacionada ao aparecimento de tumores³⁰. E quando há comparação de tecidos com amostras tumorais e o mesmo tecido sem tumor, há um aumento da sensibilidade de detecção da expressão gênica, com alteração da expressão de todas as isoformas³⁰.

A comparação de amostras de tumores em estágio inicial e tardio, mostrou que a isoforma sigma do 14-3-3 teve uma diminuição significativa em estágios tardios em comparação aos iniciais, sugerindo que sua depressão está relacionada ao avanço do câncer no organismo humano. Entretanto, as isoformas gama e épsilon obtiveram um aumento de expressão em comparação do estágio avançado com o estágio inicial do tumor³⁰.

Para explicar essa diminuição da expressão do 14-3-3 sigma, estudos anteriores mostraram que o silenciamento da transcrição de gene através da hipermetilação do promotor é um mecanismo que causa desequilíbrio da expressão do 14-3-3 sigma em muitos tumores, como de bexiga, próstata, tecidos hepáticos³⁰. E também em câncer de mama, sendo um biomarcador importante para esse tumor.

Em outros estudos, é possível observar que a maioria das isoformas do 14-3-3 são encontradas elevadas em vários tipos de tumores, com exceção da isoforma sigma e teta. A isoforma zeta tem elevada expressão em vários tipos de cânceres, como de ovário, mama, pulmão, próstata, e sua presença tem sido relacionada com o prognóstico ruim e resistência desses tumores³¹.

Então é possível observar que a família do 14-3-3 foi encontrada em vários tipos de tumores, com a hipótese de que essas proteínas tenham um papel importante na manutenção do fenótipo normal, mas se houver alteração nesses genes, pode promover tumorigênese³⁰.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, as evidências deste estudo sugerem que as proteínas da família YWHA, incluindo a proteína 14-3-3 podem estar envolvidas no processo de malignidade de LVP e LO. No geral, mais pesquisas são necessárias para entender melhor seu papel desta família de proteínas no processo de transformação maligna da LVP para fornecer novos alvos para o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico, bem como tratamentos para melhorar o prognóstico de pacientes com LVP.

REFERÊNCIAS*

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Takata T, Grandis JR, Slootweg PJ. The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives. *Hum Pathol.* 2017; 66: 10-12.
2. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5): 317-23.
3. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 423-5.
4. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8): 770-80.
5. Ribeiro AS, Salles PR, da Silva TA, Mesquita RA. A review of the nonsurgical treatment of oral leukoplakia. *Int J Dent.* 2010; 2010: 186018.
6. Speight PM, Khurram SA, Kujan O. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018; 125: 612–27.
7. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006; 42(10): 987-93.
8. Hansen LS, Olson JA, Silverman Jr S. Proliferative verrucous leukoplakia: a long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(3): 285-98.
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; 20(6): 416-23.
10. Gillenwater AM, Vigneswaran N, Fatani H, Saintigny P, El-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia: recognition and differentiation from conventional leukoplakia and mimics. *Head Neck.* 2014; 36(11): 1662-68.
11. Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16(3): 203-13.
12. Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(12): 931-43.

* 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>

13. Khorrami A, Sharif Bagheri M, Tavallaei M, Gharechahi J. The functional significance of 14-3-3 proteins in cancer: focus on lung cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2017; 32(3): 2017-32.
14. Gasco M, Bell AK, Heath V, Sullivan A, Smith P, Hiller L et al. Epigenetic inactivation of 14-3-3 sigma in oral carcinoma: association with p16(INK4a) silencing and human papillomavirus negativity. *Cancer Res.* 2002; 62(7): 2072-76.
15. Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MA, 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; 27(8):1862- 80.
16. Warnakulasuriya S, Johnson 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.
17. Monteiro L, Mello FW, Warnakulasuriya S. Tissue biomarkers for predicting the risk of oral cancer in patients diagnosed with oral leukoplakia: a systematic review. *Oral Dis.* 2021; 27(8): 1977-92.
18. Aguirre-Urizar JM, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral leukoplakia: systematic review and meta-analysis of the last 5 years. *Oral Dis.* 2021; 27(8): 1881-95.
19. Ramos-García P, González-Moles MÁ, Mello FW, Bagan JV, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2021; 27(8): 1896-907.
20. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis.* 2021; 27(8):1947-76.
21. Freeman AK, Morrison DK. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22(7): 681-7.
22. Bufalino A, Cervigne NK, de Oliveira CE, Fonseca FP, Rodrigues PC, Macedo CC et al. Low miR-143/miR-145 Cluster levels induce activin a overexpression in oral squamous cell carcinomas, which contributes to poor prognosis. *PLoS One.* 2015; 10(8): e0136599.
23. Iocca O, Sollecito TP, Alawi F, Weinstein GS, Newman JG, Virgilio AD 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; 42(3): 539-55.

24. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10): 715-27.
25. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004; 21(2): 137-48.
26. Yan Y, Xu Y, Gao YY, Zong ZH, Zhang Q, Li C et al. Implication of 14-3-3 ϵ and 14-3-3 θ/τ in proteasome inhibition-induced apoptosis of glioma cells. *Cancer Sci.* 2013; 104(1): 55–61.
27. Li N, Wang H, Fan J, Tong C, Yang J, Wei H et al. Overexpression of 14-3-3 θ promotes tumor metastasis and indicates poor prognosis in breast carcinoma. *Oncotarget.* 2014; 5(1): 249-57.
28. Heidenblad M, Lindgren D, Jonson T, Liedberg F, Veerla S, Chebil G et al. Tiling resolution array CGH and high density expression profiling of urothelial carcinomas delineate genomic amplicons and candidate target genes specific for advanced tumors. *BMC Med Genomics.* 2008; 1: 3.
29. Ko BS, Chang TC, Hsu C. Overexpression of 14-3-3 ϵ predicts tumour metastasis and poor survival in hepatocellular carcinoma. *Histopathology.* 2011; 58(5): 705-11.
30. Young GM, Radhakrishnan VM, Centuori SM, Gomes CJ, Martinez JD. Comparative analysis of 14-3-3 isoform expression and epigenetic alterations in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2015; 15: 826.
31. Fan X, Cui L, Zeng Y, Song W, Gaur U, Yang M. 14-3-3 Proteins are on the crossroads of cancer, aging, and age-related neurodegenerative disease. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(14): 3518.

ANEXO A – COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES PARA LEUCOPLASIA ORAL E LEUCOPLASIA VERRUCOSA PROLIFERATIVA

Pesquisador: Andreia Bufalino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34361814.9.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 822.355

Data da Relatoria: 07/10/2014

Apresentação do Projeto:

O Projeto de Pesquisa apresenta uma introdução que descreve a importância de identificar biomarcadores tumorais para leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa para auxiliar no diagnóstico e tratamento destas doenças que acometem um grande número de pessoas.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar potenciais biomarcadores tumorais para leucoplasias e leucoplasia verrucosa proliferativa que possam futuramente serem auxiliares no diagnóstico, prognóstico e tratamento destas doenças.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos que os pacientes estarão sujeitos, segundo o Pesquisador Responsável, poderão ocorrer durante a realização da biópsia e dor após a cirurgia.

Em relação aos benefícios, de acordo com o diagnóstico da biópsia, os pacientes receberão o tratamento adequado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A Pesquisa irá utilizar material biológico obtido de pacientes que procuram tratamento de suas

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: 1633-0164

Fax: 1633-0164

E-mail: cep@foar.unesp.br, mnagle@foar.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
ARARAQUARA - UNESP



Continuação do Parecer: 822.355

lesões na Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP e, para validação por imuno-histoquímica utilizará amostra de tecidos parafinizados e culturas de linhagens de células para validação em culturas, ambos "in vitro".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi alterado, agora escrito em linguagem para leigo, no singular referindo-se somente ao Paciente que irá participar ou não da pesquisa. Os riscos e benefícios referentes à biópsia estão claros, bem como todos os cuidados que serão tomados antes e após a cirurgia.

Recomendações:

Corrigir algumas palavras digitadas erradas e algumas frases sem concordância no projeto completo.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As recomendações e dúvidas relacionadas pelo Parecerista foram atendidas. Sendo assim, aprovo a realização do Projeto de Pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 7 de outubro de 2014.

ARARAQUARA, 07 de Outubro de 2014

Assinado por:
Maurício Meirelles Nagle
(Coordenador)

Endereço: HUMAITA 1680	CEP: 14.801-903
Bairro: CENTRO	
UF: SP	Município: ARARAQUARA
Telefone: 1633-0164	Fax: 1633-0164
	E-mail: cep@foar.unesp.br; mnagle@foar.unesp.br