



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



Camila de Oliveira Barbeiro

**Participação do receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) na transformação
maligna da leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa**

Araraquara

2023



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



Camila de Oliveira Barbeiro

Participação do receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) na transformação maligna da leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

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

Orientadora: Andreia Bufalino

Araraquara

2023

B233p

Barbeiro, Camila de Oliveira

Participação do receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) na transformação maligna da leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa / Camila de Oliveira Barbeiro. -- Araraquara, 2023

113 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientadora: Andreia Bufalino

1. Leucoplasia oral. 2. Imuno-histoquímica. 3. Biomarcadores tumorais. 4. Receptores de Quinase C Ativada. 5. Revisão sistemática.

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.

Camila de Oliveira Barbeiro

Participação do receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) na transformação maligna da leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Diagnóstico e Cirurgia

Andreia Bufalino

Elaine Maria Sgavioli Massucato

Cláudia Maria Navarro

Bruno Augusto Benevenuto de Andrade

Janete Dias Almeida

Araraquara, 11 de setembro de 2023

DADOS CURRICULARES

Camila de Oliveira Barbeiro

NASCIMENTO: 01/11/1991 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Andréa Gouvêa de Oliveira
Roberto Henrique Barbeiro

2011-2016: Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP

2013-2014: Iniciação Científica no Departamento de Odontologia Social - Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

2016-2016: Extensão Universitária em Laserterapia para pacientes com doenças bucais e complicações oncológicas junto ao departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP

2017-2018: Aperfeiçoamento em Estomatologia pela Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, UNESP e pela Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo (SES-SP).

2018-2020: 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.

2021-2021: Estágio Supervisionado em Docência nas disciplinas de Estomatologia I e II do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, FOAr – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” - UNESP.

2020-2023: Curso de Doutorado 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 tese primeiramente à Deus, por ter me abençoado com mais essa conquista e por ter me dado forças para superar as dificuldades que surgiram durante o meu percurso.

Aos meus pais, Andréa Gouvêa de Oliveira e Roberto Henrique Barbeiro por serem os responsáveis por eu ter chegado até aqui, pelos caminhos que trilhei, pela criação e educação que me proporcionaram e por sempre terem me apoiado e me incentivado a estar onde eu estou hoje.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** que me deu a oportunidade de continuar meus estudos e ter tido a oportunidade de fazer pós-graduação em uma das melhores Universidades de Odontologia. Me deu forças para superar as dificuldades e foi a quem eu sempre busquei e me apoiei para conseguir concluir os meus objetivos. Sem Ele as conquistas e batalhas vencidas não teriam sido possíveis.

Aos meus pais **Andréa Gouvêa de Oliveira** e **Roberto Henrique Barbeiro** por sempre me apoiarem, me darem todo amor, atenção e incentivo para eu nunca desistir. Além de todo apoio e ajuda para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Minha mãe que sempre aguentou minhas crises e me ajudou com seu enorme amor e com os melhores conselhos; e meu pai, que além de meu professor da vida, continua sendo o melhor professor que eu poderia ter durante a minha vida acadêmica e agora na pós-graduação. Tive a honra de receber seu infinito conhecimento sobre a nossa profissão. Ambos são meu porto-seguro e a quem eu dedico as minhas vitórias e alegrias. Amo muito vocês!

Quero agradecer à minha avó querida **Terezinha Vicência Gouvêa de Oliveira** que sempre me apoiou, me mimou e me deu todo amor e carinho que os avós sabem dar.

Quero agradecer meu avô querido e amado, **Jesus Carlos de Oliveira** (in memoriam) cuja presença foi essencial na minha vida.

Agradeço à **Janaina Spreafico** por todo apoio e por ter me dado o melhor presente e a maior alegria: a Lulu, minha irmã mais linda que eu amo infinitamente.

Ao **Thiago Paiva Fronteira** que sempre viu toda a correria da Faculdade e sempre me apoiou, me desejando muito sucesso e proferindo palavras de incentivo.

Agradeço ao **Augusto Cesar Fiore**, meu companheiro que muitas vezes teve que me aguentar estressada e preocupada, mas sempre me apoiou e me fez acreditar que no fim tudo daria certo.

À minha orientadora **Andreia Bufalino** por ter sempre compartilhado comigo todo seu conhecimento e por ter sido responsável pela execução e conclusão desta pesquisa, além de ter depositado em mim a sua confiança para fazer parte deste grupo pesquisa. Assim como agradeço a amizade que construímos ao longo dos anos que trabalhamos juntas.

Agradeço o professor **Jorge Esquiche León** por também compartilhar todo seu conhecimento comigo, por sempre estar disposto a ajudar e esclarecer dúvidas, assim como sempre me ofereceu a oportunidade de apresentar trabalhos em congressos e publicar artigos científicos. Agradeço também por ter me dado a oportunidade de participar e acompanhar as atividades desenvolvidas em seu laboratório de histopatológica na FORP-USP.

Agradeço também à professora **Morgana Rodrigues Guimarães Stabili** por todas as contribuições durante a pós-graduação e por ter feito parte dessa minha jornada.

Agradeço às **professoras da Disciplina de Diagnóstico Bucal, Profa. Elaine Maria Sgavioli Massucato, Profa. Andreia Bufalino, Profa. Mirian Aparecida Onofre e Profa. Cláudia Maria Navarro** por terem sempre compartilhado comigo todo conhecimento, tirado dúvidas e por terem me dado a oportunidade de participar das disciplinas e por ter contribuído para o meu crescimento profissional na área.

Aos meus amigos de pós-graduação, **Mariel Ruivo Biancardi, Heitor Albergoni da Silveira, Evânio Vilela da Silva, Analú Barros de Oliveira** pela amizade, pela parceria nos trabalhos, pela companhia do dia a dia e por tornarem os momentos difíceis mais leves.

Agradeço a **Mariana Paravani Palaçon** pela parceria no dia a dia, nos experimentos, nas clínicas e por todas as contribuições para a realização deste trabalho.

Agradeço ao **Túlio Morandin Ferrisse** pela parceria e por estar sempre disponível e disposto a nos ajudar com sua calma, além de nos ajudar com seus conhecimentos em estatística e revisão sistemática, contribuindo de forma significativa em nosso trabalho.

Às minhas queridas amigas da graduação e da pós-graduação, **Claudia Carolina Jordão e Camila Jabr** por terem sempre me apoiado, me consolado nos momentos difíceis, compartilhado comigo suas experiências da pós-graduação e principalmente, pela amizade.

Agradeço também a minha amiga de longa data, **Paola Palombo**, que sempre me apoiou e me incentivou mesmo a distância, tanto com sua amizade e carinho, quanto com sua experiência de pós-graduação e como excelente pesquisadora.

À minha amiga **Maria Cristina Barbieri Góes** que sempre me apoiou nos estudos, desde a época do colegial e do cursinho. Obrigada por toda amizade e por todo incentivo.

Agradeço também à **Ana Cristina Jorge** da Biblioteca que foi muito atenciosa em me ajudar e me orientar para que eu pudesse fazer a edição e formatação da minha dissertação.

Agradeço aos **professores do departamento de Diagnóstico e Cirurgia**, assim como os **professores do Programa de Ciências Odontológicas e amigos da pós-graduação** que de alguma forma contribuíram para o sucesso desta pesquisa, bem como para minha evolução durante a pós-graduação.

Agradeço também aos funcionários do departamento de Diagnóstico e Cirurgia, **Antônio Medeiros, Isabela Manzolli, Suleima Ferreira e Juliana Mattos**, por serem solícitos, competentes e por ajudarem na fluidez do dia a dia e deixarem as burocracias mais leves.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, **Cristiano Afonso Lamounier** e **José Alexandre Garcia** por todo auxílio e disponibilidade durante o meu doutorado.

Agradeço a **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, UNESP**, na pessoa de seu atual diretor **Edson Alves de Campos** por todas as oportunidades concedidas.

Agradeço à **CAPES**: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de 001.

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”
O pequeno príncipe - Antoine de Saint-Exupéry*

* Saint-Exupéry A. O pequeno príncipe. 31. ed. Rio de Janeiro: Editora Agir; 1987.

Barbeiro CO. Participação do receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) na transformação maligna da leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

RESUMO

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são apresentações clínicas que apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer na cavidade oral. Estas condições são classificadas de acordo com o grau de displasia epitelial, o qual atualmente é o único preditor de risco de transformação maligna para carcinoma espinocelular oral (CECO), embora já se saiba que não se trata de um preditor fiel. A leucoplasia oral (LO) e a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) são DPMOs caracterizadas por placas brancas não raspáveis que microscopicamente revelam lesões epiteliais sem ou com graus variados de displasia epitelial. Mesmo compartilhando vários aspectos clínicos e microscópicos, a LVP tem um comportamento clínico mais agressivo e persistente, com proporção estimada de transformação maligna de 49.5% e sem resposta às modalidades terapêuticas atualmente aplicadas. Dentro deste contexto, devido a inexistência de características clínicas e microscópicas específicas destas DPMOs nas fases iniciais, se faz necessário investigar um potencial biomarcador que seja efetivo no prognóstico, diagnóstico diferencial e precoce entre os casos de LO e LVP e que futuramente possa ser um alvo terapêutico. O receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) é uma proteína adaptativa multifuncional que está envolvida em diferentes vias de sinalização, na proliferação celular, transcrição e síntese de proteínas, além de regular a atividade proteica e modular a migração e invasão de células tumorais. Contudo, ainda não existem trabalhos que avaliam a expressão de RACK1 em DPMOs. Assim, com base na literatura e em achados prévios obtidos pelo nosso grupo, este trabalho teve como objetivos específicos: (1) realizar uma revisão sistemática da literatura para verificar o valor prognóstico da expressão de RACK1 em carcinomas e adenocarcinomas; (2) avaliar a expressão imuno-histoquímica (IHQ) de RACK1 em biópsias de LO, LVP e Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI) como grupo controle; (3) avaliar a expressão gênica de RACK1 em LO, LVP e controle (HFI) e seu papel na malignização destas DPMOs. Na revisão sistemática foram encontrados 2201 artigos, mas apenas 61 estavam dentro dos critérios de inclusão do presente trabalho e destes, 19 artigos foram selecionados para análise de qualidade e risco de viés e 5 foram incluídos na meta-análise. Os resultados da meta-análise de subgrupo revelaram que os pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático e altos níveis de RACK1 tem uma chance 4.45 maior de apresentar subtipo histológico tumoral pouco ou moderadamente diferenciado (OR= 4.45 [3.09; 6.42]) e uma chance 1.88 maior de apresentarem linfonodos metastáticos (OR= 1.88 [1.28; 2.75]). Na análise IHQ foram utilizadas 189 amostras parafinadas obtidas de biópsias de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO (n=45), LVP (n=93), HFI (n=33) e carcinomas de pacientes com LVP (n=18), as quais foram avaliadas de acordo com a intensidade de marcação de RACK1. A análise da expressão gênica de RACK1 foi realizada pela técnica de reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando amostras congeladas obtidas de biópsias de pacientes com diagnóstico clínico de LO (n=14), LVP (n=14) e HFI (n=8). Os resultados desta análise não mostraram diferença estatística significativa. Os resultados da IHQ revelaram níveis aumentados de RACK1 em LO e LVP comparado ao grupo controle ($p=0,0253$; $p<0,0001$, respectivamente), sendo que há uma superexpressão de RACK1 em amostras LVP comparado à LO ($p=0,0344$). Além disso, verificou-se uma tendência de diminuição dos níveis de RACK1 nas

amostras de carcinomas de LVP. Estes achados suportam o comportamento biológico distinto destas duas DPMOs, e podem desempenhar um papel importante no processo de transformação maligna.

Palavras-chave: Leucoplasia oral. Imuno-histoquímica. Biomarcadores tumorais. Receptores de Quinase C Ativada. Revisão sistemática.

Barbeiro CO. The participation of the receptor for activated C kinase 1 (RACK1) in the malignant transformation of oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2023.

ABSTRACT

Oral potentially malignant disorders (OPMDs) are clinical presentations that present an increased risk for the development of cancer in the oral cavity. These conditions are classified according to the degree of epithelial dysplasia, which is currently the only predictor of risk of malignant transformation to oral squamous cell carcinoma (OSCC), although it is well known that it is not a reliable predictor. Oral leukoplakia (OL) and proliferative verrucous leukoplakia (PVL) are DPMOs characterized by non-scrapeable white plaques that microscopically reveal epithelial lesions without or with varying degrees of epithelial dysplasia. Even sharing several clinical and microscopic features, PVL has a more aggressive and persistent clinical behavior, with an estimated proportion of malignant transformation of 49.5% and no response to currently applied therapeutic modalities. In this context, due to the lack of specific clinical and microscopic characteristics of these MPODs in the early stages, it is necessary to investigate a potential biomarker that is effective in the prognosis, differential, and early diagnosis between cases of OL and PVL and that in the future may be a therapeutic target. The receptor for activated C1 kinase (RACK1) is a multifunctional adaptive protein that is involved in different signaling pathways, including cell proliferation, transcription, and protein synthesis, as well as regulating protein activity and modulating tumor cell migration and invasion. However, there are still no studies evaluating the expression of RACK1 in OPMDs. Thus, based on the literature and previous findings obtained by our group, this work had the following specific objectives: (1) to perform a systematic review of the literature to verify the prognostic value of RACK1 expression in carcinomas and adenocarcinomas; (2) to evaluate the immunohistochemical (IHC) expression of RACK1 in biopsies of OL, PVL and Inflammatory Fibrous Hyperplasia (IFH) as the control group; (3) to evaluate the gene expression of RACK1 in OL, PVL and control (IFH) and its role in the malignization potential of these OPMDs. In the systematic review, 2201 articles were found, but only 61 were within the inclusion criteria of the present study and of these, 19 articles were selected for quality and risk of bias analysis and 5 were included in the meta-analysis. The results of the subgroup meta-analysis revealed that patients with pancreatic ductal adenocarcinoma and high levels of RACK1 have a 4.45 higher chance of presenting poorly or moderately differentiated tumor subtype (OR= 4.45 [3.09; 6.42]) and a 1.88 higher chance of presenting metastatic lymph nodes (OR= 1.88 [1.28; 2.75]). In the IHC analysis, 189 paraffin-embedded samples obtained from biopsies of patients with clinical-pathological diagnosis of OL (n=45), PVL (n=93), IFH (n=33) and carcinomas from PVL patients (n=18) were used. The samples were evaluated according to the intensity of RACK1 labeling. The analysis of RACK1 gene expression was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using frozen samples obtained from biopsies of patients with clinical diagnosis of OL (n=14), PVL (n=14) and IFH (n=8). The results of this analysis showed no statistically significant difference. The IHC results revealed increased levels of RACK1 in both OL and PVL compared to the control group (p=0,0253; p<0,0001, respectively), with an overexpression of RACK1 observed in PVL samples when comparing with OL (p=0,0344). In addition, there was a trend of decreased RACK1 levels in PVL carcinoma samples. These findings support the

distinct biological behavior of these two OPMDs and may play a role in the processes of malignant transformation.

Keywords: Leukoplakia, oral. Immunohistochemistry. Biomarkers, tumor. Receptors for Activated C Kinase. Systematic review.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Desordens Potencialmente Malignas Orais.....	19
3.2 Receptor da Quinase C 1 Ativada (RACK1)	22
3.3 Receptor da Quinase C 1 Ativada (RACK1) no Câncer	26
3.4 Receptor da Quinase C 1Ativada (RACK1) no Câncer Oral	28
4 MATERIAL E MÉTODO	34
4.1 Revisão Sistemática da Literatura.....	34
4.1.1 Extração de dados e questão de estudo.....	34
4.1.2 Critérios de elegibilidade.....	34
4.1.3 Estratégia de busca	35
4.1.4 Síntese de resultados	35
4.1.5 Análise da qualidade e risco de viés.....	36
4.1.6 Meta-análise.....	36
4.1.7 Avaliação da qualidade das evidências (sistema GRADE) ...	37
4.2 Expressão Imuno-Histoquímica de RACK1 em LO e LVP	37
4.2.1 Amostras para análise imuno-histoquímica.....	38
4.2.2 Reação de imuno-histoquímica	39
4.2.3 Digitalização e análise da marcação imuno-histoquímica	41
4.3 Análise da Expressão Gênica de RACK1 em LO, LVP e HFI....	42
4.3.1 Isolamento do RNA total.....	42
4.3.2 Análise da concentração e integridade do RNA	43
4.3.3 Síntese de cDNA.....	44
4.3.4 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	44
4.3.5 Escolha dos primers	45
4.4 Análise Estatística.....	45

5 RESULTADO	47
5.1. Revisão Sistemática da Literatura e Meta-Análise.....	47
5.1.1 Síntese dos resultados	49
5.1.2 Análise de qualidade e risco de viés dos estudos incluídos	58
5.1.3 Meta-análise.....	61
5.1.4 Análise de GRADE	62
5.2 Características Clínico-Patológicas dos Pacientes com LO, LVP e HFI Incluídos na Análise de Imuno-histoquímica	71
5.3 A Intensidade de Marcação IHQ de RACK1 Está Aumentada em LO e LVP	74
5.4 Avaliação da Expressão Gênica de RACK1 em LO e LVP	88
6 DISCUSSÃO	89
7 CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXO	108

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca e de orofaringe estão entre os mais comuns em todo o mundo, sendo que em alguns países o câncer de boca é o mais comum entre os homens¹. A mortalidade e a morbidade causadas por este tipo de câncer poderia ser minimizada por meio da prevenção, detecção precoce e manejo adequado das desordens potencialmente malignas orais (DPMOs), impactando nos números de casos no mundo. O diagnóstico precoce é possível por meio de um minucioso exame clínico, uma vez que o câncer de boca frequentemente é precedido por uma fase inicial acessível à inspeção visual que são as DPMOs².

As DPMOs são definidas como “qualquer anormalidade da mucosa oral que esteja associada a um risco estatisticamente aumentado de desenvolvimento de câncer oral”³. Sendo assim, a presença de DPMOs na cavidade oral indica um alto risco de desenvolvimento de câncer, porém apenas uma minoria progride de fato para o câncer. Por outro lado, alguns pacientes podem ser diagnosticados com um carcinoma já na primeira biópsia³. Histopatologicamente, as biópsias de DPMOs podem revelar diferentes graus de displasia epitelial, os quais são associados com o risco de progressão tumoral⁴⁻⁸. Atualmente, está bem estabelecido que as DPMOs com displasia epitelial estão mais frequentemente associadas à transformação maligna para carcinoma espinocelular oral (CECO)^{4,7,9}.

A leucoplasia oral (LO) é a DPMO mais comum, sendo descrita como uma “placa predominantemente branca de risco questionável, após exclusão de outras doenças ou desordens conhecidas que não apresentam risco de desenvolvimento de câncer”³. Este termo é estritamente clínico, sendo necessário a confirmação histopatológica¹⁰. A LO apresenta taxa de incidência que varia de 1% a 4% e sua taxa de transformação maligna é de 9,8%^{4,10,12}. Os sítios mais acometidos são o vermelhão do lábio, mucosa jugal e gengiva, sendo os homens acima de 40 anos de idade os mais afetados^{4,9,12}. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento da LO são semelhantes aos associados com os carcinomas orais e incluem tabagismo, consumo excessivo de álcool, idade avançada, nód de betel e exposição a radiação ultravioleta nos casos que acometem o vermelhão do lábio^{3,4}.

Assim como a LO, a LVP também se apresenta como placa branca não raspável, porém é uma DPMO de curso clínico progressivo, persistente e irreversível, caracterizada pela presença de leucoplasias multifocais que frequentemente se

tornam verrucosas³. Por isso, a LVP é considerada uma leucoplasia oral multifocal distinta que apresenta mudanças clínicas e histopatológicas importantes ao longo do tempo, sendo seu diagnóstico retrospectivo. As lesões de LVP estão relacionadas com a maior taxa de transformação maligna para câncer oral quando comparada às demais DPMOs^{13,14}. Além disso, a etiologia da LVP parece não estar associada a fatores de risco como tabaco, álcool e noz de areca¹⁵. A proporção estimada de transformação maligna da LVP é de 49.5% (CI 26.7%–72.4%), sendo que os pacientes diagnosticados com LVP podem desenvolver tanto CEC ou carcinoma verrucoso^{14,16}.

Neste contexto, a LO e LVP são exemplos de DPMOs que compartilham alguns aspectos clínicos (placa branca não raspável) e microscópicos (variados graus de displasia epitelial), porém possuem comportamento e evolução clínica significativamente distintos. Além disso, um dos maiores desafios relacionados as DPMOs é prever quais lesões irão de fato progredir para uma neoplasia maligna, em particular o CECO, pois o atual sistema de graduação da displasia epitelial não é capaz de reproduzir o risco clínico de transformação maligna, principalmente nas lesões de LVP, uma vez que estas lesões apresentam alterações arquiteturais significativas, mas muitas vezes não revelam alterações citológicas importantes⁸. Assim, o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares relacionados a LVP poderiam auxiliar no desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficientes.

Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa por meio de uma abordagem proteômica identificou um grupo de proteínas cuja expressão foi significativamente maior nas amostras de LVP em relação as amostras de LO, as quais apresentam um menor potencial de transformação maligna, e também em relação ao grupo controle, o qual foi composto por amostras de HFI (lesão inflamatória sem potencial de transformação maligna). Dentro deste grupo de proteínas, o RACK1 (receptor da proteína quinase C 1 ativada) foi identificado como altamente expresso em todas as amostras de LVP, apresentando um fold change grupal de 1,7 em relação às amostras de LO e de 1,6 em relação ao controle¹⁷. Adicionalmente, outro estudo de análise proteômica com lesões de CECO mostraram que RACK1 estava diferencialmente expresso neste grupo de lesões e um outro estudo do mesmo grupo revelou RACK1 como preditor de prognóstico clínico ruim em CECO^{18,19}.

O RACK1 é uma proteína intracelular de 36 kDa que pertence à família das proteínas de repetição Trp-Asp40 (WD40), compartilha semelhanças com a

subunidade β da proteína G da transducina e é responsável pela interação com a família da proteína quinase C (PKC)²⁰. Ele atua como proteína estrutural para a transdução de sinais e controla vários processos celulares como crescimento, diferenciação, invasão e migração²¹⁻²⁸. Além disso, a desregulação de RACK1 tem sido associada ao desenvolvimento de vários tipos de tumores (Adams et al., 2011)²⁰. Estudos demonstraram que o RACK1 promove o avanço e a quimiorresistência no câncer de fígado²¹. Por outro lado, RACK1 impede as metástases tumorais no câncer gástrico²². Sendo assim, o RACK1 pode apresentar funções diversas e possivelmente conflitantes em diferentes tipos de células ou tecidos²³.

Diante do exposto, o estudo da proteína RACK1 nas DPMOs parece promissor e pode representar um potencial biomarcador no processo de progressão e malignização destas lesões, bem como um marcador de detecção precoce de lesões com maior potencial de transformação maligna.

2 OBJETIVO

Avaliar a expressão de RACK1 e seu papel na transformação maligna da leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática da literatura com o intuito de avaliar o papel do RACK1 em diferentes tipos de carcinomas e adenocarcinomas, assim como verificar se o valor prognóstico da expressão deste marcador está associado a fatores clínico-patológicos e demográficos dos pacientes acometidos.
- Comparar por meio de imuno-histoquímica a expressão do RACK1 em lesões de LO, LVP e carcinomas de oriundos de LVP em relação ao controle (hiperplasia fibrosa inflamatória - HFI), por meio de reações de qRT-PCR.
- Analisar a associação da expressão do RACK1 com os parâmetros clínico-patológicos em lesões de HFI, LO e LVP.
- Avaliar a expressão gênica de RACK1 em lesões de LO e LVP em relação ao controle (HFI), por meio de reações de qRT-PCR.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O levantamento bibliográfico realizado sobre os temas abordados no presente trabalho está descrito nas seções abaixo e foi pautado nos trabalhos mais relevantes.

3.1 Desordens Potencialmente Malignas Orais

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são definidas como “qualquer anormalidade da mucosa oral que está associada a um risco estatisticamente aumentado de desenvolver câncer bucal”³. A presença de uma DPMO indica um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer na cavidade oral durante a vida do paciente, mas de fato apenas uma minoria progride para o câncer³. Histopatologicamente, biópsias de DPMOs podem mostrar algum grau de displasia epitelial, o qual é associado com um risco aumentado de progressão tumoral⁴⁻⁸. Segundo com a última classificação proposta para as DPMOs, a leucoplasia oral (LO), leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), eritroplasia, fibrose submucosa oral e líquen plano oral estão entre as mais comuns. Além disso, tem sido sugerida a inclusão de lesões e reações liquenóides orais e doenças do enxerto- versus-hospedeiro³. A taxa mundial de prevalência das DPMOs é de aproximadamente 5% e os fatores de risco associados são variados, embora várias destas lesões e condições não possuam fator etiológico conhecido^{6,7}. Deve-se destacar que um dos maiores desafios relacionados às DPMOs é prever quais lesões irão de fato progredir para uma neoplasia maligna, em particular o carcinoma espinocelular oral.

Diferentes fatores de risco têm sido associados ao desenvolvimento das DPMOs, como o uso de tabaco e consumo crônico de álcool no caso das leucoplasias e nóz de areca nos casos de fibrose submucosa, porém várias dessas lesões não possuem um fator etiológico bem definido. As diferentes DPMOs podem acometer qualquer sítio da cavidade oral, porém cada lesão parece apresentar uma predileção por um sítio específico^{4,7}. A taxa mundial de prevalência das DPMOs varia de 1% a 5%, sendo que as estimativas variam de acordo com o país, a população estudada e o padrão de uso de tabaco⁶.

A leucoplasia oral (LO) possui taxa de incidência que varia de 1 a 4% e sua taxa média de transformação maligna relatada na literatura foi de 9,8%^{11,29}. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a LO é definida como “uma placa branca de

risco questionável, definida após a exclusão de outras doenças ou distúrbios conhecidos que mimetizam este aspecto clínico, mas que não carregam nenhum risco conhecido para o câncer”⁴. Portanto, o termo “leucoplasia oral” é estritamente clínico, utilizado temporariamente como hipótese diagnóstica que implica na exclusão de outras lesões de aspectos clínicos similares e o diagnóstico final requer a realização de uma biópsia e sua análise histopatológica⁹. Os indivíduos mais acometidos por essa DPMO são homens caucasianos com idade acima de 40 anos e sua prevalência aumenta conforme o avanço da idade. Os sítios mais acometidos são o vermelhão do lábio, mucosa jugal e gengiva, sendo que o acometimento do vermelhão do lábio está associado a exposição excessiva aos raios ultravioletas³⁰. Além disso, os fatores de risco associados à LO são similares aos observados nos casos de CECO e incluem o tabagismo e consumo excessivo de álcool⁶. A etiopatogenia da LO abrange duas grandes categorias, incluindo: LO de etiologia desconhecida ou idiopática e LO associada ao uso do tabaco, sendo que as LOs podem se apresentar similares entre si em suas características clínicas, porém podem diferir consideravelmente em termos microscópicos^{31,32}. De acordo com a classificação da OMS de 2017, as características microscópicas das LOs variam de hiperqueratose sem ou com variados graus de displasia (leve, moderada ou severa) até um carcinoma *in situ* e por isso, a biópsia se faz mandatória para o diagnóstico definitivo⁴. Atualmente, os achados microscópicos são utilizados para prever o risco de transformação maligna neste grupo de lesões. Entretanto, ainda não existem métodos objetivos disponíveis para tipificar lesões displásicas e permitir resultados consistentes e reprodutíveis, uma vez que nem todas as displasias orais progridem para uma neoplasia maligna³³. Além disso, a utilidade desta subdivisão dos graus de displasia tem sido bastante questionada devido à grande variabilidade inter e intra-examinadores no que diz respeito a avaliação da presença/ausência e dos graus de displasias e vale a pena destacar que a maioria das LOs permanecem benignas ao longo do tempo. Apenas um pequeno grupo de lesões progride para displasias de alto grau ou carcinoma francamente invasivo^{29,34}. Dessa forma, um dos maiores desafios entre os casos de LO é tentar prever quais lesões irão de fato progredir para uma neoplasia maligna, em particular o CECO.

Como a maioria das LOs são assintomáticas, o tratamento se faz necessário em função do risco de transformação maligna da lesão a fim de evitar o desenvolvimento do câncer oral, principalmente o CECO, o qual possui prognóstico ruim, com apenas 50% dos pacientes apresentando uma sobrevida global maior que

5 anos³⁵. Vários tratamentos foram propostos, os quais incluem excisão cirúrgica por bisturi, criocirurgia, terapia fotodinâmica, cirurgia a laser, vaporização, além de tratamento tópico ou sistêmico, cessação dos fatores de risco ou apenas acompanhamento rigoroso³⁶⁻³⁸. A escolha do tratamento não segue um critério bem definido, pois poucos estudos relataram resultados a longo prazo. Além disso, não existe nenhum estudo controlado randomizado avaliando intervenções cirúrgicas, laser e crioterapia que incluísse um braço sem tratamento ou placebo³⁶.

Em 1985, Hansen et al.³⁹ definiram pela primeira vez o termo leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), o qual designava uma variante rara de leucoplasia oral que apresentava um comportamento único e de persistente progressão para malignidade. Estes autores descreveram uma desordem agressiva de etiologia desconhecida, crescimento lento e com tendência a se tornar multifocal ao longo do tempo³⁹. Clinicamente, a LVP é caracterizada por placas brancas não raspáveis 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. Frequentemente acomete a gengiva e a mucosa jugal, podendo progredir lentamente e envolver sítios contíguos ou não^{40,41}. Esta lesão apresenta alta taxa de recorrência e seu índice de transformação maligna foi de 49.5% após acompanhamento a longo prazo^{14,40-42}. Devemos destacar que o perfil epidemiológico da LO convencional, como citado anteriormente, se aproxima do observado no CECO, o qual acomete mais os homens e está associado principalmente ao uso do tabaco^{6,9}. Em contrapartida, na LVP isso parece não ocorrer, demonstrando um possível padrão biológico distinto entre LO e LVP. Esta apresentação clínica distinta associada à um comportamento biológico agressivo permitem que a LVP seja classificada como uma entidade distinta da LO convencional, sendo descrita pela OMS como a DPMO com maior risco de progressão para Carcinoma Verrucoso e CECO⁴. Contudo, o diagnóstico definitivo da LVP deve ser realizado de forma retrospectiva com base na observação temporal das lesões, baseado em achados clínicos e histológicos que se desenvolvem ao longo dos anos, embora as características clínicas nem sempre são fornecidas para conclusão do diagnóstico histológico⁴³. Os vários estágios de evolução dentro do espectro histopatológico da LVP levam a dificuldade em estabelecer um diagnóstico final. Critérios já foram reformulados para permitir o diagnóstico precoce e melhor manejo da doença, mas a inexistência de características clínicas e microscópicas específicas

nas fases iniciais, juntamente com a terminologia diversa, faz com que o diagnóstico diferencial das lesões de LVP seja um desafio^{9,43-45}. O estudo de Upadhyaya e colaboradores⁴³ mostrou que existe uma importante variabilidade entre os patologistas quanto ao diagnóstico dos vários aspectos histológicos que as lesões de LVP podem apresentar, além da falta de terminologia padronizada, a qual causa dúvidas em relação ao manejo adequado dos pacientes com LVP.

Devemos destacar ainda que a classificação proposta pela OMS enfatiza apenas os critérios microscópicos para definir o estágio clínico das DPMOs, baseando-se no grau de displasia⁴. Porém até o momento não existem preditores clínicos e histopatológicos validados para prever quais lesões irão de fato evoluir e progredir para malignidade. Neste contexto, a utilização de técnicas de biologia molecular em estudos com LO e LVP para melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes poderiam melhorar acentuadamente a eficácia na identificação dos pacientes com maior risco de transformação maligna^{46,47}. Assim, o entendimento mais aprofundado da natureza molecular e do comportamento destas DPMOs é fundamental para que seja possível identificar potenciais ferramentas diagnósticas e prognósticas em casos de LO e LVP. Além disso, a LVP frequentemente apresenta resposta inadequada a todas as modalidades de tratamento e muitas vezes sofre recorrência⁴⁸. A revisão feita por Capella et al.⁴⁸ mostrou que a cirurgia e a ablação a laser são as escolhas de tratamento mais utilizadas, porém a LVP parece ser resistente a todos os tipos de terapias, as quais não reduzem as recidivas e sua propensão à transformação maligna. Dessa forma, um melhor entendimento dos mecanismos moleculares relacionados à LVP poderia auxiliar no desenvolvimento de medidas terapêuticas mais eficazes.

3.2 Receptor da Quinase C 1 Ativada (RACK1)

O receptor da proteína quinase C 1 ativada (RACK1) é uma proteína de 36kDa que faz parte da família de proteínas com repetições WD. Ela possui sete dessas repetições e é homóloga à subunidade β das proteínas G. O RACK1 é uma proteína adaptativa intracelular altamente conservada, localizada no citoplasma e na membrana citoplasmática, a qual foi originalmente clonada a partir de um acervo de cDNA advindo do fígado de galinha e de uma linhagem de células B linfoblásticas humanas (B-LCL)⁴⁹. Em 1994, Ron et al.⁵⁰ clonaram uma proteína advinda de um

acervo de cDNA do cérebro de rato, o qual foi investigado para avaliar produtos genéticos que se ligavam a proteína quinase C (PKC) na presença de seus ativadores e observou uma associação de RACK1 com a conformação ativa de PKC β II e então designou-se como RACK1.

Por ser uma proteína estrutural, RACK1 atua em diferentes vias de sinalização, bem como em múltiplas interações proteína-proteína e tem um papel crítico para atividades celulares que são consideradas fundamentais, incluindo a proliferação celular, transcrição e síntese de proteínas, bem como várias outras funções neuronais²⁴. Duas funções importantes do RACK1 são a capacidade de transportar alguns de seus ligantes para locais intracelulares, bem como de modular a atividade enzimática de seus ligantes, o que pode resultar em promoção ou supressão de atividades enzimáticas. Desta maneira, o RACK1 desempenha um papel importante e fundamental no que diz respeito a estabilização da formação ativa ou inativa de seus ligantes²⁰. Sabe-se que o RACK1 participa de vias de sinalização com as proteínas PKC, Src e integrinas beta, entre outras⁵¹⁻⁵⁶. Por isso, RACK1 é considerado como uma proteína de ancoragem em várias vias de sinalização intracelular e como uma proteína que permanece conservada durante a evolução^{19,57}. Uma ilustração das principais interações de RACK1 e seus parceiros encontra-se na figura 1.

O gene responsável por codificar a proteína RACK1 é o GNB2L1, o qual é uma proteína de ligação de nucleotídeos de guanina e este gene é mapeado no cromossomo 5q35.5, próximo ao telômero do cromossomo 5⁵⁸. O RACK1 se apresenta altamente expresso na maioria dos tecidos como cérebro, ovário, fígado, placenta e próstata; porém nos rins, intestino, cólon e baço foi encontrado baixa expressão de RACK1^{57,59,60-62}. Esta expressão é normalmente regulada de maneira rigorosa e por isso, mudanças em sua expressão estão associadas ao desenvolvimento de cânceres, assim como de patologias cerebrais^{20,57,59,60,61}. Alguns trabalhos relatam que RACK1 pode atuar como inibidor do crescimento de fibroblastos normais por meio da supressão da proliferação celular e que ele só pode ser superexpresso em células transformadas ou células que superexpressam IGF-1R^{63,64,55}. Além disso, o gene GNB2L1 apresenta um sítio de ligação para o receptor do glicocorticóide, sugerindo uma associação entre a expressão do RACK1 e o envelhecimento. Este fato parece ser importante, pois o RACK1 afeta a distribuição subcelular e a função de diversas proteínas e por isso, seu papel é essencial na regulação de várias vias de sinalização em vários dos processos biológicos chave^{24,65}.

Além disso, existem muitos genes funcionais localizados no genoma junto ao GNB2L1 e por isso a proteína RACK1 pode interagir com diversas outras proteínas⁵⁷.

RACK1 se liga à PKC β II e estabiliza PKC, além de permitir a fosforilação do substrato de PKC no local apropriado^{24,66,67}. De maneira inversa, PKC também atua na regulação da expressão de RACK1 nos miócitos cardíacos e atua monitorando a presença de RACK1 no citoplasma, impedindo que RACK1 vá para o núcleo de maneira não específica^{20,68}. Além disso, RACK1 estabiliza a atividade de PKC e apresenta o PKC ativado para novas proteínas e para outras vias de sinalização, além de permitir, por exemplo, uma conversa cruzada entre PKC e MAPK⁶⁹.

A via de sinalização de cAMP/PKA também está associada ao RACK1⁷⁰⁻⁷². As fosfodiesterases de cAMP (PDEs) hidrolisam cAMP e o RACK1 interage com uma isoforma de fosfodiesterases, a PDE4D5⁷²⁻⁷⁵. Além disso, RACK1 também atua como fator importante para ligação da quinase de adesão focal (em inglês “FAK” – focal adhesion kinase) com o PDE4D5 para controlar a polaridade celular^{76,77}. Outra via em que RACK1 desempenha um papel importante é a via da família Src de proteínas não receptoras tirosina quinases (PTKs) que regulam a adesão, espalhamento e migração celular^{78,79}. RACK1 pode se ligar a Scr para inibir sua atividade, bem como para transportá-la para sítios específicos e dessa forma, ativá-la^{20,78-81}. A supressão da atividade de Src por meio do RACK1 é importante para a regulação do crescimento das células do cólon⁸⁰. Outro estudo sugere que, ao inibir a atividade de Src, o RACK1 estabiliza E-caderina e cateninas nos contatos célula-célula e a atividade de Scr mediada por RACK1 também é importante para regular os postos de checagem do ciclo celular^{78,80,82}. Além disso, outro estudo de Mamidipudi e Cartwright⁸³ relevou uma ação pró-apoptótica advinda da interação entre RACK1 e Scr.

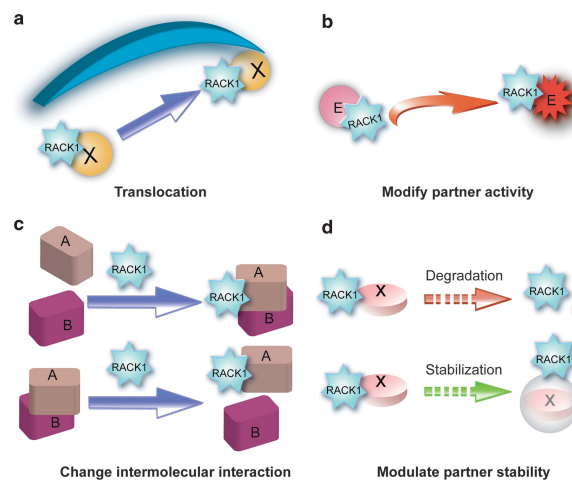
Nas funções fisiológicas, de acordo com o estudo de Robles MS et al.⁸⁴ o RACK1 parece ser um componente integral do ciclo circadiano de mamíferos. Além disso, uma variedade de proteínas de sinalização mediadas por RACK1 são importantes para processos dinâmicos como desenvolvimento embrionário, cicatrização de feridas, adesão e espalhamento celular, além de respostas imunológicas necessárias para uma migração celular adequada^{55,64,84,85}. Quando há falha neste processo ou quando as células migram para locais onde não deveriam, ocorrem danos como defeitos no desenvolvimento cerebral, mau funcionamento do sistema imunológico, assim como o desenvolvimento de cânceres. O processo de migração celular é um processo coordenado que inclui diversas vias de sinalização,

as quais devem ser bem orquestradas e deve haver uma sincronia entre os receptores de superfície e os elementos do citoesqueleto celular²⁰. O RACK1 é uma proteína essencial para este processo, pois ele se liga a diversos componentes como as quinases, fosfatases e domínios citoplasmáticos dos receptores de superfície celular^{24,86}. Adicionalmente, RACK1 pode aumentar a fosforilação da quinase de adesão focal (em inglês “FAK” – focal adhesion kinase), além de interagir com integrinas e se ligar a componentes do citoesqueleto celular, fatos estes que levaram a designação do RACK1 como um regulador chave no conjunto de adesão focal^{81,87,88}. Este, diz respeito a ligação mecânica entre a célula e a matriz extracelular (MEC) após o recrutamento e adesão das integrinas na superfície da célula, a qual promove a fosforilação da FAK, que atua regulando a adesão e migração celular em resposta aos fatores de crescimento, estimulação das integrinas e de componentes da MEC^{20,89-91}. Para que FAK execute suas funções, é necessária a presença do RACK, o qual, quando suprimido, afeta diretamente as atividades de FAK, a adesão e a difusão celular^{85,87}. Em células aderentes, o RACK1 atua na migração celular por sua capacidade de se ligar a várias quinases e fosfatases que afetam a fosforilação e a atividade de outros ligantes ou de complexos de proteínas. Além disso, o RACK1 interage com várias isoformas de PKC durante a migração celular, incluindo PKC β e PKC ϵ ^{51,92}.

Alterações na estabilidade dos níveis de expressão de RACK1 estão associadas à várias condições patológicas como distúrbios no desenvolvimento cerebral, insuficiência cardíaca, hipertensão arterial pulmonar, insuficiência renal, atrofia muscular, desenvolvimento disfuncional do esperma, bem como desenvolvimento de câncer e dependência química, entre outros^{20,68,93-97}.

Alguns trabalhos também têm abordado o papel do RACK1 no sistema imunológico. Mourtada-Maarabouni et al.⁹⁸, com o intuito de identificarem novos genes reguladores da apoptose, mostraram que a superexpressão de RACK1 em linhagens de célula T resultou em uma resistência à apoptose induzida por dexametasona e radiação ultravioleta. De maneira oposta, quando a expressão de RACK1 foi suprimida, as células não se apresentaram resistentes à apoptose, sugerindo um papel importante de RACK1 nas vias de sinalização intracelular que levam as células T a sofrerem apoptose.

Figura 1 - Ilustração das principais interações de RACK1 e seus parceiros



O RACK1 exerce efeitos diferentes em seus parceiros de ligação, podendo ser transporte de um local para outro, modificação da atividade, aumento da associação ou dissociação e modulação da estabilidade das proteínas de ligação.

Fonte: Li JJ e Xie DI⁹⁹.

3.3 Receptor da Quinase C 1 Ativada (RACK1) no Câncer

Vários estudos relatam o importante papel do RACK1 na progressão de cânceres e que a sua expressão é alterada durante a angiogênese e em muitos carcinomas humanos²⁰. No câncer de mama, o RACK1 tem sido estudado como um indicador de prognóstico. Os estudos de Mamidipudi e Cartwright⁸³ e de Al-Reefy et al.¹⁰⁰ sugeriram uma função pró-apoptótica de RACK1 nas neoplasias malignas humanas. No primeiro trabalho realizado com células cancerígenas do cólon, a superexpressão de RACK1 levou á apoptose de células malignas e no segundo, realizado em câncer de mama, houve uma associação da superexpressão de RACK1 com bom prognóstico clínico após 10 anos de acompanhamento^{83,100}. Em contrapartida, o estudo de Cao et al¹⁰¹ demonstrou em seus resultados que a alta expressão de RACK1 atuou como fator preditivo de prognóstico clínico ruim para o câncer de mama.

Nos adenocarcinomas (AD) de pulmão, a superexpressão de RACK1 tem sido associada com o estágio patológico, tamanho do tumor e acometimento linfonodal, o que não ocorreu em carcinomas de células grandes. Estes achados sugerem que o RACK1 poderia ser utilizado como um marcador para diagnóstico diferencial entre o AD e os outros subtipos histológicos de câncer de pulmão¹⁰².

No carcinoma hepatocelular o RACK1 interage com a proteína ADAM12 (proteína 1 de domínio desintegrina e metaloproteinase) por meio da ativação de PKC e se apresenta superexpresso em pacientes com este tipo de carcinoma¹⁰³. A superexpressão de RACK1 estava presente em casos de melanoma metastático por meio da amplificação da atividade de PKC, assim como em melanomas por meio do aumento de sua transcrição por meio da sinalização MEK-ERK^{104,105}. Adicionalmente, cânceres de próstata, ovário e aqueles causados pelo papilomavírus humano (HPV16) e *Helicobacter pylori*, também revelaram que RACK1 pode ativar diversas vias de sinalização importantes para a tumorigênese¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Tem-se associado a superexpressão de RACK1 com o processo angiogênese que ocorre mediado pela via P13K/AKT/Rac1. Além disso, PKC β desempenha um papel neste processo e no crescimento tumoral, e sua diminuição em tecidos ativos ou inativos angiogenicamente tem sido relacionada à disponibilidade de RACK1¹⁰⁹.

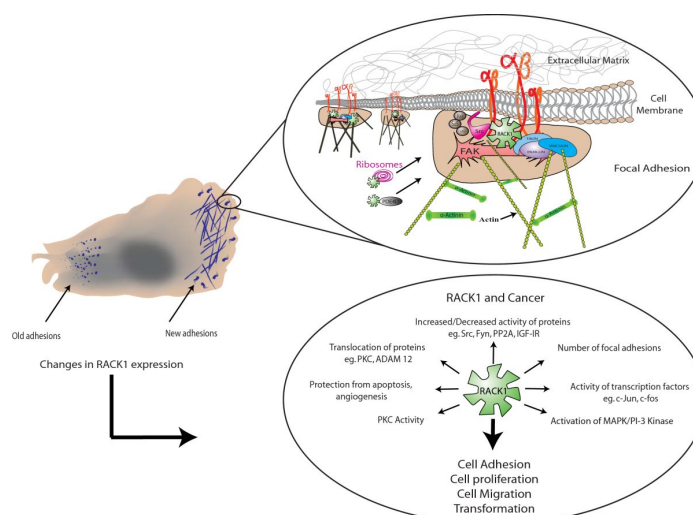
O RACK1 também interage com HIF-1, o qual é um fator induzido por hipóxia e sua expressão está associada à invasão tumoral, metástase, resistência a drogas e prognóstico. A interação entre HIF-1 e SEPT9-v1 (Septina 9 – proteína citoesquelética de ligação GTP) estabiliza HIF-1 e estimula sua atividade transcricional e esta ligação entre eles impede que RACK1 se ligue ao HIF-1, pois com a ligação de RACK1 ocorre a ubiquitinação e a degradação de HIF-1¹¹⁰. Interessantemente, no estudo de Amir et al.¹¹⁰ com células humanas de câncer de próstata, foi observado que a ligação entre SEPT9_v1 e HIF-1 promoveu crescimento tumoral e angiogênese e quando a expressão de SEPT9_v1 foi suprimida, ocorreu uma diminuição da expressão de HIF-1, assim como diminuição da migração celular, do crescimento tumoral e da angiogênese.

No câncer, a ativação da FAK se dá por meio de fatores de crescimento e de sinais de adesão nas células tumorais. O RACK1 participa da via do IGF-I (fator de crescimento) e da sinalização de integrina⁸⁵. No estudo de Kiely et al.⁸⁵ foi demonstrado a relação de RACK1 e FAK para que ocorra tanto a fosforilação quanto a desfosforilação de FAK, processos estes que ocorrem em resposta ao IGF-I. A supressão do RACK1 por meio de interferências no RNA interfere na fosforilação FAK, reduzindo a adesão celular, o espalhamento e o crescimento clonogênico⁸⁵. Dessa forma, o complexo de interação RACK1 e FAK é importante para o controle da adesão de integrinas, bem como para a polarização celular por meio do recrutamento de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina), a qual é hidrolisada por PDE4D5 (família

de enzimas fosfodiesterase-4). Juntos, RACK1/FAK/PDE4D5 formam o complexo de senso de direção^{76,77}. Neste contexto, RACK1 está envolvido também na regulação da adesão, protrusão e migração celular quimiotática por meio da sua ligação com Src e recrutamento de paxilina, β -tubulina e outros componentes presentes no citoesqueleto^{81,87,92,111} (Figura 2).

De modo geral, a proteína RACK1 está presente em diversas vias de sinalização, interagindo e recrutando diversos componentes como quinases, fosfatases, complexos proteicos, os quais requerem regulação rigorosa. Por isso, qualquer modificação que ocorra entre essas vias ou pontualmente no RACK1, por meio de desregulação nos níveis de expressão, poderá contribuir para o desenvolvimento e progressão tumoral²⁰.

Figura 2 - Ilustração do envolvimento de RACK1 como regulador de adesão focal



O RACK1 é um participante importante na formação de aderências focais, estruturas especializadas que ocorrem quando as células entram em contato com a matriz extracelular. Ele ajuda a recrutar proteínas estruturais essenciais, quinases e fosfatases dentro dessas aderências, apoiando seu desenvolvimento. O RACK1 também está envolvido no transporte de fosfodiesterases e ribossomos para as aderências, auxiliando nos processos locais de sinalização e tradução. As alterações na expressão de RACK1, sejam elas aumentadas ou diminuídas, afetam significativamente a atividade e a estabilidade das proteínas associadas, contribuindo potencialmente para o desenvolvimento e a progressão do câncer.

Fonte: Adams et al.²⁰

3.4 Receptor da Quinase C 1 Ativada (RACK1) no Câncer Oral

O carcinoma espinocelular (CEC), também denominado de carcinoma de células escamosas, representa mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral, sendo a neoplasia maligna mais comum da região de cabeça e pescoço^{35,113}. Apesar dos recentes avanços no diagnóstico e tratamento

destes tumores, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com CECO ainda permanece entre 50 e 60%^{35,114}. Atualmente, as ferramentas diagnósticas disponíveis são os parâmetros histopatológicos e o estadiamento TNM, sendo eles os únicos preditores de risco de morte^{114,114}. Assim, se faz necessário a busca por novas ferramentas diagnósticas para identificar preditores prognóstico eficazes para os casos de CECO¹¹⁵.

O maior anseio atual é a identificação de possíveis biomarcadores efetivos para serem utilizados como marcadores prognóstico em pacientes com CECO. Com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores para CECO, Wang et al.¹⁸ realizaram uma análise proteômica a fim de identificar proteínas diferencialmente expressas no CECO em relação ao tecido normal e à LO. Os autores identificaram 52 proteínas significativamente expressas, sendo que 8 delas foram identificadas pela primeira vez. Dentre estas, estava a proteína RACK1, a qual foi escolhida para análises mais detalhadas por ser uma proteína de ancoragem para muitas quinases, além de receptor de inúmeras vias que participam de funções biológicas críticas²⁴. Então, o estudo de Wang et al.¹⁸ verificou que a expressão de RACK1 estava aumentada tanto a nível de mRNA quanto nos níveis proteicos de células de CECO em comparação com uma linhagem humana de queratinócitos orais normais (HOK). Para validar os níveis de expressão de RACK1, amostras de tecido de LO, de CECO e de seus tecidos normais correspondentes foram avaliadas por imuno-histoquímica. O padrão de marcação de RACK1 nos grupos de epitélio normal, LO sem displasia, LO com displasia e CECO teve uma tendência crescente de marcação conforme a gravidade da displasia epitelial e os testes estatísticos apontaram maior expressão de RACK1 nos tecidos de CECO em relação aos tecidos normais e pré-malignos. Os dados clínico-patológicos que apresentaram correlação com alta expressão de RACK1 foram o estágio clínico avançado e presença de metástase ou recidiva e por isso os autores sugeriram que o RACK1 poderia ser um bom preditor para desfecho clínico e prognóstico de pacientes com CECO. Além disso, os autores também avaliaram o efeito do silenciamento de RACK1 na proliferação celular e na apoptose de células de CECO. Os resultados mostraram diminuição significativa da sobrevida celular, assim como uma taxa de 20% a mais de apoptose nas células de CECO em comparação com as linhagens de queratinócitos normais, sugerindo um papel importante de RACK1 em mediar a proliferação celular e a apoptose na carcinogênese oral, de acordo com seus níveis de expressão¹⁸. Em conjunto, os dados sugerem que o

silenciamento de RACK1 induz altas taxas de apoptose nas células tumorais e aparentemente não causa nenhum efeito de toxicidade para os queratinócitos orais normais¹⁸. Isso poderia ser visto como um dado promissor no que diz respeito às possíveis medidas terapêuticas utilizando o silenciamento de RACK1 para interferir no processo de carcinogênese, sem causar malefícios às células normais.

Em 2009, Wang et al.¹⁹ avaliaram a importância da expressão de RACK1 em prever o prognóstico clínico de pacientes com CECO, comparado com a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67, o qual tem um papel já bem estabelecido na literatura como preditor de sobrevida em pacientes com neoplasias malignas, como o CECO, e por meio da expressão deste marcador era possível distinguir os pacientes e seus diferentes tempos de sobrevida^{19,115}. Os autores observaram uma imunomarcagem fraca de RACK1 em amostras que não recidivaram enquanto a maioria das amostras com superexpressão de RACK1 apresentaram recidiva. Além disso, os resultados mostraram que a expressão de RACK1 e Ki-67 podem influenciar significativamente a probabilidade de recorrência, assim como o hábito de fumar e estadiamento T2. Foi observado também uma correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e RACK1, sugerindo que ambos possuem função similar na carcinogênese nos casos de CECO. Dessa forma, as proteínas RACK1 e Ki-67 poderiam ser utilizadas como biomarcadores, juntos ou separados, para prever o desfecho clínico de pacientes com CECO¹⁹.

O mesmo grupo de pesquisadores em 2012 reavaliou o efeito anti-tumoral da inibição de crescimento celular causado pelo silenciamento de RACK1 nas linhagens celulares tumorais HSC-3 e Cal-27 por meio de vários ensaios *in vitro*¹¹⁷. Os autores também investigaram se o silenciamento de RACK1 poderia estar associado à inibição da adesão celular, migração e invasão nessas duas linhagens celulares e para entender este mecanismo, avaliaram a expressão das proteínas de EGFR, pEGFR, HER2, MMP-1 e MMP-9. Os resultados demonstraram que o silenciamento de RACK1 foi capaz de inibir a proliferação das células de CECO, sendo que após 96h de silenciamento, a taxa de morte celular neste grupo atingiu 45% em comparação a uma viabilidade celular de 95% no grupo controle. O silenciamento de RACK1 também foi capaz de inibir a capacidade de migração das células de CECO em 55%, resultado este avaliado por meio dos ensaios de cicatrização de ferida. Além disso, as células de CECO não silenciadas para RACK1 (não transfectadas) foram capazes de migrar para o compartimento inferior no ensaio de transwell, o que não ocorreu com as

células de CECO transfectadas, as quais tiveram sua capacidade de invasão diminuída em 78%. A capacidade de adesão celular das células de CECO também foi reduzida após o silenciamento de RACK1, perdendo 32% a 43% da capacidade de adesão ao matrigel comparado com as células controle, sugerindo um papel importante do RACK1 no processo de adesão das células tumorais de CECO. O nível de expressão de proteínas envolvidas no processo de invasão e metástase (EGFR, HER2, MMP2 e MMP9) após 48h de silenciamento de RACK1, demonstraram diminuição em seus níveis, sendo que MMP2 e MMP9 estavam significativamente diminuídos em ambas as linhagens celulares. Assim, os resultados deste estudo demonstraram que o silenciamento de RACK1 atuou diretamente nas linhagens celulares tumorais, causando diminuição da migração, invasão e adesão destas células, enfatizando o papel de RACK1 no desenvolvimento e/ou progressão tumoral do CECO¹¹⁷.

Em 2016, Zhang et al.¹¹⁸ tiveram como objetivo elucidar os mecanismos pelos quais o RACK1 estaria regulando o crescimento e a progressão de CECO por meio de estudo *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, utilizando estes dois modelos de estudo, os pesquisadores investigaram os efeitos do silenciamento de RACK1 sob as células de CECO HSC-3, no ciclo celular e na inibição da progressão tumoral. Os resultados mostraram que a inibição do RACK1 nas células HSC-3 resultou em parada do ciclo celular na fase G1/G2, o que foi atribuído à diminuição da expressão de ciclina B1 e ciclina D1, as quais são proteínas responsáveis por regular o ciclo celular. Dessa forma, os autores sugeriram que o silenciamento de RACK1 contribui para a diminuição ou parada do ciclo celular, inibindo então a evolução do processo de carcinogênese oral. O estudo em modelo animal com ratos revelou que os tumores formados nos ratos que receberam RACK1 silenciado foram menores em tamanho e peso do que os tumores daqueles que receberam células controle. Os autores também avaliaram o nível de proliferação tumoral por meio do Ki-67 e a angiogênese tumoral por meio do marcador VEGF e CD34. Os resultados mostraram redução da marcação de proliferação no grupo com silenciamento de RACK1, assim como diminuição significativa no número médio de vasos por região, além da diminuição da expressão de VEGF em relação ao grupo controle. A expressão de E-caderina e RhoA também foi avaliada e os resultados mostraram uma diminuição de RhoA e um aumento de E-caderina no grupo com silenciamento de RACK1. Juntos, estes achados sugerem que *in vivo*, o RACK1 pode contribuir para o processo de progressão do CECO. A

expressão de RACK1 e AKT fosforilado (p-AKT) avaliada por imuno-histoquímica, foram semelhantes nos diferentes estágios de carcinogênese dos tecidos orais e a expressão de RACK1 teve correlação positiva com p-AKT em amostras clínicas de CECO. Para confirmar estes resultados, extratos celulares advindos de linhagens celulares de CEC e queratinócitos orais normais (HOK) foram avaliados por western blot e observou-se uma correlação positiva entre os níveis de expressão de RACK1 e AKT. A via de sinalização de AKT/mTOR participa de eventos como ciclo celular e angiogênese e se apresenta aberrantemente ativada na maioria dos carcinomas, especialmente aqueles de prognóstico ruim como o CECO¹¹⁹. Os autores observaram que o silenciamento do RACK1 causou diminuição na fosforilação de AKT e mTOR, assim como também ocorreu com os níveis da proteína S6, a qual atua diminuindo mTOR. Houve também uma relação dose-dependente em relação a via AKT/mTOR no que diz respeito a fosforilação das proteínas e o RACK1 silenciando. Os modelos *in vivo* com tumores xenográficos de CECO também mostraram que o silenciamento de RACK1 foi capaz de diminuir significativamente os níveis de pAKT, mTOR, proteína S6 e LYVE-1, promovendo redução da linfangiogênese. Assim, os resultados deste estudo sugerem que o RACK1 promove crescimento celular no CECO, regulando a proliferação celular e a progressão tumoral, por meio da via AKT/mTOR/S6¹¹⁹. Assim, o RACK1 pode estar associado a um prognóstico ruim do tumor e poderia ser utilizado como um alvo terapêutico¹¹⁸.

Recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores teve como objetivo verificar o possível papel de RACK1 como um marcador prognóstico preditivo órgão-específico em pacientes com CECO e secundariamente, em outros tipos de cânceres¹¹⁵. Este estudo surgiu com o objetivo de elucidar dados discordantes em relação aos níveis de expressão de RACK1 e seus efeitos em diferentes tipos de cânceres. Por exemplo, em um estudo com células de câncer de colo de útero humano, os autores encontraram que RACK1 poderia induzir a apoptose por meio do bloqueio da ativação da via AKT⁸³. Outro estudo sugeriu que o RACK1 poderia promover apoptose por meio da oligomerização de BAX, uma proteína pró-apoptótica e de dissociação do complexo BAX/Bcl-XL¹²⁰. Assim, Liu S et al.¹¹⁵ analisaram a relação da expressão de RACK1 com o desenvolvimento e progressão do CECO utilizando três coortes independentes de três centros (342 pacientes com CECO), além de uma coorte independente advinda de dados da base TCGA (do inglês, "The Cancer Genome Atlas) para validação externa (460 pacientes com câncer de cabeça e pescoço). A

duração média de acompanhamento dos pacientes nas três coortes foi 74, 52 e 78 meses e a alta expressão de RACK1 foi observada em 68,2% na primeira coorte; 61,4% na segunda coorte e 54,6% na terceira coorte. A alta expressão de RACK1 foi associada com a redução significativa do tempo de sobrevida de 5 anos nas três coortes estudadas. Isso foi observado na coorte de validação externa onde a alta expressão de RACK1 foi associada à baixa sobrevida dos pacientes. Também foi avaliado o nível de expressão de RACK1 em outros tipos de carcinomas humanos, assim como seus respectivos tecidos para-cancerígenos com amostras das coortes deste estudo e com amostras da base de dados TCGA, avaliados por meio de mRNA de RACK1. Por meio de análise imuno-histoquímica foram analisados câncer esofágico primário, câncer gástrico, câncer retal, câncer hepático, câncer pancreático, câncer pulmonar, câncer de mama, câncer renal e câncer do colo do útero junto com seu respectivo tecido para-cancerígeno, todos em duplicatas. Observou-se a superexpressão de RACK1 nos cânceres de esôfago, pulmão, fígado e mama, o que foi compatível com as amostras da base TCGA que também revelaram alta expressão de mRNA de RACK1 no câncer de pulmão e fígado. Entretanto, avaliando o mRNA de RACK1 no carcinoma invasivo de mama, carcinoma de cabeça e pescoço e adenocarcinoma de estômago, os níveis de RACK1 estavam significativamente menos expressos. Os autores sugeriram que estes dados corroboram para o fato que a expressão de RACK1 seja órgão-específica. Além disso, os resultados deste estudo são similares aos resultados prévios obtidos por este grupo de autores, onde eles identificaram o RACK1 como um marcador de prognóstico ruim para os casos de CECO e o silenciamento de RACK1 inibiu a progressão do CECO *in vivo* e de maneira oposta sua expressão promoveu progressão tumoral via AKT/mTOR, promovendo migração e invasão das células do CECO, indicando um papel pró-oncogênico de RACK1 nestas lesões¹¹⁵.

Com base nos estudos anteriormente citados, juntamente com os resultados do nosso estudo de análise proteômica¹⁷, o estudo e o entendimento da função do RACK1 nas DPMOs, em particular na LVP e no seu processo de transformação maligna, parece promissor; tendo em vista a possibilidade de atuar como um marcador prognóstico e como alvo terapêutico.

4 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado na sessão de 11 de fevereiro 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 39015420.2.0000.5416; Anexo A).

4.1 Revisão Sistemática da Literatura

Objetivo: este estudo teve como objetivo realizar uma revisão sistemática da literatura com o intuito de avaliar o papel do RACK1 em diferentes tipos de carcinomas/adenocarcinomas, assim como verificar se o valor prognóstico da expressão deste marcador está associado a fatores clínico-patológicos e demográficos de pacientes acometidos com carcinomas.

4.1.1 Extração de dados e questão do estudo

A estratégia PICO guiou o planejamento da revisão sistemática assim como os critérios de inclusão de artigos, sendo que P = pacientes diagnosticados com carcinomas/adenocarcinomas humanos; I = expressão de RACK1 em amostras de pacientes com ou sem carcinomas/adenocarcinomas humano; C = grupo controle; pacientes sem carcinomas/adenocarcinomas humano e diferente expressão de RACK1 em parâmetros clínico-patológicos e prognósticos de pacientes diagnosticados com carcinomas/adenocarcinomas; O: Desfecho principal: os níveis de expressão de RACK1 em pacientes com carcinomas/adenocarcinomas. Desfecho secundário: identificar se os níveis de expressão de RACK1 está associado a fatores clínicos-patológicos e demográficos de pacientes acometidos com carcinomas/adenocarcinomas.

4.1.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão do presente estudo foram compostos por estudos observacionais retrospectivos transversais em humanos, sendo os pacientes

diagnosticados com carcinomas/adenocarcinomas e estudos que avaliaram a expressão de RACK1 em carcinomas/adenocarcinomas humano. Os estudos não foram restringidos em relação a localização dos carcinomas/adenocarcinomas e a linguagem de publicação utilizada. Os critérios de exclusão foram estudos *in vitro*, estudo em animais, estudos que avaliaram a expressão de RACK1 em outra origem do câncer (que não fossem carcinomas e adenocarcinomas), pacientes que foram diagnosticados com carcinoma e que apresentavam imunodeficiência, relatos de caso e capítulos de livros e outras modalidades de desenho de estudo em humanos.

4.1.3 Estratégia de busca

As seguintes palavras-chaves foram utilizadas (((RACK1) OR (Receptors for Activated C Kinase)) OR (GNB2L1)) AND (Squamous cell carcinoma) e (((RACK1) OR (Receptors for Activated C Kinase)) OR (GNB2L1)) AND (Adenocarcinoma) para busca nas seguintes bases de dados: PUBMED, SCOPUS, COCHRANE LIBRARY e WEB OF SCIENCE. Dois pesquisadores realizaram a primeira seleção dos artigos de forma independente por meio da leitura de título e resumo e os artigos selecionados para leitura completa foram adicionados em uma tabela. Os pesquisadores não estavam cegos para os autores ou para os resultados da pesquisa, e quaisquer discordâncias foram resolvidas por meio de discussão com um terceiro autor que não estava envolvido na triagem original. O software Rayyan for Systematic Reviews Software® foi utilizado para remover os artigos em duplicatas.

4.1.4 Síntese de resultados

Os dados foram extraídos de forma independente e em duplicata, de forma semelhante ao que foi feito na inclusão dos artigos selecionado. Os seguintes dados dos artigos incluídos na presente revisão sistemática foram registrados: tamanho da amostra, origem do carcinoma, metodologias empregadas para avaliar os níveis de RACK1 na população de estudo, e resultados do desfecho primário e secundário. Os dados foram agrupados em um quadro (Quadro 3).

4.1.5 Análise de qualidade e risco de viés

Os artigos incluídos no presente estudo de revisão sistemática foram analisados em relação à qualidade de forma independente e em duplicata, sendo que as discordâncias foram resolvidas da mesma forma utilizada para seleção e extração de dados. Para isso, a qualidade dos estudos foi analisada utilizando a escala de avaliação de qualidade Newcastle-Ottawa modificada para estudos transversais¹²¹. Após a avaliação de qualidade, os artigos incluídos foram classificados de acordo com o risco de viés¹²². Assim, os estudos foram avaliados com base em 8 domínios, que são divididos em 3 critérios amplos: seleção de pacientes, comparabilidade dos grupos de estudo e avaliação de resultados. Foi usado um sistema de estrelas, no qual a avaliação da seleção poderia ter no máximo de três estrelas; a comparação, no máximo duas estrelas; e os resultados, no máximo duas estrelas. Sendo assim, os estudos poderiam receber a pontuação máxima de 7 estrelas. Os estudos que obtiveram 6, 5 ou 4 estrelas foram considerados de qualidade moderada.

4.1.6 Meta-análise

A meta-análise foi realizada no software R (versão 3.6.3), adotando $\alpha=0.05$ e foi ilustrada em gráficos de floresta (forest plot). Nós avaliamos a presença de linfonodos metastáticos entre os grupos RACK1 high (alta expressão de RACK1) e RACK1 low (baixa expressão de RACK1), a diferenciação histológica do tumor para casos de RACK1 high (pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado) e a diferenciação histológica do tumor para casos de RACK1 low (pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado). O odds ratio (razão de chances) foi a medida de efeito selecionada e o modelo de efeito aleatório foi aplicado com um intervalo de confiança (IC) de 95%. A heterogeneidade dos estudos incluídos na meta-análise foi avaliada pelo do coeficiente de heterogeneidade ou também chamado de coeficiente de Higgins (I^2). As meta-análises que revelaram $I^2 > 50\%$ foram consideradas com alto nível de heterogeneidade. Para verificar o viés de publicação e, consequentemente o viés da meta-análise, foi utilizada a análise de sensibilidade do método trim-and-fill e os resultados foram ilustrados em gráficos de floresta. A meta-análise realizada no software R 3.6.3 foi feita com o auxílio da

plataforma Rstudio e o pacote META para condução das meta-análises e todas as etapas da revisão sistemática seguiram as diretrizes do PRISMA.

4.1.7 Avaliação da qualidade das evidências (Sistema GRADE)

O sistema GRADE (Grading of Recommendations, Assessment, Development, and Evaluation) é um sistema de graduação da qualidade da evidência e força de recomendação para tomada de decisão. É uma metodologia que avalia o nível de confiança dos resultados obtidos na meta-análise. Assim, a qualidade das evidências de cada estudo incluído na meta-análise deste trabalho foi classificada conforme o sistema GRADE, a fim de determinar a força geral das evidências da meta-análise¹²³. Este sistema foi utilizado para contextualizar ou justificar os eventos com quatro níveis de qualidade de evidência, que variaram de alta confiança a confiança muito baixa. A abordagem GRADE começa com o desenho de estudo, que no nosso trabalho foram estudos observacionais e, em seguida, aborda cinco motivos (risco de viés, imprecisão, inconsistência, evidência indireta e viés de publicação)¹²³. Cada um desses tópicos foi classificado de acordo com “eventos positivos” para permitir a categorização da qualidade da evidência para cada resultado em alta, moderada, baixa e muito baixa. A “alta qualidade” sugere que há uma grande chance de um evento verdadeiro que será próximo à estimativa do efeito. Por outro lado, “qualidade muito baixa” sugere que as chances são baixas na estimativa do evento e a estimativa relatada pode ser substancialmente diferente do que foi medido. As avaliações foram realizadas por dois pesquisadores de forma independente (T.M.F. e A.B) e posteriormente comparadas.

4.2 Expressão Imuno-Histoquímica de RACK1 em LO e LVP

Objetivo: este estudo teve como objetivo avaliar por meio de imuno-histoquímica a expressão do RACK1 em lesões de LO e LVP, bem como comparar os níveis de expressão entre ambas as lesões e analisar a associação da expressão do RACK1 com os parâmetros clínico-patológicos das lesões de LO e LVP.

4.2.1 Amostras para análise imuno-histoquímica

Este estudo avaliou 189 amostras parafinadas de HFI (grupo controle), LO, LVP e de carcinomas de pacientes com diagnóstico prévio de LVP, as quais foram oriundas do arquivo de amostras do Serviço de Medicina Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade de Santiago de Compostela (Espanha) e da Universidade de Helsinki (Finlândia). As amostras obtidas da Espanha e da Finlândia foram doações de pesquisadores responsáveis para aprimorar os resultados, complementar a validação imuno-histoquímica e consolidar pesquisas multicêntricas. Foram incluídas neste estudo as amostras que revelaram microscopicamente hiperqueratose sem ou com variados graus de displasia epitelial (leve, moderada ou severa), obtidas de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO ou LVP. Todos os pacientes incluídos neste estudo tinham um 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 pescoço⁴. As amostras foram divididas em dois grupos. O grupo 1 foi composto por 45 blocos de tecido parafinado oriundos de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO, cujos aspectos clínicos considerados foram a presença de uma única placa predominantemente branca, medindo menos de 3 cm, que não pudesse ser removida e uma vez que outras lesões brancas ou branco/vermelhas clinicamente reconhecíveis fossem excluídas. O grupo 2 foi composto por 93 fragmentos de biópsias obtidos em diferentes momentos do acompanhamento clínico de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LVP. O diagnóstico de LVP foi estabelecido para os casos que apresentavam clinicamente múltiplas placas brancas, variando de planas a verrucosas, as quais se disseminaram por vários sítios orais ao longo do tempo, com tamanho total de pelo menos 3 cm quando consideradas todas as áreas afetadas. Considerando que a LVP é uma condição multifocal, este arquivo de 93 amostras de LVP se refere a biópsias obtidas em um período médio de acompanhamento de 88 meses com uma média de 2 biópsias por indivíduo, em sítios orais diferentes. Foram excluídas do grupo 2 as amostras que revelaram microscopicamente um carcinoma *in situ*, carcinoma espinocelular ou carcinoma verrucoso. O grupo 3 foi o grupo controle, o qual foi composto por 33 amostras parafinadas obtidas de biópsias excisionais de pacientes com hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI). Esta, foi selecionada como controle por ser uma lesão reativa que

apresenta microscopicamente áreas de inflamação crônica e sem risco de transformação maligna. Além disso, devido ao longo tempo de acompanhamento dos pacientes com diagnóstico de LVP e o alto risco de transformação maligna destas lesões, adicionamos um grupo 4 (n=18), no qual incluímos amostras de carcinoma espinocelular/carcinoma tipo verrucoso derivados de pacientes com diagnóstico clínico-patológico prévio de LVP (CEC_LVP). Amostras que revelaram hiperplasia verrucosa ou hiperplasia verrucosa atípica foram excluídas com finalidade de padronização dos grupos. Casos duvidosos foram imediatamente descartados e substituídos.

As informações clínicas, demográficas, de recidiva e transformação maligna foram coletadas dos prontuários médicos. Uma vez incluídos nos estudos, 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 OMS⁴. Adicionalmente, as amostras de LO e LVP foram classificadas de acordo com a análise do risco de transformação maligna, conforme os critérios propostos por Kujan e colaboradores³³, 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)³. Sendo assim, as amostras foram classificadas como “lesões de baixo risco” e “lesões de alto risco” com base em sua suscetibilidade potencial à transformação maligna, de acordo com o sistema binário³³.

4.2.2 Reação de imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica (IHQ) foram realizadas com a colaboração do Prof. Dr. Jorge Esquiche León (Professor da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP). Foram realizados 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°C durante 2 horas e após este período, foram realizadas duas trocas de xilol 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 PH alto (pH=9,0 - S2367) em panela elétrica tipo Pascal. Seguindo o resfriamento do material, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com a incubação com peróxido de hidrogênio 0,1% por 5 min. Após lavagem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, os cortes foram então incubados com o anticorpo primário devidamente diluído, em câmara úmida por 18 h a 4°C. O anticorpo primário utilizado neste estudo e sua respectiva diluição estão descritos 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 a incubação foi feita durante 30 min 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 min a 37°C. A revelação foi feita em solução contendo 120 mg de 3,3 diaminobenzidina tetrahydroclorato (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 min. 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 de diafanização e de montagem. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan Merck e com lamínulas devidamente limpas.

Quadro 1 - Anticorpo primário utilizado para os experimentos de imuno-histoquímica

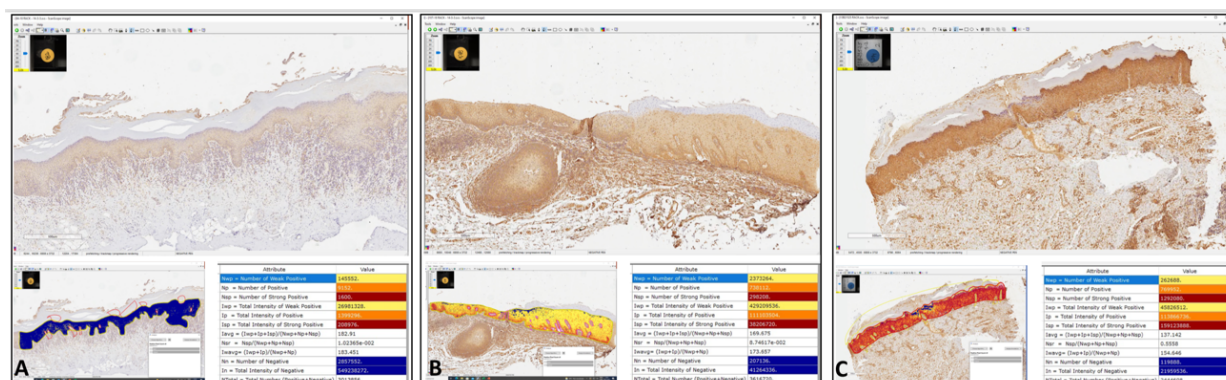
Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição
GNB2L1 (RACK1)	Policlonal	ABclonal	1:200

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 imuno-histoquímica do RACK1 foi realizada com auxílio do Software Aperio ImageScope 12.4.3 (leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc., EUA). A análise das reações de imuno-histoquímica foi realizada às 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 estabelecer uma pontuação qualitativa (baixa e alta expressão) para a expressão citoplasmática do RACK1 no tecido epitelial, levando em consideração a intensidade de pixels e a porcentagem de células marcadas. O cálculo da intensidade de marcação (IM) foi determinado de acordo com o estudo realizado por Chang et al.¹²⁴. 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 pela pontuação estabelecida para cada intensidade de marcação, obtendo-se uma pontuação mínima possível igual a 100 e máxima de 300. Por exemplo, um caso com 20% de marcação fraca, 30% de marcação moderada e 50% de marcação forte teria uma IM igual a 230 ($20 \times 1 + 30 \times 2 + 50 \times 3 = 230$). A figura 3 mostra uma imagem representativa da quantificação da intensidade de marcação imuno-histoquímica do RACK1, evidenciando que somente as áreas de células epiteliais foram delimitadas e submetidas à análise a fim de evitar qualquer influência da marcação gerada pelo estroma.

Figura 3 – Imagem representativa da quantificação por pixel da intensidade de marcação imuno-histoquímica do RACK1 em amostras de LVP



A Representação da quantificação por pixel da intensidade de marcação imuno-histoquímica do RACK1 (azul-negativo; amarelo-baixa intensidade; laranja- intensidade moderada; vermelho-alta intensidade) em uma amostra de baixa intensidade de marcação, **B)** média intensidade de marcação e **C)** alta intensidade de marcação.

Fonte: Elaboração própria.

4.3 Análise da Expressão Gênica de RACK1 em LO, LVP e HFI

Objetivo: este estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica de RACK1, em lesões de LO, LVP e HFI por meio de reações de qRT-PCR.

4.3.1 Isolamento do RNA total

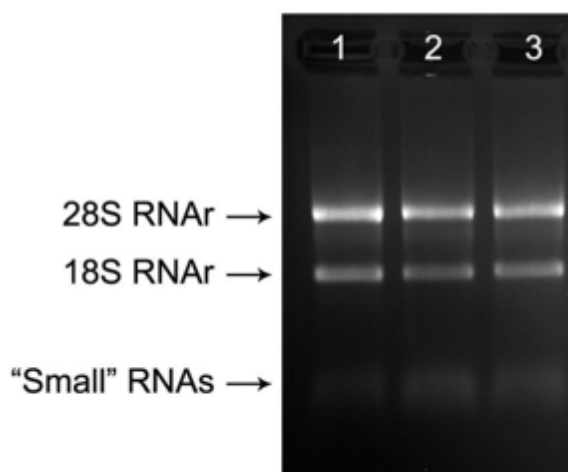
Para análise da expressão gênica de RACK1 foram utilizadas amostras de tecidos congelados previamente coletados e preservados em freezer -80 °C de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO e de LVP, submetidos à biópsia incisional ou excisional. O grupo 1 foi composto por 14 amostras congeladas de LO, o grupo 2 foi composto por 14 amostras congeladas de LVP e o grupo controle foi composto por 8 amostras congeladas de HFI. No momento em que estas amostras foram coletadas, o espécime foi dividido em dois fragmentos, sendo um dos fragmentos destinado para análise histopatológica com coloração de hematoxilina e eosina (H&E), com a finalidade de confirmação diagnóstica e para analisar a proporção de lesão/estroma presente. Um segundo fragmento de cada espécime foi congelado e submetido a 16 cortes de 10-12 µm de espessura em um criostato portátil (Leica Microsystem) a -20 °C, disponibilizado gentilmente pela professora Dra. Iracilda Zeppone Carlos do Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara/SP. Os cortes foram dispostos sobre uma lâmina de vidro revestida com membrana plástica (Arcturus PEN Membrane Glass Slides - Life Technologies), sendo uma das lâminas submetidas à coloração com H&E. Nos demais cortes, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15C e observando o fragmento corado com H&E, o excesso de tecido conjuntivo/estroma das amostras de LO e LVP foi delicadamente removido de forma a garantir que a maior parte do RNA total resultante representasse o componente epitelial. Os tecidos foram incubados com 700 µl do reagente TRIzol (Invitrogen, EUA), macerados com o uso de um pistilo e mantidos por 5 min em temperatura ambiente. Após adição de 140 µl de clorofórmio para cada tubo, uma agitação vigorosa por 15 segundos foi realizada. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 9000 g em temperatura de 4°C. A fase aquosa da solução foi coletada e transferida para tubos novos e 350 µl de álcool isopropanol foi adicionado 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 centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado com 700 µl de 75% etanol gelado. Após nova centrifugação a 6000 g a 4°C por 5 min, o precipitado foi seco, ressuspendido em água livre de DNases e de RNases e estocados na temperatura de -80°C até o momento de sua 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 misturados 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). A figura 4 representa um dos géis confeccionados durante a realização deste estudo.

Figura 4 – Imagem representativa da separação eletroforética do RNA total



Gel de agarose corado com brometo de etídeo utilizado para avaliação da integridade das amostras de RNA total. Amostras representativas de RNA total purificado da amostra controle (canaleta 1) e amostras de LO e LVP (canaletas 2 e 3), demonstrando a proporção ideal das bandas referentes às subunidades maior (28S) e menor (18S) do RNA ribossômico e "small" RNAs.

Fonte: Elaboração própria.

4.3.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, 1µg de RNA total foi reversamente transcrito com o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, EUA) em uma reação com volume final de 20µL, contendo 2,0µL de tampão 10x RT Buffer, 0,8µL de mistura de 25x de dNTP, 2,0µL de 10x Random Primers, 1,0µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50U/µL), 1,0µL de RNase Inhibitor e água deionizada tratada com DEPC 0,1% em quantidade suficiente para completar o volume final. As reações foram realizadas em termociclador a 25°C por 10 min, 37°C por 120min e 85°C por 5seg.

4.3.4 Reação de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas pelo método de quantificação Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), utilizando o gene normalizador GAPDH. As reações foram preparadas em triplicata em placas de 96 poços, utilizado o sistema de detecção SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inglaterra) 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 foram de 2 min a 50°C para ativação da enzima AmpErase, 10 min a 95°C para ativação da enzima AmpliTaq gold DNA polymerase, seguidos de 40 ciclos desnaturação 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 cada 15 s, iniciando-se a 95°C) para geração de uma curva de dissociação (curva de melting) necessária para confirmação da especificidade da amplificação.

4.3.5 Escolha dos primers

A metodologia do qRT-PCR foi utilizada com objetivo avaliar a expressão de genes específicos. Os primers foram sintetizados pela IDT (Coralville, IA, EUA) e as sequências do gene de interesse e do controle interno utilizados nas reações estão descritos no 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 utilizados nos ensaios de qRT-PCR

Gene	Primer Sense (5'-3')	Primer Antisense (5'-3')
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGCAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
RACK1	GCTCTGCCATAAACTTCTAGCGTGTGC	CTGTGCTTCTGGAGGCAAGGATGGCCA

Fonte: Elaboração própria.

4.4 Análise Estatística

Os dados foram tabulados e a distribuição de normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e pelas análises descritivas de assimetria e curtose e a presença de outliers foi verificada. Avaliamos a homocedasticidade dos dados pelo teste de Levene. Para análises de comparações múltiplas foram realizadas análises de variância (ANOVA) e teste de Kruskal Wallis para os dados não normais. Na presença de diferença estatística significativa, o pós-teste de Tukey (dados normais e

homocedásticos), Games-Howell (dados normais e heterocedásticos) e o pós-teste de Dunn (dados não paramétricos) foram executados de acordo com a distribuição dos dados. Quando apropriado, alguns resultados foram avaliados de forma descritiva/qualitativa. Além disso, foi realizada regressão logística binária para avaliar o valor preditor dos níveis de expressão de RACK1 em relação as características clínico-patológicas de LO e LVP, considerando alta e baixa expressão de RACK1. Para essa análise, a expressão imuno-histoquímica de RACK1 em amostras de LO e LVP foi dividida em baixa e alta expressão com base no valor de expressão média ou mediana de cada grupo. O nível de significância adotado nas análises foi de 95% ($\alpha=0.05$) e o software utilizado para as análises foi o IBM SPSS Statistics, versão 20.0. Os gráficos foram construídos por meio do GraphPad Prism versão 6.0.

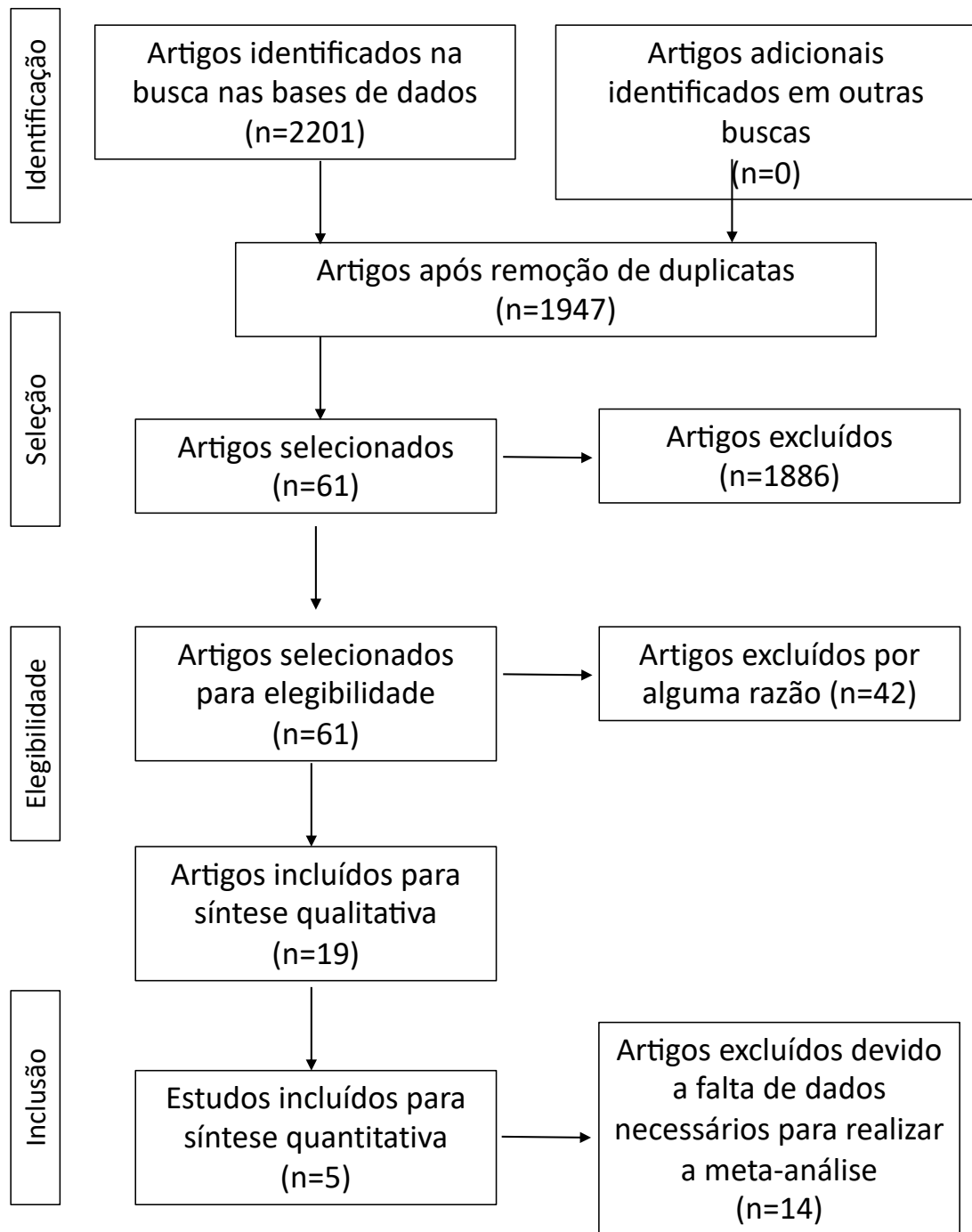
5 RESULTADO

Os resultados deste trabalho encontram-se descritos nas seções abaixo.

5.1 Revisão Sistemática da Literatura e Meta-Análise

A busca realizada nas bases de dados identificou um total 2201 artigos, sendo: 60 artigos no PUBMED, 750 no SCOPUS, 42 na COCHRANE LIBRARY, 1329 no WEB OF SCIENCE. Dentre esses, 254 estavam em duplicata e portanto foram removidos, totalizando 1947 artigos para a seleção inicial. A primeira seleção foi realizada por dois avaliadores que fizeram a leitura do título e do resumo e, ao final, somente 61 artigos passaram para a segunda seleção. Nesta fase, foi feita a leitura completa dos artigos selecionados e dentre estes, 19 foram selecionados para análise qualitativa e 5 para a meta-análise (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma do PRISMA detalhando a busca de dados, seleção por título e resumo, texto completo e estudos incluídos na revisão sistemática



Fonte: Elaboração própria.

5.1.1 Síntese dos resultados

A extração de dados e síntese dos resultados dos artigos incluídos foram realizadas por meio da leitura completa dos estudos, distribuindo os dados em um quadro (Quadro 3) contendo: autor e ano de publicação do estudo, tamanho de amostra, origem do carcinoma, metodologias empregadas para avaliar os níveis de RACK1 na população de estudo, e resultados do desfecho primário e secundário apresentados em cada estudo.

Todos os artigos incluídos no presente trabalho são estudos observacionais retrospectivos transversais em humanos que relatam o nível de expressão (alta ou baixa) de RACK1 em diferentes neoplasias. A neoplasia mais encontrada nesta síntese foi o carcinoma espinocelular (CEC), sendo 4 casos de CEC oral (CECO), 2 casos de CEC cervical, 1 caso de CEC esofágico e 1 caso de câncer gástrico. Encontramos também 3 estudos com adenocarcinoma ductal pancreático, 2 estudos com adenocarcinoma pulmonar e 1 estudo com adenocarcinoma de cólon. Além disso, havia 2 estudos com câncer de mama que incluíram os tipos câncer de mama primário em fase inicial com linfonodo negativo e carcinoma ductal *in situ*. 2 artigos abordaram o carcinoma hepatocelular e havia apenas 1 artigo sobre carcinoma papilífero de tireóide. As metodologias de estudo mais comumente empregadas foram imuno-histoquímica, qRT-PCR, Western blot, ELISA e análise proteômica. Os estudos com CECO mostraram superexpressão de RACK1 e estes níveis aumentados correlacionaram com estágio clínico avançado, metástases, recorrências, assim como piora/diminuição da taxa de sobrevida. Além disso, um dos trabalhos identificou que os níveis de expressão de RACK1 aumentou de acordo com o grau de displasia epitelial e outro trabalho associou a superexpressão de RACK1 com um perfil predominante de macrófagos M2. Os resultados em relação ao adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) foram conflitantes nos 3 artigos incluídos, pois 2 dos artigos encontraram superexpressão de RACK1 nas amostras de PDAC em relação aos tecidos não tumorais e houve correlação com diferenciação histológica, invasão linfonodal, estágio clínico e metástase, além de menor tempo de sobrevida. Por outro lado, um dos artigos relatou baixa expressão de RACK1 nos tecidos de PDAC quando comparado ao tecido pancreático normal e estes níveis reduzidos correlacionaram com metástase linfonodal e vascular, invasão neural e estadiamento TNM. Além disso, a taxa de sobrevida de 3 anos foi menor nos pacientes com superexpressão de

RACK1. Os dois estudos sobre câncer de mama foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, sendo que um deles identificou cinco marcadores que discriminaram o câncer em estágio inicial de indivíduos saudáveis, sendo o RACK1 um destes marcadores, o qual mostrou reatividade significativa. No outro estudo os autores identificaram o RACK1 como antígeno altamente imunogênico na fase inicial de câncer de mama e do carcinoma ductal *in situ*. Ambos os estudos com carcinoma hepatocelular mostram superexpressão de RACK1, a qual estava associada com estágio clínico. Os adenocarcinomas (ADC) pulmonares também exibiram superexpressão de RACK1, a qual correlacionou com grau histológico, metástases linfonodais e indicou menor taxa de sobrevida. Além disso, a expressão de RACK1 foi significativamente maior nos subtipos ADC do que nos tumores de outros subtipos histológicos. Os casos de ADC de cólon abordados em um dos artigos incluídos mostrou que a expressão RACK1 aumentou progressivamente no processo de carcinogênese do epitélio do cólon e a superexpressão de RACK1 levou a uma taxa de sobrevida geral mais baixa em relação aos pacientes com baixos níveis de RACK1. Além disso, houve associação positiva dos níveis de expressão de RACK1 com o grau de malignidade e metástase linfonodal. Nos casos carcinomas papilíferos de tireóide (CPTs) abordados em um dos estudos, foi observado superexpressão de RACK1, sendo esta expressão negativa nos tecidos benignos não tumorais. Além disso, houve diferença nos níveis de expressão de RACK1 de acordo com o grau de diferenciação tumoral. CPTs pouco diferenciados e indiferenciados expressaram níveis de mRNA de RACK1 significativamente mais altos que os CPTs bem diferenciados. Os dois estudos com CEC cervical revelaram resultados conflitantes sobre o papel de RACK1 nestes tumores, sendo que um trabalho revelou superexpressão de RACK1 e este aumento associou com diferenciação tumoral e metástase linfonodal. Em contrapartida, o outro trabalho mostrou diminuição nos níveis de RACK1 nos tecidos de CEC cervical. Níveis diminuídos de RACK1 também foram relatados no carcinoma gástrico e este resultado foi associado com diminuição da sobrevida geral. Nas amostras de CEC esofágicos, houve associação da expressão de RACK1 com tamanho do tumor, estadiamento e metástase linfonodal. Além disso, este artigo verificou a relação de RACK1 com o processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e mostrou correlação positiva com vimentina e inversa com E-caderina. As amostras positivas para RACK1 revelaram sobrevida global e livre de doenças menores do que as amostras negativas para RACK1.

Quadro 3- Síntese dos resultados

Autor/Ano	Origem do carcinoma	Metodologia aplicada	Tamanho da amostra (n)	Desfechos
Wang et al. 2008	Carcinoma Espinocelular Oral (CECO)	Análise proteômica e Imuno-histoquímica (IHQ)	Proteômica n=20 (10 tecidos parerados de CECO e 10 tecidos normais correspondentes) IHQ n= 144 (20 tecidos normais, 48 LO, 76 CECO)	-Alta expressão de RACK1 em CECO (3,9 vezes mais) comparado aos tecidos normais correspondentes. -Superexpressão proteica e de mRNA de RACK1 em CECO e associado a prognóstico ruim. -Intensidade de marcação de RACK1 aumentou conforme o grau de displasia. -Estágio clínico avançado, metástase e recorrência mostraram superexpressão de RACK1.
Lacombe et al. 2014	Câncer de mama	ELISA	n=396 (240 linfonodos negativos fase inicial (T1N0) câncer de mama primário (PBC), carcinoma ductal in situ (DCIS) + 156 controles saudáveis	-Valor diagnóstico de marcadores individuais em pacientes com câncer de mama e controles (RACK1: AUC (95% CI) = 0,55 (0,50-0,61). -RACK1 foi identificado como antígeno altamente imunogênico em fase inicial de câncer de mama e DCIS.
Zhang L et al. 2019	Adenocarcinoma ductal pancreatic (ACDP)	IHQ, qRT-PCR, Western Blot	n=182 amostras, incluindo ACDP e tecido pareado	-Menor expressão de RACK1 no tecido ACDP do que no tecido pancreático normal (para-carcinoma); - Expressão gênica do RACK1 foi reduzida nos tecidos do câncer pancreático -Baixa expressão IHQ de RACK1 em ACDP - 54,4% (99/182) e alta expressão em 45,6% (83/182) dos casos -Expressão de RACK1 associou com metástase linfonodal e vascular, invasão neural e estadiamento TNM (continua)

(continuação)				-Taxa de sobrevida de 3 anos de pacientes com alta expressão de RACK1 foi significativamente maior do que a dos pacientes com baixa expressão de RACK1. - Análise de Kaplan-Meier mostrou que pacientes com maior expressão de RACK1 tiveram sobrevida significativamente pior do que os pacientes com baixa expressão de RACK1.
Nagashio R, et al. 2010	Adenocarcinoma pulmonar (AD)	IHQ, proteômica	n=184 (123 AD, 44 carcinomas espinocelulares, 4 carcinomas de células grandes (LCCs), 7 carcinomas de células pequenas (SCLCs), 6 carcinomas neuroendócrinos de células grandes (LCNECs) - Cânceres pulmonares pareados com seus tecidos pulmonares normais	-Alta expressão de RACK1 em AD -Expressão mal detectada em alguns carcinomas espinocelulares e carcinomas de células grandes -Expressão RACK1 também foi associada com o estágio patológico, tamanho do tumor e status linfonodal de pacientes com AD -Epitélio brônquico proliferativo teve alta expressão de RACK1 - RACK1 foi detectado em 77 de 123 (62,6%) ADs, 3 de 44 (6,8%) SCCs, 1 de 4 (25,0%) LCCs, 0 de 7 (0%) SCLCs, e 3 de 6 (50,0%) LCNECs -Superexpressão RACK1 em AD comparado ao CEC -RACK1 mostrou marcação positiva significativamente maior em AD pulmonares do que tumores de outros subtipos histológicos
Wang et al. 2009	CECO	IHQ	n=130 CECO (casos recorrentes e não recorrentes)	-Expressão de RACK1 mais forte do que Ki-67 -Baixa expressão de RACK1 em casos não recorrentes -Maior expressão de RACK1 em casos recorrentes (63.6%) -Níveis elevados apenas de RACK1 foi um excelente preditor de recorrência em CECO em comparação com o Ki-67. -A marcação de RACK1 foi fortemente relacionada com a do Ki-67. (continua)

(continuação) Myklebust et al. 2011	Carcinoma papilífero da tireóide (CPT)	qRT-PCR e IHQ	n=59 (biópsias de tireóide pareadas não tumorais e tumorais de pacientes com CPT de agressividade variável).	- Superexpressão de RACK1 (mRNA) em amostras tumorais comparado com material não tumoral do mesmo paciente - CPTs pouco diferenciados e indiferenciados expressaram níveis de mRNA RACK1 significativamente mais altos que os CPTs bem diferenciados - Superexpressão de RACK1 nas células tumorais independente da agressividade clínica - Tecido benigno não tumoral foi negativo para RACK1
Guo Y. et al. 2013	Carcinoma Hepatocelular (CH)	IHQ	n=130 CH	- Amostras de CH exibiram superexpressão RACK1 em relação aos tecidos hepáticos peritumorais pareados. - Os níveis de proteína RACK1 nos 130 tecidos de HCC associaram com estágio clínico. - Os níveis da proteína RACK1 em CH estavam positivamente correlacionados com os do P-JNK.
Xiao et al. 2018	Adenocarcinoma de cólon	IHQ e Western Blot	n=180 adenocarcinoma de cólon n=40 metástases linfonodais pareadas (LNM) n=63 mucosas normais de cólon (NCM), n=60 pólipos inflamatórios crônicos	- A expressão RACK1 aumentou progressivamente no processo de carcinogênese do epitélio do cólon - Superexpressão de RACK1 em pacientes com câncer de cólon tiveram sobrevida geral significativamente mais baixa em comparação com pacientes com baixos níveis de RACK1 - Associação significativamente positiva dos níveis de expressão de RACK1 com o grau de malignidade e metástase linfonodal

Jing Wang e Shengcai Chen, 2020	Carcinoma espinocelular (CEC) cervical	qRT-PCR, IHQ e Western blot.	n=46 pacientes com CEC cervical N=30 tecidos cervicais normais	-Diminuição da expressão de RACK1 nos tecidos de CEC cervical comparado com tecido cervical normal -Superexpressão de RACK1 inibiu a expressão de ciclina O, resultando em apoptose das células de CEC cervical - Expressão positiva da proteína RACK1 foi desregulada em pacientes com CEC cervical
Dan et al. 2020	Carcinoma espinocelular oral (CECO)	IHQ	n=45 pacientes com CECO. n= 460 pacientes com CEC cabeça e pescoço obtidos da base de dados TCGA	-Superexpressão de RACK1 está associada a números elevados de macrófagos M2 infiltrantes nos tumores e um prognóstico ruim nos CECO -Superexpressão de RACK1 foi associada a mais macrófagos CD206+ -Baixa expressão de RACK1 foi associada a menos células CD206+ de macrófagos -Expressão da proteína RACK1 correlacionou-se significativamente com o fenótipo M2 no CECO - Pacientes com alta relação M2/M1 tinham sobrevida pior do que pacientes com uma relação M2/M1 baixa, consistente com a análise do banco de dados TCGA -Proporção M2/M1 afeta o prognóstico de CEC, mas não a quantidade total de macrófagos. -RACK1 e macrófagos M2 estão superexpressos e associados a prognóstico ruim em CECO
Wang et al. 2015	Carcinoma espinocelular esofágico (CECE)	IHQ	n=100 pacientes	-59 amostras positivas para RACK1 e 41 negativas -Expressão RACK1 associou com comprimento e diâmetro do tumor, estágio T e metástase linfonodal - Kaplan-Meier e Cox revelaram que a expressão RACK1 era um preditor independente para sobrevida e sobrevida livre de doença - Correlação positiva entre a expressão RACK1 e vimentina -Correlação inversa entre a expressão RACK1 e E-caderina

				-Sobrevida global e livre de doenças em amostras positivas para RACK1 foram menores do que nas amostras negativos - RACK1 indicou prognóstico ruim de CECE, promoveu progressão e participou do processo de TEM.
Li et al. 2016	Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)	Western Blot e IHQ	n=179 (PDAC humanos e amostras tumorais adjacentes)	-Superexpressão de RACK1 em tecidos de PDAC -Superexpressão de RACK1 e Ki-67 em tecidos de PDAC -Baixa ou nenhuma expressão de RACK1 e Ki-67 em tecidos não tumorais -Correlação positiva entre a expressão RACK1 e Ki-67 -Superexpressão de RACK1 em 59,8% dos PDAC e apenas 34,6% dos tecidos não tumorais - Os pacientes com superexpressão de RACK1 tiveram menor sobrevida geral -Expressão de RACK1 correlacionou com tamanho do tumor, diferenciação histológica, estadiamento TNM e expressão de Ki-67
Zhou et al. 2015	Carcinoma hepatocelular (HCC)	WB, IHQ, qRT-PCR	n=46 HCC e amostras de tecido adjacentes não tumoral	-Superexpressão de RACK1 em amostras de HCC, comparado com tecido adjacente normal -Expressão de RACK1 correlacionou com estágio clínico de HCC -Superexpressão de RACK1 pode contribuir para tumorigênese e progressão de HCC.

Liu et al. 2018	Carcinoma espinocelular oral (CECO)	Microarray e IHQ	IHQ: n=342 CECO n=460 da base de dados TCGA Microarray: n=60 pares de tecidos de câncer de vários órgãos humanos e seus tecidos adjacentes não tumorais	- Valores de sobrevida de 5 anos estavam associados à superexpressão de RACK1 - Superexpressão de RACK1 associou com redução/piora da sobrevida dos pacientes com CECO - A validação das amostras da base TCGA também mostrou associação da superexpressão de RACK1 com baixa sobrevida - Superexpressão de RACK1 nos cânceres de esôfago, pulmão, fígado e mama, mas não em cânceres gástricos e retais; consistente com a análise do banco de dados TCGA, sugerindo expressão de RACK1 como câncer-específica
Zhong et al. 2013	Adenocarcinoma pulmonar (ACP)	IHQ, Western Blot e Imunofluorescência	n=180 ACP T1	- Expressão de RACK1 correlacionou com grau histológico e metástases linfonodais - Superexpressão de RACK1 e CD147 nos tecidos de ACP em relação aos tecidos normais correspondentes. - Superexpressão de RACK1 em ACP indicou menor taxa de sobrevida em relação a baixa expressão de RACK1 - RACK1 foi fator prognóstico independente para sobrevida global de pacientes com ACP. - A capacidade de invasão tumoral está associada à expressão de RACK1 e CD147 nos ACP.

Lacombe et al. 2013	Carcinoma ductal <i>in situ</i> (DCIS) e câncer de mama primário em fase inicial com linfonodo negativo (PBC)	ELISA, 2DE-gel e Análise proteômica	n=80 (10 DCIS, 10 PBC estágio inicial, 20 lesões mamárias benignas (BBL); 20 controles saudáveis (HC) e 20 com doenças autoimunes. n=182 (ELISA-validação antígenos identificados e quantificação) (HC n= 68; e câncer de mama em fase inicial com linfonodo negativo, n= 114).	- GAL3 e RACK1 mostraram uma reatividade significativamente maior no câncer de mama em estágio inicial - Quando combinados, os cinco marcadores (GAL3, PAK2, PHB2, RACK1 E RUVBL1) discriminaram o câncer em estágio inicial de indivíduos saudáveis - Este painel de autoanticorpos poderia ser útil como uma ferramenta de diagnóstico para rastreamento do câncer de mama invasivo em estágio inicial e do câncer de mama pré-invasivo.
Han et al. 2018	Adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC)	IHQ, qRT-PCR e Western Blot	IHQ n= 157 PDAC qRT-PCT e WB: 8 amostras de tumor primário e tecido adjacente não tumoral;	- Superexpressão de mRNA RACK1 e proteína em 7 dos 8 espécimes de PDAC em comparação com os tecidos não tumorais adjacentes - Superexpressão IHQ de RACK1 em 121 lesões PDAC em comparação com seus tecidos adjacentes não tumorais - Superexpressão de RACK1 correlacionou com diferenciação histológica, invasão linfonodal, estágio clínico e metástase hepática - Tempo médio de sobrevida em pacientes com superexpressão de RACK1 foi significativamente menor em relação a baixa expressão de RACK1

Yu Z., et al., 2021	Carcinoma gástrico	IHQ, PCR	IHQ n=155 amostras pareadas de câncer gástrico e tecido para-carcinoma PCR n=24 tecidos de câncer gástrico e para-carcinoma pareados	-Diminuição da expressão de RACK1 nos tecidos de câncer gástrico comparado aos tecidos pareados adjacentes - Baixa expressão de RACK1 correlacionou com redução da sobrevida geral -O nível de RACK1 está negativamente correlacionado com a profundidade de invasão, metástase linfonodal e estágio clínico
Xu L et al., 2022	Carcinoma espinocelular (CEC) cervical	IHQ	IHQ n=104 pacientes com CEC cervical e n=31 com tecido epitelial adjacente normal	-Superexpressão de RACK1 nos tecidos de CEC cervical em relação aos tecidos epiteliais cervicais adjacentes normais -Superexpressão de RACK1 foi significativamente associada à diferenciação tumoral e linfonodos positivos - Associação positiva da expressão de RACK1 com metástase linfonodal no CEC cervical

Fonte: Elaboração própria.

5.1.2 Análise de qualidade e risco de viés dos estudos incluídos

As pontuações de qualidade metodológica derivadas da escala de Newcastle-Ottawa¹²¹ modificada para estudos transversais estão apresentados na tabela 1. No geral, os 19 artigos selecionados para nosso trabalho e avaliados individualmente apresentaram qualidade moderada. Assim, todos os artigos incluídos apresentaram risco de viés moderado, variando de 4 a 6 estrelas. Apenas o estudo de Liu et al.¹¹⁵ (2018) foi avaliado como de alta qualidade, recebendo a nota máxima de 7 estrelas e todos os artigos receberam o máximo de 2 estrelas no domínio de comparação. A maioria dos estudos não descreveu a estratégia de amostragem e não detalhou os métodos estatísticos utilizados.

Tabela 1 - Avaliação da qualidade dos artigos incluídos na revisão sistemática

Autor	Seleção (3 estrelas)	Comparação (2 estrelas)	Resultado (2 estrelas)	Comentários
Wang et al., 2008	★★	★★	★★	- Sem descrição da estratégia de amostragem
Wang et al., 2009	★★	★★	★★	- Sem descrição da estratégia de amostragem
Nagashio et al., 2010	★★	★★		- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Myklebust et al., 2011	★★	★★		- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Guo et al., 2013	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Lacombe et al., 2013	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada
Lacombe et al., 2014	★★	★★	★★	
Zhong et al., 2013	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Wang et al., 2015	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Zhou et al., 2015	★★	★★		- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Li et al., 2016	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Han et al., 2018	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Liu et al., 2018	★★★	★★	★★	
Xiau et al., 2018	★★	★★		- Sem descrição da estratégia de amostragem

				- Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Zhang et al., 2019	★★	★★	-	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Dan et al., 2020	★★	★★	★	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Wang et al., 2020	★★	★★		- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Yu et al., 2021	★★	★★	-	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Xu et al., 2022	★★	★★	-	- Sem descrição da estratégia de amostragem - Avaliação independente/cega não relatada - Falta de detalhes estatísticos utilizados.
Os dados foram analisados utilizando a escala de Newcastle-Ottawa para estudos transversais Seleção: máximo de três estrelas; comparação: máximo de duas estrelas; resultado: máximo de duas estrelas. Fonte: Elaboração própria.				

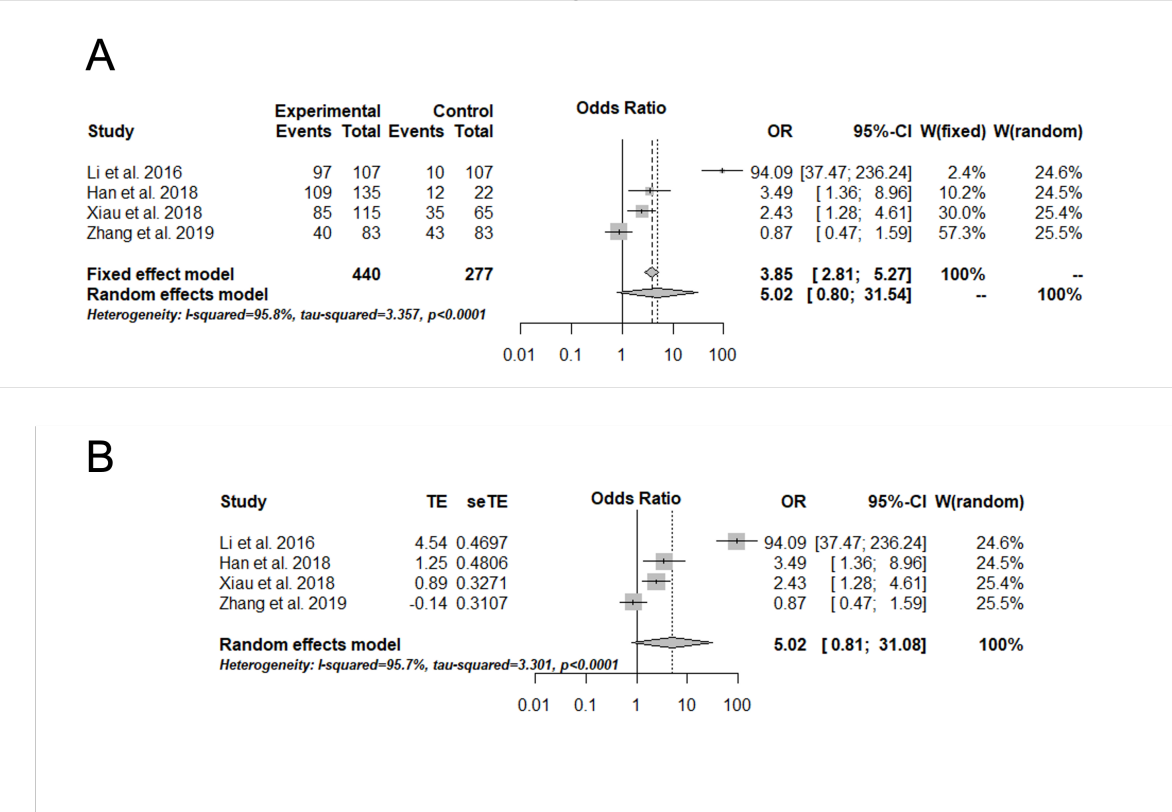
5.1.3 Meta-análise

Após a realização da meta-análise, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos para RACK1 high (alto) e RACK1 low (baixo) em relação a diferenciação histológica tumoral: OR= 5.02 [0,80;31.54] e OR= 0.57 [0.22;1,51], respectivamente (Figura 6A, 7A, respectivamente). Além disso, a presença de linfonodos metastáticos entre os grupos RACK1 high e RACK1 low também não revelou diferença estatística significativa: OR= 1.77 [0.58;5.43] (Figura 8A). A análise Trim-and-fill não revelou viés de publicação e viés de meta-análise para os resultados de RACK1 high e diferenciação histológica (Figura 6B) e RACK1 high e low e presença de linfonodos metastáticos (Figura 8B). Em contrapartida, houve viés de publicação e de meta-análise na análise de diferenciação histológica tumoral e RACK1 low (Figura 7B). Embora tenhamos encontrado com mais frequência altos níveis de RACK1 na diferenciação histológica tumoral pouco/moderadamente diferenciada e também na presença de linfonodos metastáticos, a meta-análise não revelou resultados significativos (Figuras 6A, 7A, 8A). Tendo em vista que dos 5 artigos incluídos na meta-análise, 3 deles eram de adenocarcinoma ductal pancreático, foram realizadas análises de subgrupos para este tipo de tumor, na qual avaliamos a diferenciação histológica em casos com RACK1 alto (grupos experimentais = pouco e moderadamente diferenciado; grupo controle = bem diferenciado (Subgrupo 1); diferenciação histológica dos casos com RACK1 baixo (grupos experimentais = pouco e moderadamente diferenciado; grupo controle = bem diferenciado) (Subgrupo 2) e presença de linfonodos metastáticos entre grupos RACK1 high (grupo experimental) e RACK1 low (grupo controle) (Subgrupo 3). Estas análises de subgrupos revelaram que para pacientes com adenocarcinoma ducal pancreático, a alta expressão de RACK1 (RACK1 high) está associada a uma chance 4.45 maior deste tumor ser pouco ou moderadamente diferenciado (OR= 4.45 [3.09; 6.42]) (Figura 9) e uma chance 1.88 maior de apresentarem linfonodos metastáticos (OR= 1.88 [1.28; 2.75]) (Figura 11), ou seja, corroborando para um prognóstico ruim.

5.1.4 Análise de GRADE

O nível de confiança da qualidade de evidência encontrada nos resultados da meta-análise foi baixo. Em contrapartida, foram detectadas qualidade de evidência moderada e alta nas análises de subgrupos (Tabela 2). De acordo com a análise de GRADE, a meta-análise para o evento presença de linfonodos metastáticos mostrou baixa qualidade da evidência, portanto, baixa confiança na certeza da evidência, pois houve ampla variação no número de eventos positivos no grupo experimental e foram avaliados grupos de pacientes com diferentes tipos de câncer. Quanto aos eventos diferenciação histológica para RACK1 alto e baixo, a qualidade da evidência também foi baixa, pois para ambos houve ampla variação do valor de OR e os grupos de pacientes também apresentavam diferentes tipos de câncer. Por outro lado, a análise de GRADE referente aos resultados das análises de subgrupo revelou qualidade da evidência moderada e alta, sendo os dois eventos de análise de subgrupo para diferenciação histológica e RACK1 baixo e para presença de linfonodos metastáticos considerados como moderada qualidade de evidência. Já para o resultado da análise de subgrupo do evento diferenciação histológica e RACK1 alto, a qualidade da evidência foi alta, ou seja, temos uma alta confiança na certeza desta evidência.

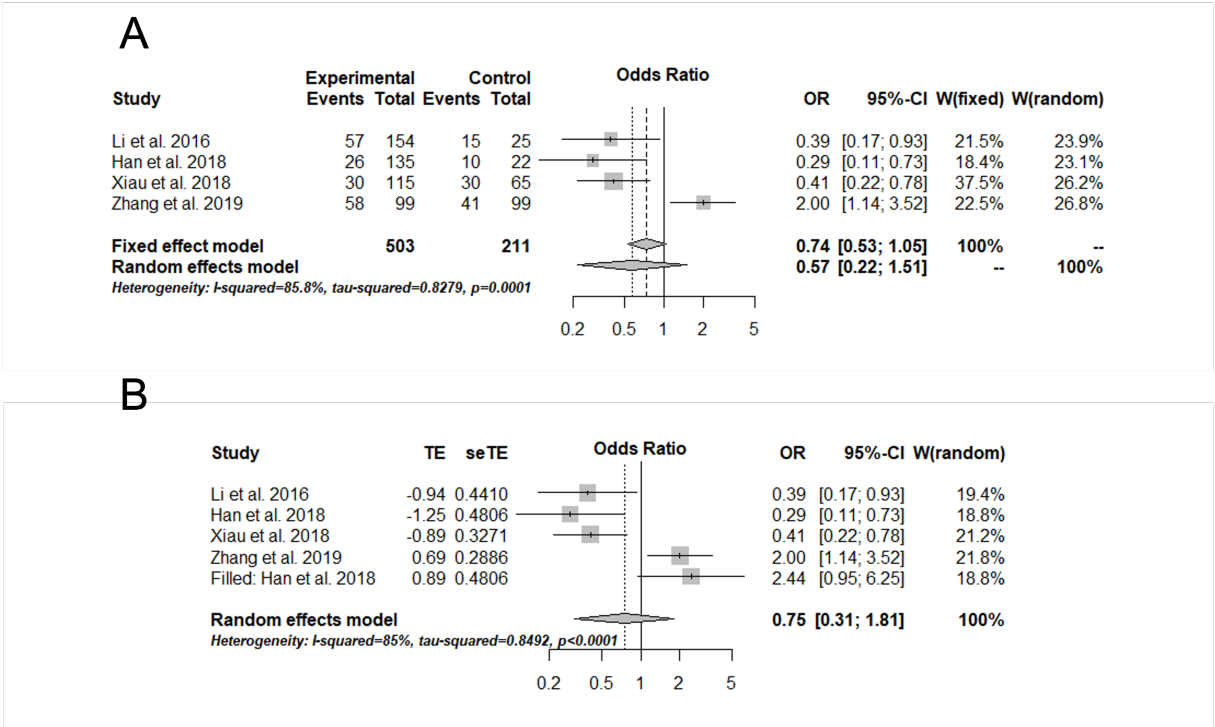
Figura 6 – Resultado da meta-análise em relação a diferenciação histológica tumoral e RACK1 high



A) Resultado da meta-análise de diferenciação histológica tumoral para casos de RACK1 alto (high) ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado pelos subtipos histológicos pouco e moderadamente diferenciado, enquanto o grupo controle foi formado pelo subtipo histológico bem diferenciado. **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 7 – Resultado da meta-análise em relação a diferenciação histológica tumoral e RACK1 low

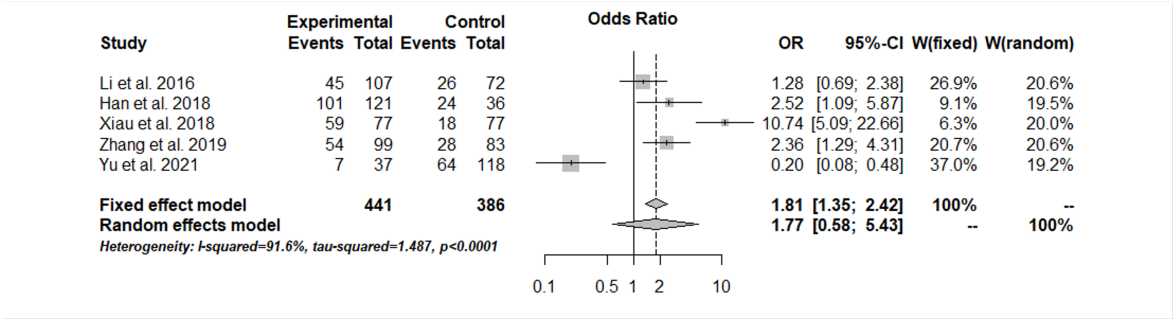


A) Resultado da meta-análise de diferenciação histológica tumoral para casos de RACK1 baixo (low) ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado pelos subtipos histológicos pouco e moderadamente diferenciado, enquanto o grupo controle foi formado pelo subtipo histológico bem diferenciado. **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.

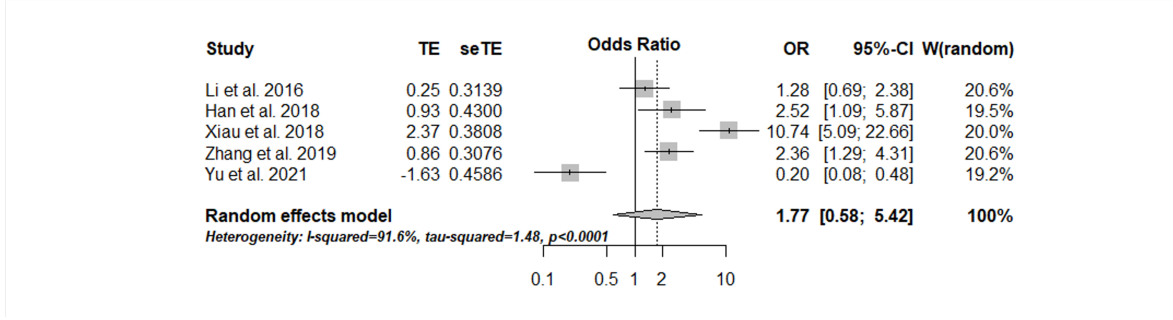
Fonte: Elaboração própria.

Figura 8 – Resultado da meta-análise em relação a presença de linfonodos metastáticos entre os grupos RACK1 high e RACK1 low

A



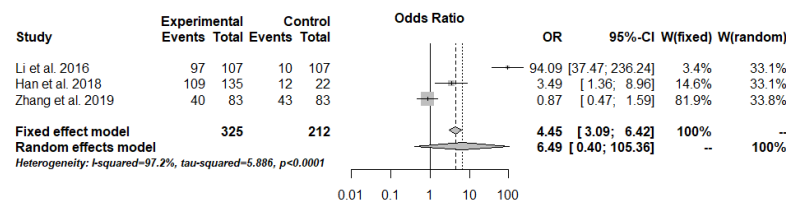
B



A) Resultado da meta-análise da presença de linfonodos metastáticos para casos de RACK1 high (alto) e RACK1 low (baixo) ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado por RACK1 high e o grupo controle foi formado por RACK1 low. **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.

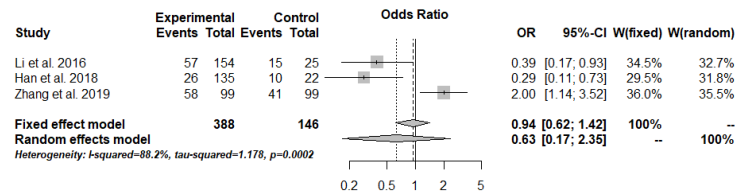
Figura 9 – Análise de subgrupo da diferenciação histológica de adenocarcinomas pancreáticos ductais para casos de RACK1 alto



Resultado da análise de subgrupo da diferenciação histológica tumoral para casos de RACK1 high (alto) ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado pelos subtipos histológicos pouco e moderadamente diferenciado, enquanto o grupo controle foi formado pelo subtipo histológico bem diferenciado.

Fonte: Elaboração própria.

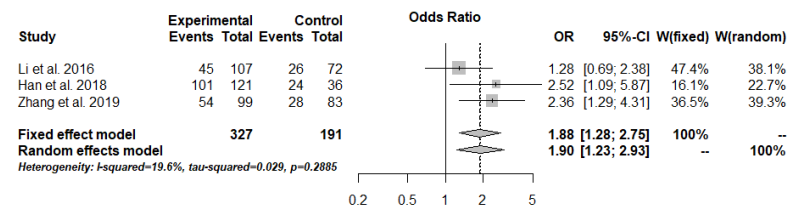
Figura 10 – Análise de subgrupo da diferenciação histológica de adenocarcinomas pancreáticos ductais para casos de RACK1 baixo



Resultado da análise de subgrupo da diferenciação histológica tumoral para casos de RACK1 low (baixo) ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado pelos subtipos histológicos pouco e moderadamente diferenciado, enquanto o grupo controle foi formado pelo subtipo histológico bem diferenciado.

Fonte: Elaboração própria.

Figura 11 – Análise de subgrupo da presença de linfonodos metastáticos em adenocarcinomas pancreáticos entre os grupos RACK1 high e RACK1 low



Resultado da análise de subgrupo da presença de linfonodos metastáticos para casos de RACK1 high (alto) e RACK1 low (baixo) ilustrado em gráfico do tipo forest plot. O grupo experimental foi formado por RACK1 high e o grupo controle foi formado por RACK1 low.

Fonte: Elaboração própria.

Tabela 2 – Análise GRADE da qualidade dos resultados da meta-análise

Resultados	Diferença ilustrativa comparativa		Efeito de medida Odds ratio [IC 95%]	Nº da população amostral	Qualidade da Evidência (GRADE)	Comentários
	Grupo experimental	Grupo controle				
Presença de linfonodos metastáticos	A média linfonodos metastático em pacientes oncológicos com RACK “alto” variou de 101 a 7 eventos positivos.	A média linfonodos metastáticos em pacientes oncológicos com RACK “baixo” variou de 64 a 18 eventos positivos.	OR = 1,77 [0,58; 5,43]	441	(+)(+)(-)(-) Baixo	Variação ampla de eventos positivos no grupo experimental. Grupos de pacientes com diferentes tipos de câncer
Diferenciação histológica RACK “alto”	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “alto” com diferenciação histológica moderada/pobre variou de 104 a 40 eventos positivos.	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “alto” e subtipo histológico bem diferenciado variou de 43 a 10 eventos positivos.	OR= 5,02 [0.80; 531,54]	440	(+)(+)(-)(-) Baixo	Ampla variação do valor de OR. Grupos de pacientes com diferentes tipos de câncer

Diferenciação histológica RACK “baixo”	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “baixo” com diferenciação histológica moderada/pobre variou de 58 a 26 eventos positivos.	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “baixo” e subtipo histológico bem diferenciado variou de 41 a 10 eventos positivos.	OR= 0,57 [0,22; 1,51]	503	(+)(+)(-)(-) Baixo	Ampla variação do valor de OR. Grupos de pacientes com diferentes tipos de câncer
Análise de sub-grupo. Presença de linfonodos metastáticos	A média linfonodos metastático em pacientes oncológicos com RACK “alto” variou de 101 a 45 eventos positivos.	A média de linfonodos metastáticos em pacientes oncológicos com RACK “baixo” variou de 28 a 26 eventos positivos.	OR = 1,88 [1,28; 2,75]	327	(+)(+)(+)(-) Moderado	Variação ampla de eventos dos intervalos de confiança nos estudos incluídos na meta-análise
Análise de subgrupo. Diferenciação histológica RACK “alto”	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “alto” com diferenciação histológica moderada/pobre variou de 109 a 40 eventos positivos.	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “alto” e subtipo histológico bem diferenciado variou de 43 a 10 eventos positivos.	OR= 4,45 [3,09; 6,42]	325	(+)(+)(+)(+) Alto	-

Análise de subgrupo. Diferenciação histológica RACK “baixo”	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “baixo” com diferenciação histológica moderada/pobre variou de 58 a 26 eventos positivos.	A média de casos de pacientes oncológicos com RACK “baixo” e subtipo histológico bem diferenciado variou de 41 a 10 eventos positivos.	OR= 0,94 [0,62; 1,42]	388	(+)(+)(+)(-) Moderado	Variação ampla de eventos dos intervalos de confiança nos estudos incluídos na meta-análise
--	--	--	-----------------------	-----	--------------------------	---

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Características Clínico-Patológicas dos Pacientes com LO, LVP e HFI Incluídos na Análise Imuno-Histoquímica

O perfil epidemiológico dos pacientes diagnosticados com LO envolvidos neste estudo revelou que a maior parte deles era do sexo masculino (n=24; 53,33%), sendo os pacientes do sexo feminino afetados numa menor frequência que os pacientes do sexo masculino (n=21; 46,66%). A média de idade foi de 57,3 anos (variando de 35 a 76 anos) e 55,56% destes pacientes apresentaram história de uso cônico de tabaco (n=25) e apenas 13 pacientes (28,88%) apresentaram história de uso crônico de álcool. A maioria dos pacientes era de raça branca (n=42, 93,3%). Além disso, todos os pacientes com LO foram submetidos a apenas uma biópsia e 46,66% das lesões não revelaram sinais de displasia epitelial (n=21), 7 lesões apresentaram displasia epitelial leve (15,55%) e 15 pacientes apresentaram lesões com displasia moderada (33,33%). Apenas 2 pacientes foram diagnosticados com displasia severa (4,44%). Quando as lesões displásicas foram agrupadas de acordo com a classificação binária de Kujan et al., 2006³³, observamos que a maioria das lesões de LO era de “baixo risco” para transformação maligna (n=28; 62,22%) e 17 delas apresentaram “alto risco” para transformação maligna (37,77%). Apenas 5 casos (11,11%) de LO apresentaram recidiva, o que coincidiu com o número de lesões que malignizaram, sendo que as demais 40 lesões (88,88%) não recidivaram após remoção cirúrgica com bisturi. A taxa de transformação maligna dos pacientes diagnosticados com LO incluídos neste estudo foi de 11,11%, sendo então apenas 5 pacientes com transformação maligna. Analisando as características clínico-patológicas dos pacientes do grupo LVP, observamos que as mulheres foram mais afetadas que os homens, compondo 78,73% dos pacientes deste grupo. A média de idade observada foi de 62,46 anos e a maioria dos pacientes do grupo LVP era da raça branca (n=46; 97,87%), com 34,04% apresentando história de consumo de tabaco e apenas 6,38% deles apresentaram história de consumo de álcool. Todos os pacientes deste grupo apresentaram lesões em múltiplos sítios da cavidade oral e apresentaram tamanho total da lesão maior que 3 cm. Histologicamente, 38,70% (n=36) das lesões não apresentaram displasia epitelial e 27,95% (n=26) eram lesões com displasia epitelial leve. Menos da metade dos casos de LVP eram lesões com displasia moderada (n=27; 29,03%) e apenas 4 apresentaram displasia severa (4,30%), sendo então 64,51% das lesões de baixo risco para transformação maligna e apenas 34,48% de alto risco. Apesar disso, a taxa de transformação maligna dos pacientes

diagnosticados com LVP incluídos em nosso estudo foi de 57,55%. Dentro do nosso acervo de amostras de pacientes diagnosticados com LVP, foi possível incluir 18 blocos de pacientes com LVP que sofreram transformação maligna para carcinoma verrucoso ou carcinoma espinocelular oral. Dentro deste grupo, os pacientes apresentaram uma média de idade de 71 anos, sendo 17 mulheres (94,44%) e apenas 1 homem. Todos os pacientes eram da raça branca e apenas 3 revelaram uso crônico de tabaco (16,66%) e 1 relatou uso crônico de álcool. O sítio oral mais afetado pela transformação maligna foi o rebordo alveolar/gengiva (50%), seguido da língua (38,88%) e da mucosa bucal (11,11%). Os pacientes do grupo controle que apresentaram lesões de HFI eram em sua maioria mulheres (75,75%) e a média de idade foi 55,6 anos. Poucos pacientes tinham o hábito de fumar e beber (n=8; 24,24% e n=7, 21,21%, respectivamente), sendo a maioria pacientes brancos. A distribuição das características clínicas dos grupos HFI, LO, LVP e CEC_LVP selecionados para este estudo encontram-se descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos indivíduos dos grupos HFI, LO, LVP e CEC_LVP selecionados para a análise imuno-histoquímica

Parâmetros	HFI (n=33) n (%)	LO (n=45) n (%)	LVP (n=47) n (%)	CEC_LVP (n=18) n (%)
Idade				
Média de anos	55,57	57,3	62,46	71
Sexo				
Masculino	8 (24,24)	24(53,33)	10 (21,27)	1 (5,55)
Feminino	25(75,75)	21(46,66)	37 (78,73)	17 (94,44)
Raça				
Branços	27 (81,81)	42 (93,3)	46 (97,87)	18 (100)
Não-brancos	6 (18,18)	3 (6,67)	1 (2,13)	0 (0,0)
Tabaco				
Não	25 (75,75)	20(44,44)	31 (65,96)	15 (83,33)
Sim	8 (24,24)	25 (55,56)	16 (34,04)	3 (16,66)
Álcool				
Não	26 (78,78)	32 (71,11)	44 (93,62)	17 (94,44)
Sim	7 (21,21)	13 (28,88)	3 (6,38)	1(5,55)
Sítios orais				
Mucosa jugal		7 (15,55)	21 (22,58)**	
Assoalho bucal		4 (8,88)	7 (7,52)**	
Gengiva/Rebordo alveolar		2 (4,44)	33 (22,58)**	9 (50,00)
Mucosa bucal		4 (8,88)	16 (17,20)**	2 (11,11)
Língua		23 (51,11)	25 (26,88)**	7(38,88)
Palato		5 (11,11)	5 (5,37)**	
Grau de Displasia (OMS, 2017)				
Sem displasia		21 (46,66)	36 ^{††} (38,70)	
Displasia Leve		7 (15,55)	26 ^{††} (27,95)	
Displasia Moderada		15 (33,33)	27 ^{††} (29,03)	
Displasia Severa		2 (4,44)	4 ^{††} (4,30)	
Risco histopatológico (Kujan et al., 2006)				
Baixo risco	-	28 (62,22)	60 (64,51) ^{††}	
Alto risco	-	17 (37,77)	33 (34,48) ^{††}	
Transformação maligna				
Não	-	40 (88,88)	20 (42,55)	
Sim	-	5 (11,11)	27 (57,55)	
Recidiva				
Não	-	40 (88,88)	4 (8,51)	
Sim	-	5 (11,11)	43 (91,49)	

^{††} Número de eventos considerando a quantidade de amostras parafinadas (n=93) obtidas dos pacientes diagnosticados com LVP (n=47).

^{**} Sítios orais referentes ao local da biópsia

Fonte: Elaboração própria.

5.3 A Intensidade de Marcação IHQ de RACK1 Está Aumentada em LO e LVP

Para acessar os níveis de expressão de RACK1, foram realizadas reações de imuno-histoquímica para o marcador RACK1 nas 189 amostras que compunham os grupos LO, LVP, HFI e CEC oriundos de LVP. Nossos resultados revelaram que ambas DPMOs apresentaram um aumento na intensidade de marcação da expressão de RACK1 em relação ao grupo controle (HFI), sendo que este aumento na intensidade de expressão de RACK1 foi estatisticamente significativo tanto no grupo LO quanto no grupo LVP em relação ao controle ($p=0,0253$ e $p<0,0001$, respectivamente). Além disso, foi possível observar uma superexpressão de RACK1 nas amostras de LVP em relação à LO ($p=0,0344$). Quando avaliamos o padrão de expressão de RACK1 nos 4 grupos estudados, nota-se que o grupo controle apresenta baixa expressão de RACK1, a qual aumenta gradativamente no grupo LO e depois no grupo LVP, sendo que há uma queda nos níveis de expressão de RACK1 no grupo de CEC de oriundos pacientes diagnosticados com LVP, porém sem diferença estatística significativa (Figura 12). Sendo assim, parece que as amostras de LVP que sofreram transformação maligna apresentam uma diminuição da expressão de RACK1. Imagens representativas da marcação IHQ de RACK1 podem ser observadas na Figura 13.

Adicionalmente, nós avaliamos a intensidade de marcação imuno-histoquímica de RACK1 nos grupos estudados de três formas distintas considerando a presença de displasia epitelial oral nas amostras de LO e LVP. Considerando a classificação do grau de displasia epitelial oral proposto pela OMS 2017, no grupo de amostras de LO não foi possível observar diferença estatística significativa entre os diferentes graus de displasia. Porém é possível notar que existe um aumento da expressão de RACK1 nas amostras sem displasia para as amostras com displasia leve, e essa expressão cai nas amostras de displasia moderada, e diminui ainda mais nas amostras com displasia severa (figura 14). Quando avaliamos as amostras de LVP conforme a classificação de displasia epitelial da OMS 2017, observamos diferença estatística significativa entre o grupo controle e amostras sem displasia, com displasia leve, moderada e severa ($p<0,0001$; $p=0,0020$ $p=0,0007$; $p=0,0073$, respectivamente). Sendo assim, para todos os graus de displasia epitelial e para as amostras sem displasia houve diferença estatística significativa na intensidade de marcação de

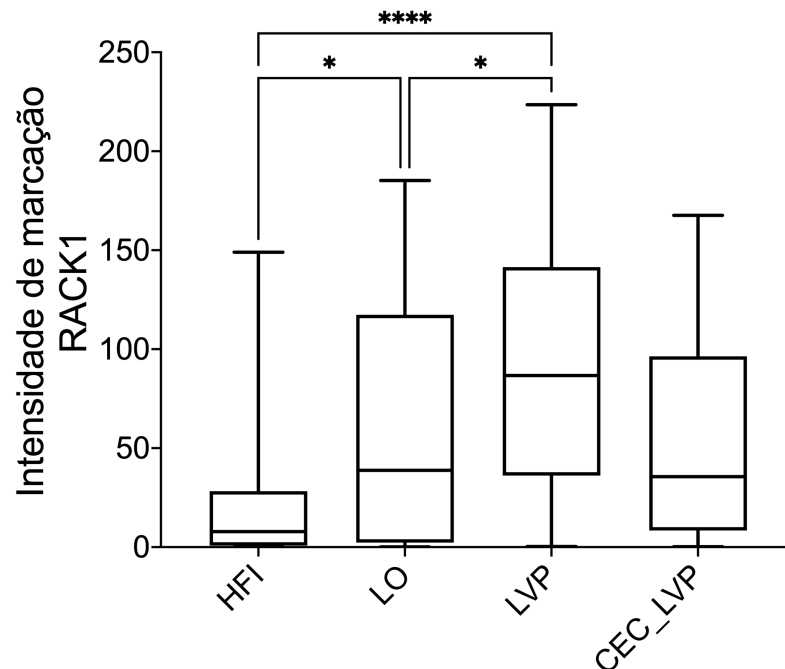
RACK1 quando comparamos com o grupo controle, o qual apresentou baixa intensidade de marcação (figura 15).

Quando consideramos unicamente a presença ou ausência de displasia epitelial, independente do grau de displasia, observamos um aumento na intensidade de marcação de RACK1 no grupo LO sem displasia quando comparamos com o grupo controle ($p=0,0381$) e não houve diferença estatística significativa quando comparados o grupo displasia com o controle e da mesma forma, não houve diferença entre o grupo sem displasia e com displasia (figura 16). Em relação as amostras do grupo LVP, verificamos um aumento estatisticamente significativo da intensidade de expressão da proteína RACK1 em ambos os grupos sem displasia ($p<0,0001$) e com displasia ($p<0,0001$) em relação ao controle. Entretanto, não houve diferença estatísticas nos níveis de RACK1 no grupo LVP com displasia e LVP sem displasia, sendo possível notar que ambos apresentam níveis elevados de expressão de RACK1 independente da presença ou não de displasia epitelial. As figuras 16 e 17 mostram as imagens gráficas das análises de intensidade de RACK1 nas amostras de LO e LVP, respectivamente, mostrando as diferenças estatísticas identificadas segundo a presença e ausência de displasia epitelial, independente do grau de displasia. Similarmente, verificamos a intensidade de marcação de RACK1 nas amostras de LO e LVP a partir da classificação binária de Kujan et al., 2006. As amostras foram então avaliadas de acordo com o risco de transformação maligna e classificadas como lesões de "baixo risco" e "alto risco". Sendo assim, as amostras de LO e LVP foram divididas em dois grupos (LO "baixo risco" e LO "alto risco"; LVP "baixo risco" e LVP "alto risco") e comparadas com o grupo controle (HFI). A intensidade de marcação de RACK1 nas amostras de LO "baixo risco" revelou um aumento estatisticamente significativo quando comparadas ao grupo controle ($p=0,0266$). Já em relação as amostras de LO de alto risco, não observamos diferenças estatísticas significativas. (Figura 18). Quando avaliamos os níveis de intensidade de RACK1 nas amostras de LVP agrupadas em "baixo risco" e "alto risco", observamos um aumento na intensidade de marcação de RACK1 independente do risco histológico em relação ao grupo controle, com diferença estatística significativa entre HFI e LVP "baixo risco" ($p<0,0001$) e entre HFI e LVP "alto risco" ($p<0,0001$) (Figura 19). Além disso, as amostras de LO e de LVP foram divididas de acordo com a ocorrência ou não de transformação maligna. Para o grupo de amostras de LO observamos um aumento na intensidade de marcação de RACK1 no grupo de amostras sem transformação

maligna em relação ao controle ($p=0,0455$). Quando avaliamos as amostras que sofreram transformação maligna, os níveis de intensidade de marcação de RACK1 parece diminuir em relação as amostras sem transformação, porém não houve diferença estatística significativa (figura 20). Observando o grupo LVP, verificamos que ambos os grupos de amostras sem transformação e com transformação maligna tiveram um aumento significativo na intensidade de marcação de RACK1 em relação ao grupo controle ($p<0,0001$; $p=0,0001$, respectivamente). Além disso, também notamos uma queda na intensidade de marcação de RACK1 do grupo de amostras sem transformação para o grupo das amostras que transformaram ($p=0,0161$) (figura 21).

As análises de regressão logística binária realizadas nas amostras de LO não mostraram diferença estatística significativa para a relação das características clínico-patológicas com a alta e baixa expressão de RACK1. Sendo assim, altos e baixos níveis de expressão de RACK1 não associaram com as variáveis avaliadas (idade, sexo, raça, tabaco, álcool, risco de transformação maligna, recidiva e grau histológico de displasia epitelial) (quadro 4). No grupo LVP, apenas a variável idade correlacionou com a expressão de RACK1 ($p=0,040$), sendo que quanto maior a idade, maior a chance de encontrarmos níveis altos de RACK1 [$\text{Exp}(B)=1,043$] (quadro 5). A média de idade do grupo com alta expressão de RACK1 foi de 64,8 anos e a média de idade do grupo com baixa expressão de RACK1 foi de 60,5 anos. Vale ressaltar que essa diferença estatística só existe dentro do grupo LVP como razão de chance, apesar de serem médias de idade muito próximas. Quando comparamos LO e LVP, as médias de idade também são próximas, sendo o grupo LO com uma média de idade de 57,3 anos e no grupo LVP considerando todas as amostras a média de idade foi de 62,46 anos.

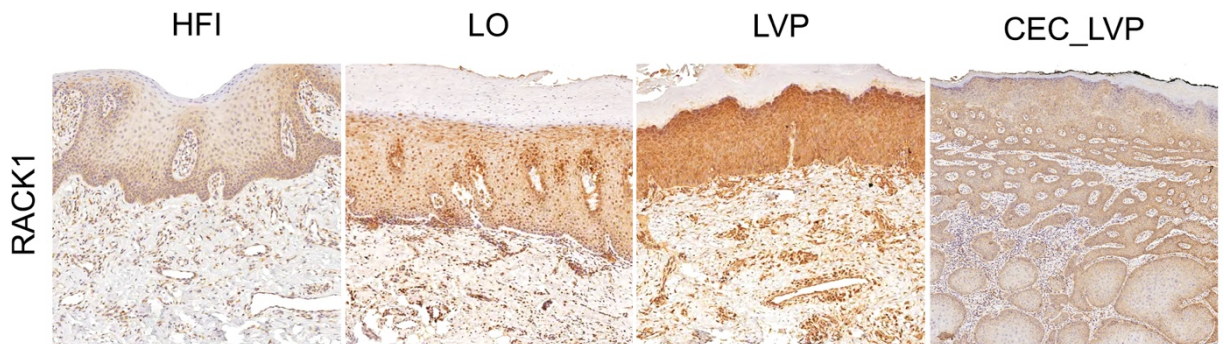
Figura 12 – Determinação da intensidade de marcação de RACK1 nos grupos HFI, LO, LVP e CEC de LVP



Observa-se um aumento na intensidade de marcação de RACK1 no grupo LO ($p=0,0253$) e no grupo LVP ($p<0,0001$) em relação ao grupo controle (HFI). Além disso, existe um aumento estatisticamente significativo na marcação de RACK1 no grupo LVP em relação ao grupo LO ($p=0,0344$).

Fonte: Elaboração própria.

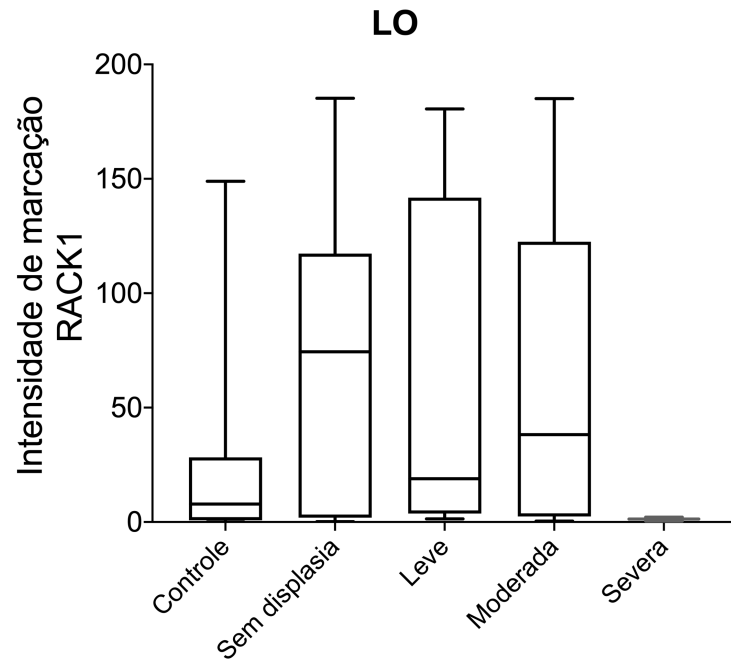
Figura 13 – Imagem representativa da marcação imuno-histoquímica de RACK1 entre os grupos HFI, LO, LVP e CEC oriundos de LVP



Representação da marcação imuno-histoquímica de RACK1 no grupo controle (HFI), LO, LVP e CEC oriundos de LVP, respectivamente.

Fonte: Arquivo pessoal da autora.

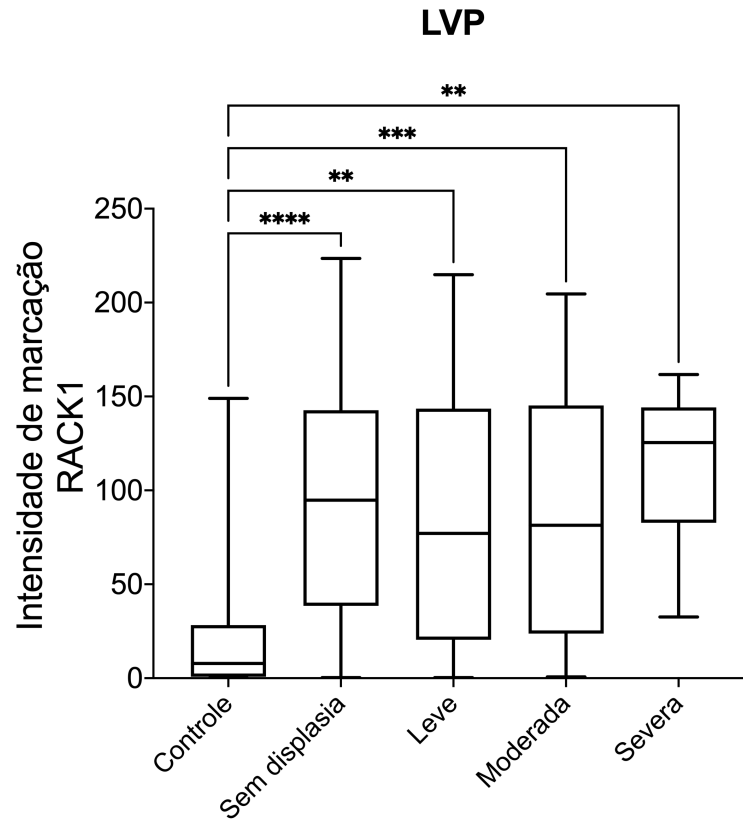
Figura 14- Avaliação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LO de acordo com a classificação de displasia epitelial oral proposta pela OMS 2017 em relação ao controle



Não observamos diferença estatística significativa em relação a intensidade de marcação de RACK1 e os diferentes graus de displasia epitelial em relação ao grupo controle.

Fonte: Elaboração própria.

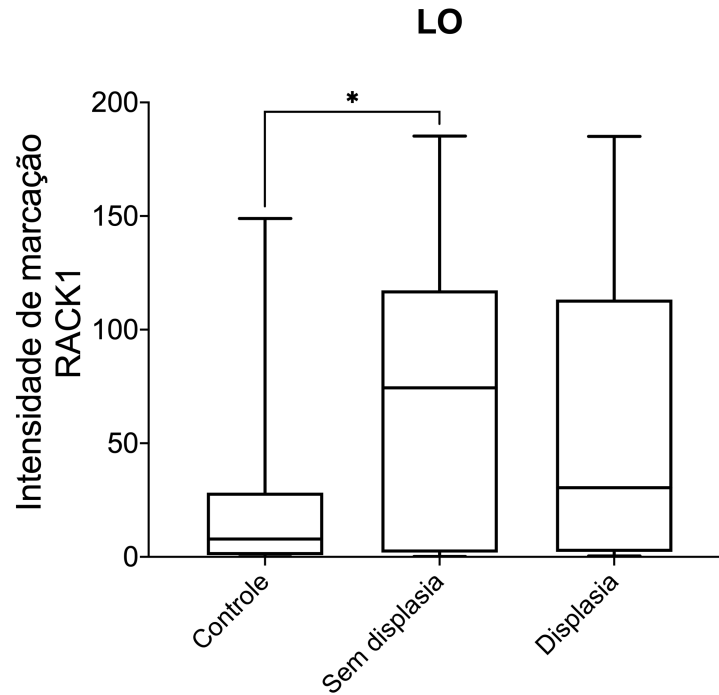
Figura 15- Avaliação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LVP de acordo com a classificação de displasia epitelial oral proposta pela OMS, 2017 em relação ao controle



Observamos diferença estatística significativa em relação a intensidade de marcação de RACK1 e os diferentes graus de displasia epitelial em relação ao grupo controle, sendo que os níveis RACK1 estão superexpressos em todos os graus de displasia epitelial e também nas amostras sem displasia ($p < 0,0001$; $p = 0,0020$; $p = 0,0007$; $p = 0,0073$, respectivamente).

Fonte: Elaboração própria.

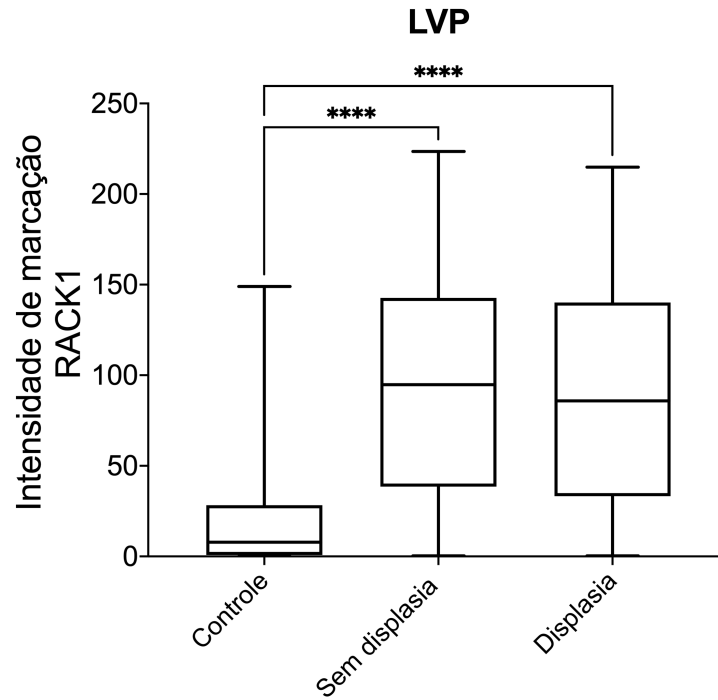
Figura 16- Determinação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LO considerando presença ou ausência de displasia epitelial



Observamos um aumento estatisticamente significativo na intensidade de marcação de RACK1 nas amostras sem displasia em relação ao grupo controle ($p=0,0381$).

Fonte: Elaboração própria.

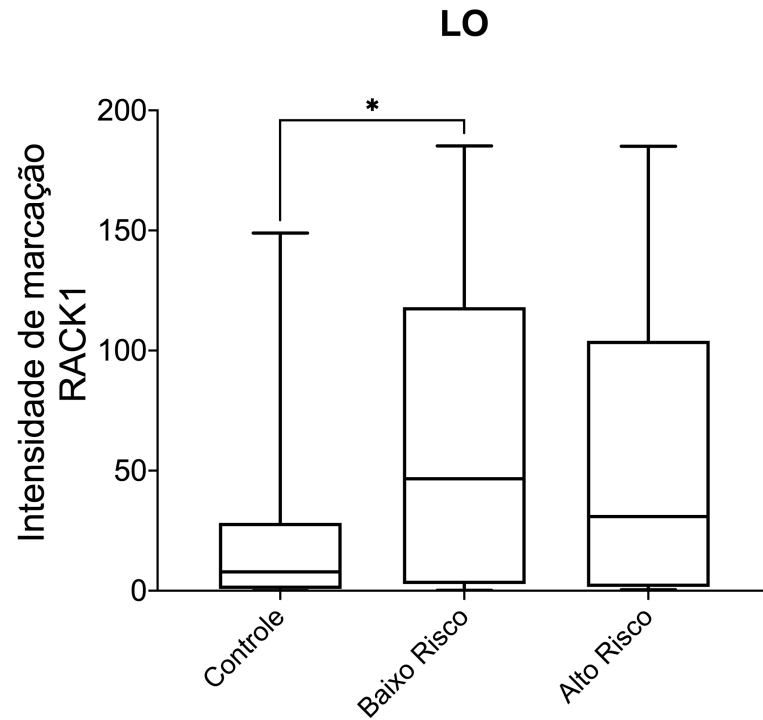
Figura 17- Determinação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LVP considerando presença ou ausência de displasia epitelial



Observa-se que as amostras de LVP sem displasia e com displasia apresentam aumento na intensidade de marcação de RACK1 em relação ao controle, sendo este aumento estatisticamente significativo (**** $p < 0,0001$).

Fonte: Elaboração própria.

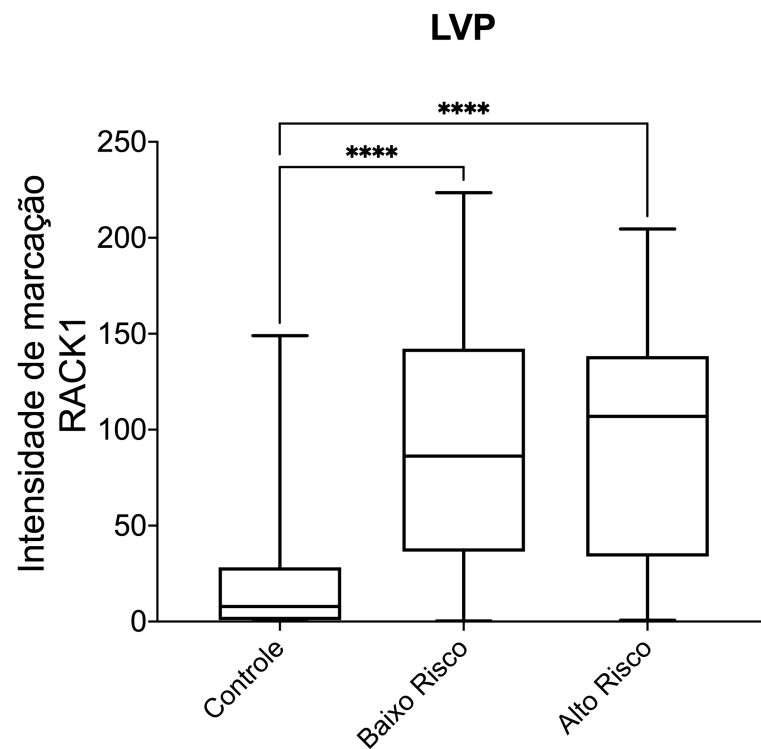
Figura 18- Determinação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LO de "baixo risco" e "alto risco" em relação ao controle



Observa-se que as amostras de "baixo risco" de LO apresentam um aumento na intensidade de marcação de RACK1 em relação ao controle ($p= 0,0266$) e vemos uma queda dessa expressão no grupo LO "alto risco", porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa.

Fonte: Elaboração própria.

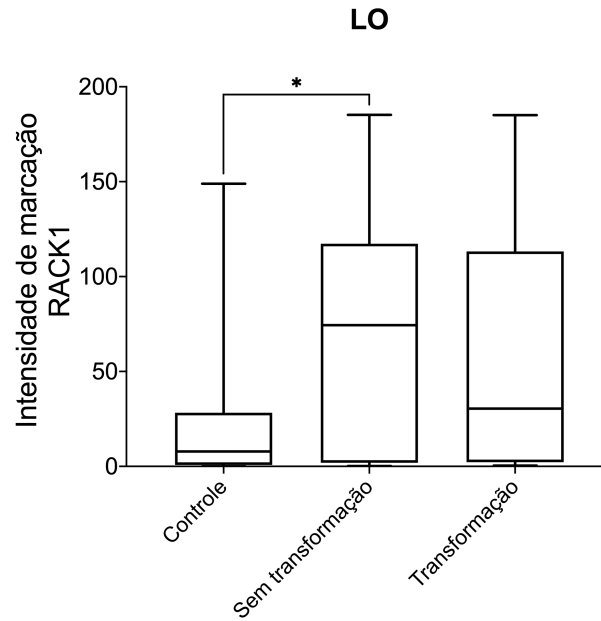
Figura 19- Determinação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LVP de "baixo risco" e "alto risco" em relação ao controle



Podemos observar que existe diferença estatística significativa no aumento da intensidade de marcação de RACK1 tanto nas amostras de LVP de "baixo risco" quanto de "alto risco" em relação ao controle. **** $p < 0,0001$.

Fonte: Elaboração própria.

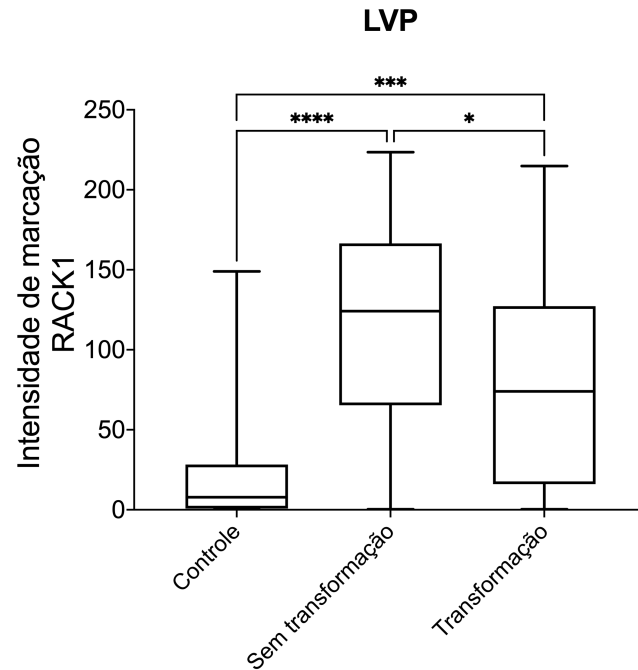
Figura 20- Determinação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LO, considerando as amostras transformadas e não transformadas



Podemos observar que existe diferença estatística significativa entre os níveis de marcação de RACK1 do grupo controle em comparação ao grupo LO sem transformação maligna, onde existe uma superexpressão de RACK1 ($p=0,0455$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 21- Determinação da intensidade de marcação de RACK1 em amostras de LVP, considerando as amostras transformadas e não transformadas



Observamos um aumento na intensidade de marcação de RACK1 tanto nas amostras de LVP sem transformação maligna ($p < 0,0001$) quanto nas amostras de LVP com transformação maligna ($p = 0,0001$) em relação ao controle. Além disso, também existe diferença estatística significativa em relação a intensidade de marcação de RACK1 no grupo LVP sem transformação maligna em relação as amostras que sofreram transformação maligna, evidenciando uma diminuição da marcação de RACK1. ($p = 0,0161$).

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 4 - Resumo da regressão logística simples para as informações clínico-patológicas do grupo LO em relação á alta e baixa expressão de RACK1

Variáveis	β	S.E	<i>Wald</i>	df	<i>p</i>-value	95% CI
Idade	,020	,031	,394	1	,530	,959-1,084
Sexo (1)	-,625	,875	,511	1	,475	,096-2,972
Raça (1)	-,362	1,621	,050	1	,823	,029-16,674
Tabaco (1)	-,311	,803	,150	1	,699	,152-3,537
Álcool (1)	-,545	,887	,378	1	,539	,102-3,298
Transformação (1)	-22,558	26621,223	,000	1	,999	0,000
Recidiva (1)	21,356	26621,223	,000	1	,999	0,000
Grau histológico			,797	3	,850	
Grau histológico (1)	21,751	28392,043	,000	1	,999	0,000
Grau histológico (2)	20,742	28392,043	,000	1	,999	0,000
Grau histológico (3)	21,322	28392,043	,000	1	,999	0,000

Fonte: Elaboração própria.

Quadro 5 - Resumo da regressão logística simples para as informações clínico-patológicas do grupo LVP em relação á alta e baixa expressão de RACK1

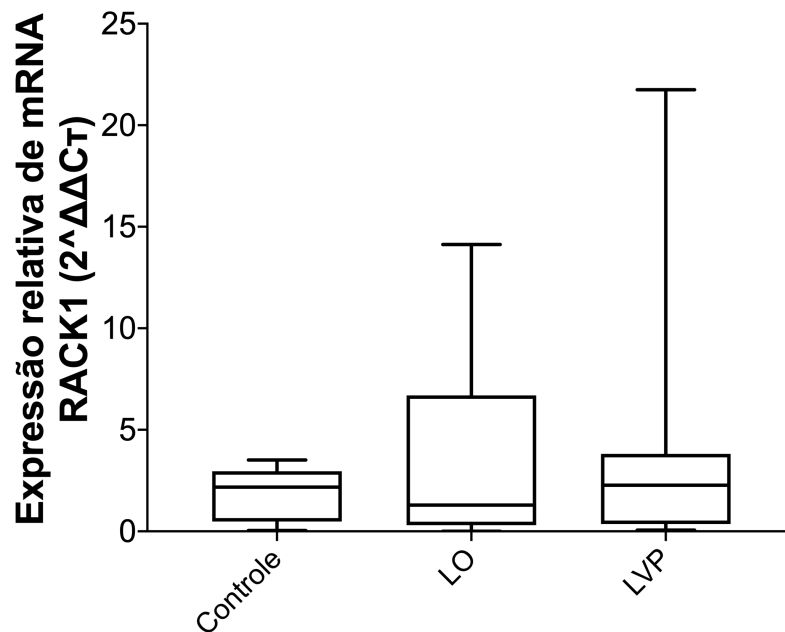
Variáveis	β	S.E	<i>Wald</i>	df	<i>p</i>-value	95% CI
Idade	,042	,021	4,216	1	,040	1,002-1,086
Sexo (1)	-,163	,506	,104	1	,747	,315-2,289
Raça (1)	-,594	1,552	,146	1	,702	,026-11,565
Tabaco (1)	,378	,565	,447	1	,504	,482-4,420
Álcool (1)	-1,344	,685	3,848	1	,050	,068-,999
Transformação (1)	,334	,650	,265	1	,607	,391-4,991
Recidiva (1)	,067	,721	,009	1	,926	,260-4,395
Grau histológico			,835	3	,841	
Grau histológico (1)	,938	1,306	,515	1	,473	,197-33,050
Grau histológico (2)	,877	1,323	,440	1	,507	,180-32,162
Grau histológico (3)	1,171	1,338	,765	1	,382	,234-44,419

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Avaliação da Expressão Gênica de RACK1 em LO e LVP

Para avaliar a expressão gênica de RACK1 em amostras de LO, LVP e HFI, foram realizadas reações de qRT-PCR. A análise estatística dos resultados da quantificação por qRT-PCR nas amostras congeladas de LO, LVP e HFI não revelou diferenças estatísticas significativas (Figura 22). Apesar disso, vemos um aumento na expressão de RACK1 no grupo LO em relação ao controle, e a expressão de RACK1 cai no grupo LVP.

Figura 22- Análise de qRT-PCR para expressão gênica de RACK1



Os resultados da expressão gênica de RACK1 por qRT-PCR no grupo controle, LO e LVP não revelaram alterações estatisticamente significativas. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) é o tipo histológico de câncer mais comumente encontrado na cavidade oral, representando mais de 95% de todas as neoplasias malignas que acometem estes sítios. O CEC oral (CECO) é considerado uma lesão multifatorial associada ao consumo excessivo de tabaco e álcool, exposição aos raios ultravioletas, bem como a alterações genéticas^{1,2,35}. Apesar dos recentes avanços no entendimento e nos protocolos de tratamento em diferentes tipos de tumores malignos, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com CECO permanece entre 50 e 60% e o prognóstico destes casos permanece sombrio^{1,2}.

As DPMOs frequentemente precedem o desenvolvimento do CECO e deveriam ser diagnosticadas precocemente a fim de prevenir e melhorar o prognóstico dos pacientes. Dentre as principais DPMOs estão a LO e a LVP, que apesar de compartilharem características clínicas e microscópicas, possuem uma taxa de transformação maligna discrepante, sendo 9,8% e 49.5%, respectivamente^{11,14}. Apesar disso, o método utilizado para prever o potencial de malignização destas lesões, que é a classificação da displasia epitelial oral, não é totalmente confiável. Sabemos que nenhum dos sistemas de classificação atualmente em uso é totalmente fiel, não é capaz de prever quais DPMOs irão de fato sofrer transformação maligna e quando isso irá ocorrer, além de revelar uma grande variabilidade intra-examinadores e inter-examinadores. Assim, os achados histopatológicos de displasia epitelial indicam apenas que a lesão tem um risco estatisticamente maior de transformação maligna^{4,6,7,9}. Dentro deste paradigma, se faz necessário buscar potenciais biomarcadores associados à LO e à LVP a fim de contribuir para uma elucidação do comportamento clínico distinto entre elas, além de apontar possíveis estratégias terapêuticas para a LVP. Vale ressaltar, ainda, que o atual sistema de graduação da displasia epitelial não é capaz de reproduzir o risco clínico de transformação maligna nas lesões LVP, uma vez que elas muitas vezes não revelam alterações citológicas importantes mesmo apresentando alterações arquiteturais significativas e portanto, talvez fosse necessário estabelecer um limite menor do número de alterações citológicas e arquiteturais consideradas para os casos de LVP⁸.

O RACK1 é um receptor intracelular de 36 kDa, da família da proteína quinase C e membro da família das proteínas Trp-Asp40 (WD40)¹¹⁷. Ele desempenha um papel fundamental em uma ampla gama de respostas biológicas, incluindo

crescimento celular, migração, diferenciação, transdução de sinal e resposta imune e tem atraído bastante interesse por seu papel central em servir como proteína de andaime para numerosas quinases e receptores. Embora o RACK1 seja reconhecido como essencial para a proliferação celular e sobrevivência sob condições fisiológicas normais, seu papel na formação e desenvolvimento de tumores provou ser complexo e permanece controverso²⁴. Portanto, considerando a identificação do RACK1 por meio de um estudo proteômico com amostras de HFI, LO e LVP realizado pelo nosso grupo de pesquisa, o envolvimento desta proteína nas DPMOs tornou-se o foco subsequente deste estudo¹⁷. Além disso, o RACK1 é um fator importante na manutenção da homeostase celular normal e sua expressão elevada contribui para a transformação oncogênica²⁰.

No presente estudo foi demonstrado que as lesões de LO e LVP apresentam uma alta expressão de RACK1 quando comparado ao grupo controle formado por lesões hiperplásicas benignas. Além disso, verificamos uma superexpressão de RACK1 nas amostras de LVP quando comparado com as amostras de LO, enfatizando uma diferença no padrão de expressão de RACK1 nestas DPMOs, o que poderia justificar a diferença biológica e o padrão de evolução clínica distinto nos pacientes com lesões de LVP. Curiosamente, as lesões de LVP que sofreram transformação maligna para carcinoma parecem perder a expressão de RACK1 e essa queda dos níveis de RACK1 pode estar favorecendo a ocorrência transformação maligna, uma vez que estas lesões apresentam uma taxa média de malignização de 65,8% e uma proporção agrupada de transformação maligna de 43,87%^{126,127}. Os trabalhos que avaliaram os níveis de RACK1 em CECO relataram que RACK1 estava superexpresso nestes tumores e esta superexpressão correlacionou com prognóstico ruim, lesões recorrentes e piora da sobrevida, como demonstrado na síntese de dados dos artigos incluídos na revisão sistemática^{18,19,115,128}. Embora não tenha diferença estatística significativa, as amostras de carcinoma avaliadas em nosso trabalho mostraram níveis mais baixos de expressão de RACK1 em comparação com as amostras de LO e LVP, sendo esta queda mais evidente quando comparamos o grupo de amostras de LVP com as amostras de carcinomas dos pacientes com LVP. Vale ressaltar que nossas amostras eram de carcinomas provenientes de pacientes diagnosticados previamente com LVP e não de pacientes que desenvolveram CEC propriamente dito, sendo que estes tipos de tumores diferem principalmente em relação ao perfil epidemiológico dos pacientes e fatores de risco envolvidos. Por isso

talvez tenhamos resultados conflitantes com a literatura no que diz respeito ao nível de expressão de RACK1 em CECO com o que encontramos nos carcinomas de LVP, porém nenhum destes trabalhos avaliou lesões de LVP ou de carcinomas oriundos de pacientes com LVP. Nossos achados sugerem que a perda ou diminuição da expressão de RACK1 seja importante para o início do processo de transformação maligna nas lesões de LVP.

Apesar de não ser um método fiel de predição de transformação maligna, a classificação do grau de displasia epitelial oral continua sendo o padrão ouro no diagnóstico das DPMOs, além de ser utilizado para a classificação das lesões em baixo risco e alto risco^{4,8,33,43,128}. Então, nós analisamos nossas amostras de LO e de LVP segundo estes parâmetros. Independente do grau de displasia e do risco, observamos superexpressão de RACK1 nas amostras de LVP. Estes achados enfatizam que a análise do grau de displasia pouco diz sobre o risco de transformação maligna, uma vez que a maioria das lesões de LVP não apresentaram displasia, ou apresentaram lesões com displasia leve a moderada e apesar disso 57,55% dos pacientes sofreram transformação maligna. Neste sentido, o que parece ser importante nas lesões de LVP é a queda de RACK1 observada nas amostras de CEC oriundas de LVP. Além disso, nesta DPMO, os níveis elevados de RACK1 podem estar contribuindo para as altas taxas de recorrência que são usualmente encontradas nestas lesões^{4,14,1518,19}.

Foi possível observar que a princípio, as amostras de LO parecem ter o mesmo comportamento que as amostras de LVP em relação ao aumento da expressão de RACK1. Porém, a LO apresenta níveis basais de expressão inferiores aos da LVP, sugerindo que a superexpressão de RACK1 parece se relacionar com processos iniciais da tumorigênese, como por exemplo a transição-epitélio mesenquimal (TEM), enquanto a redução dos níveis de RACK1 parece ser importante na transformação maligna propriamente dita. A superexpressão de RACK1 em pacientes com câncer de mama foi associado com bom prognóstico após 10 anos de follow-up^{83,100}. Pensando no comportamento biológico da LO, onde uma minoria destas lesões progride de fato para CECO, a alta expressão de RACK1 nas lesões de baixo risco de LO pode estar atuando de maneira a promover apoptose de células displásicas e também poderia atuar como preditor de bom prgnóstico^{83,100}. Como mencionado anteriormente, a alta expressão de RACK1 pode estar agindo em outras vias iniciais importantes da carcinogênese como proliferação, TEM, ciclo celular, entre outras, uma vez que

RACK1 atua em diversas vias e processos biológicos chaves^{20,24,129,130}. Nesse sentido, foi relatado que a alta expressão de RACK1 diminuiu o crescimento das células de câncer gástrico e inibiu TEM por meio da limitação da via Wnt/ β -catenina¹³¹. Além disso, a função de supressor de tumor tem sido atribuída ao RACK1 no câncer gástrico e colorretal^{82,131}.

Apesar de discreto, há uma diminuição da expressão de RACK1 nas amostras de LO com grau moderado de displasia, que se repete nas amostras de LO com transformação maligna quando agrupadas, sugerindo mais uma vez que a queda ou baixos níveis de RACK1 pode atuar como gatilho para a transformação maligna destas DPMOs. Baixos níveis de RACK1 foram relatados no câncer gástrico, CEC cervical, adenocarcinoma ductal pancreático, o que correlacionou com metástases, invasão, estadiamento TNM e piora da sobrevida¹³¹⁻¹³⁴. A queda na intensidade de marcação de RACK1 é bem mais evidente e significativa nas amostras de LVP que sofreram transformação maligna. Assim, a diminuição de RACK1 parece impactar de maneira mais importante as amostras de LVP, o que pode ser visto como um resultado interessante quando pensamos no RACK1 como um biomarcador de transformação maligna e até mesmo como alvo terapêutico, uma vez que as lesões de LVP não respondem a nenhuma das modalidades terapêuticas atualmente relatadas e recorrem com frequência⁴⁸. Neste sentido, estudos com câncer de mama em estágio inicial identificaram RACK1 como altamente imunogênico e sugeriram sua utilização como marcador diagnóstico individual nestes tumores^{135,136}.

A avaliação de lesões com e sem displasia epitelial em relação aos níveis de expressão de RACK1 foi avaliada apenas em um estudo, o qual incluiu amostras de tecido normal, LO sem displasia, LO com displasia e CECO. Os resultados mostraram um aumento da expressão de RACK1 conforme o aumento do grau de displasia epitelial, e este achado correlacionou com estadiamento clínico, envolvimento de linfonodos e recorrência, uma vez que os tecidos de CECO tiveram superexpressão de RACK1 em relação aos tecidos de LO displásicos e não displásicos¹⁸. Nossos resultados parecem diferir no que diz respeito aos níveis de expressão de RACK1 em amostras de LO, uma vez que observamos uma tendência de aumento de expressão nas amostras sem displasia para as amostras com displasia leve, porém observamos uma tendência de diminuição da expressão nas amostras com displasia moderada e severa. Apesar disso, vale ressaltar que em nosso trabalho nós avaliamos apenas o tecido epitelial das amostras e a análise da intensidade de marcação IHQ de RACK1

foi realizada de forma automatizada, levando em consideração os diferentes graus de displasia epitelial e o risco. No trabalho citado anteriormente, a análise foi feita manualmente por dois avaliadores e os autores não descreveram na metodologia se avaliaram apenas o epitélio e não mencionaram a classificação dos graus de displasia das amostras estudadas¹⁸. Na análise de LO segundo os graus de displasias, houve uma tendência de queda de RACK1 na displasia moderada e severa, semelhante ao observado na LVP, o que foi observado também quando avaliamos as amostras utilizando a classificação de Kujan et al.³³ Avaliando as lesões de LVP, todas as amostras apresentaram níveis elevados de RACK1 independente do grau de displasia, do risco e da presença ou ausência de displasia o que se assemelha ao que é relatado na literatura sobre os níveis de RACK1 em lesões de CECO e que correlaciona com lesões recorrentes e de prognóstico ruim^{18,19,48,115,127}. Além disso, destacamos que os níveis de expressão de RACK1 se mantêm altos na LVP e só vemos de fato uma queda nos casos já transformados (CEC oriundos de LVP).

Assim, observando a expressão de RACK1 na LO e na LVP, a alta expressão parece ser importante nos processos iniciais da carcinogênese e no desenvolvimento das lesões em si. Na LVP, talvez a superexpressão de RACK1 seja um nível suficientemente mais alto do que na LO para conferir um comportamento mais agressivo à LVP em termos de espalhamento, recidiva, transformação maligna e resistência aos tratamentos. A diminuição dos níveis de RACK1 parece impactar na transformação maligna, principalmente quando vemos a queda significativa da expressão de RACK1 nas amostras de LVP com transformação maligna quando comparamos com as lesões de LVP sem transformação. Essa diminuição nos níveis de RACK1 também é observado quando agrupamos as amostras de LO em baixo risco e alto risco. Porém, chamamos atenção ao fato que nosso tamanho amostral de amostras de LO transformadas é pequeno, além disso, não adicionamos um grupo de amostras de carcinomas de LO.

De modo geral, a expressão de RACK1 parece variar entre diferentes tipos de carcinomas e mesmo dentro de um mesmo tipo de câncer em estágios distintos e por isso seu papel permanece controverso^{115,130}. Além disso, tem sido considerado seu papel como órgão-específico¹¹⁵. Em alguns cânceres como câncer de esôfago, pulmão, fígado e mama, RACK1 tem sido considerado um oncogene pois sua superexpressão tem sido associada a características mais agressivas do tumor e pior prognóstico. Neste sentido, nossos resultados de meta-análise das análises de

subgrupo enfatizam que pacientes com adenocarcinoma ductal pancreático e níveis elevados de expressão de RACK1, têm maiores chances de apresentarem diferenciação histológica pouco ou moderadamente diferenciado e apresentarem linfonodos metastáticos, corroborando para um pior prognóstico. Por outro lado, os níveis reduzidos de RACK1 também podem estar relacionados à progressão tumoral, como foi visto nos cânceres gástrico e retal^{82,115,130,131}. Além disso, apesar da maioria dos estudos com CECO indicarem níveis elevados de RACK1, o estudo de Liu et al.¹¹⁵ revelou níveis reduzidos de RNAm nestes tumores quando comparado aos tecidos normais adjacentes. Assim como indicado em nossos resultados, o RACK1 pode desempenhar um papel importante na transformação maligna das DPMOs para carcinoma. Esse aspecto pode ser particularmente relevante para os pacientes diagnosticados com LO e LVP que foram as DPMOs aqui estudadas.

A avaliação da análise imuno-histoquímica revelou que o padrão de marcação de RACK1 foi predominantemente citoplasmático. Porém, alguns casos pontuais demonstraram marcação nuclear. Isso foi visto também em 3 artigos que relataram marcação predominantemente citoplasmática e ocasionalmente no núcleo^{18,19,28}. O artigo de Wang et al.¹⁸ mostrou que a imunomarcação de RACK1 foi prontamente identificada no citoplasma e ocasionalmente no núcleo, sendo que as figuras mostraram marcação nuclear nos casos de LO com e sem displasia epitelial. Os demais artigos incluídos na revisão sistemática demonstraram que expressão de RACK1 foi localizada no citoplasma das células tumorais^{102,115,127,132-143}. De modo geral, a expressão de RACK1 é citoplasmática, mas talvez seja interessante avaliar em pesquisas futuras quais casos tiveram marcação citoplasmática e quais tiveram também marcação nuclear, uma vez que isso pode correlacionar com o tipo de DPMO, características clínico-patológicas, risco de malignização e prognóstico.

Essa diferença no padrão de marcação imuno-histoquímica de RACK1 pode ser considerada quando avaliamos a expressão gênica de RACK1 nas amostras de HFI, LO e LVP, nas quais não houve diferença estatística significativa. Provavelmente existem controles pós transcricionais distintos e por isso só vemos diferenças estatísticas quando avaliamos a nível de proteína. Este achado também foi relatado no artigo de Yu Z. et al.¹³¹, onde os autores encontraram diminuição do nível proteico de RACK1 em tecidos de câncer gástrico quando comparado com tecidos pareados para-carcinoma. Porém, quando avaliaram a expressão do mRNA de RACK1, o nível de expressão de RACK1 foi semelhante entre os tecidos de câncer gástrico e os

tecidos de para-carcinoma pareados, sem diferença estatística significativa. Por isso os autores levantaram a hipótese de que o RACK1 pode ter sido modificado por processamento pós-tradução celular.

Vale a pena destacar que o presente estudo apresenta limitações. Uma delas é a limitação no número de amostras para análise de RACK1 a nível de RNAm, o que nos impossibilita avaliar a existência ou não de translocação nuclear que justifique a diferença nos resultados da análise proteica em relação a análise gênica. Outra limitação deste estudo é a ausência de estudos *in vitro* que permitam avaliar o papel da RACK1 em vias iniciais importantes da carcinogênese como ciclo celular, proliferação, apoptose, TEM, utilizando queratinócitos normais, displásicos e tumorais, e se possível, cultura de células de lesões de LVP, a fim de investigar o impacto de RACK1 na malignização das DPMOs.

7 CONCLUSÃO

Os níveis de expressão de RACK1 são diferentes na LO e na LVP, embora ambas apresentem níveis altos em relação ao controle, impactando no comportamento biológico e no processo de transformação maligna. A redução nos níveis de expressão de RACK1 parece ser importante para a transformação maligna de lesões de LVP. Além disto, o papel de RACK1 parece distinto nos diferentes tipos de neoplasias, podendo a alta expressão de RACK1 estar associada com pior ou melhor prognóstico. Portanto, o melhor entendimento da participação de RACK1 nas DPMOs pode ser de grande relevância na identificação de um possível biomarcador, indicador prognóstico ou alvo terapêutico.

REFERÊNCIAS*

1. Warnakulasuriya S, Greenspan JS. Epidemiology of oral and oropharyngeal cancers. *In*: Warnakulasuriya S; Greenspan JS, editors. Textbook of oral cancer Switzerland: Springer; 2020. p. 5-22.
2. Warnakulasuriya S, Kerr AR. Oral cancer screening: past, present, and future. *J Dent Res*. 2021; 100(12): 1313-20.
3. 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; 27(8): 1862-80.
4. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017.
5. Woo SB. Oral epithelial dysplasia and premalignancy. *Head Neck Pathol*. 2019; 13(3): 423-39.
6. Ranganathan K, Kavitha L. Oral epithelial dysplasia: classifications and clinical relevance in risk assessment of oral potentially malignant disorders. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019; 23(1): 19-27.
7. Tilakaratne WM, Jayasooriya PR, Jayasuriya NS, De Silva RK. Oral epithelial dysplasia: causes, quantification, prognosis, and management challenges. *Periodontol 2000*. 2019; 80(1): 126-47.
8. Odell E, Kujan O, Warnakulasuriya S, Sloan P. Oral epithelial dysplasia: recognition, grading and clinical significance. *Oral Dis*. 2021; 27(8): 1947-76.
9. Villa A, Sonis S. Oral leukoplakia remains a challenging condition. *Oral Dis*. 2018; 24(1-2): 179-83.
10. Warnakulasuriya S, Ariyawardana A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. *J Oral Pathol Med*. 2016; 45(3): 155-66.
11. 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.
12. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003; 39(8): 770-80.
13. Cabay RJ, Morton TH Jr, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36(5): 255-61.
14. 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; 42(3): 539-55.

* 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>

15. Torrejon-Moya A, Jané-Salas E, López-López J. Clinical manifestations of oral proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2020; 49(5): 404-8.
16. Bagan J, Murillo-Cortes J, Poveda-Roda R, Leopoldo-Rodado M, Bagan L. Second primary tumors in proliferative verrucous leukoplakia: a series of 33 cases. *Clin Oral Investig.* 2020; 24(6): 1963-69.
17. Arroyo E, Sayáns MP, López SB, de Oliveira Barbeiro C, Paravani Palaçon M, Chamorro Petronacci CM et al. Identification of proteomic biomarkers in proliferative verrucous leukoplakia through LC-MS/MS. *Lab Invest.* 2023; 26: 100222.
18. Wang Z, Jiang L, Huang C, Li Z, Chen L, Gou L et al. Comparative proteomics approach to screening of potential diagnostic and therapeutic targets for oral squamous cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics.* 2008; 7(9): 1639-50.
19. Wang Z, Zhang B, Jiang L, Zeng X, Chen Y, Feng X et al. RACK1, an excellent predictor for poor clinical outcome in oral squamous carcinoma, similar to Ki67. *Eur J Cancer.* 2009; 45(3): 490-96.
20. Adams DR, Ron D, Kiely PA. RACK1, a multifaceted scaffolding protein: structure and function. *Cell Commun Signal.* 2011; 9: 22.
21. Ruan Y, Sun L, Hao Y, Wang L, Xu J, Zhang W et al. Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* 2012; 122(7): 2554-66.
22. Chen L, Min L, Wang X, Zhao J, Chen H, Qin J et al. Loss of RACK1 Promotes Metastasis of Gastric Cancer by Inducing a miR-302c/IL8 Signaling Loop. *Cancer Res.* 2015; 75(18): 3832-41.
23. Ou H, Wang L, Xi Z, Shen H, Jiang Y, Zhou F et al. MYO10 contributes to the malignant phenotypes of colorectal cancer via RACK1 by activating integrin/Src/FAK signaling. *Cancer Sci.* 2022; 113: 3838-51.
24. McCahill A, Warwicker J, Bolger GB, Houslay MD, Yarwood SJ. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 1261-73.
25. Hu F, Tao Z, Wang M, Li G, Zhang Y, Zhong H et al. RACK1 promoted the growth and migration of the cancer cells in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2013; 34: 3893-99.
26. Lv QL, Huang YT, Wang GH, Liu YL, Huang J, Qu Q et al. Overexpression of RACK1 promotes metastasis by enhancing epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in human glioma. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13(10): 1021.
27. Shi S, Deng YZ, Zhao JS, Ji XD, Shi J, Feng YX et al. RACK1 promotes non-small-cell lung cancer tumorigenicity through activating sonic hedgehog signaling pathway. *J Biol Chem.* 2012; 287: 7845-58.
28. Wang N, Liu F, Cao F, Jia Y, Wang J, Ma W et al. RACK1 predicts poor prognosis and regulates progression of esophageal squamous cell carcinoma through its epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther.* 2015; 16: 528-40.

29. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010; 46(6): 423-5.
30. Schmitt J, Seidler A, Diepgen TL, Bauer A. Occupational ultraviolet light exposure increases the risk for the development of cutaneous squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2011; 164(2): 291-307.
31. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* 2003; 39(8): 770-80.
32. Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco- related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med.* 1996; 25(2): 49- 54.
33. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N and Sloan P: Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006, 42: 987-93.
34. 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.
35. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009; 15(6): 388-99.
36. Lodi G, Franchini R, Warnakulasuriya S, Varoni EM, Sardella A, Kerr AR et al. Interventions for treating oral leukoplakia to prevent oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016; 29; 7(7): CD001829.
37. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 63-9.
38. Kuribayashi Y, Tsushima F, Morita KI, Matsumoto K, Sakurai J, Uesugi A et al. Long-term outcome of non-surgical treatment in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2015; 51(11): 1020-25.
39. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. a long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985; 60(3): 285-98.
40. Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(7): 379-82.
41. Bagan J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. *Oral Dis.* 2010; 16(4): 328-32.
42. Villa A, Woo SB. Leukoplakia-a diagnostic and management algorithm. *J Oral Maxillofac Surg.* 2017; 75(4): 723-34.

43. Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Cohen DM, Bilodeau EA, Bhattacharyya I, Lewis JS Jr et al. Inter-observer variability in the diagnosis of proliferative verrucous leukoplakia: clinical implications for oral and maxillofacial surgeon understanding: a collaborative pilot study. *Head Neck Pathol.* 2020; 14(1): 156-65.
44. Cerero-Lapiedra R, Balade-Martinez D, Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez G, Bagan JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(6): e839–45.
45. Carrard VC, Brouns ER, van der Waal I. Proliferative verrucous leukoplakia; a critical appraisal of the diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2013; 18(3): e411–3.
46. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract.* 2002; 11(1): 32-5.
47. Nikitakis NG, Pentenero M, Georgaki M, Poh CF, Peterson DE, Edwards P et al. Molecular markers associated with development and progression of potentially premalignant oral epithelial lesions: current knowledge and future implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018; 125(6): 650-69.
48. Capella DL, Gonçalves JM, Abrantes AAA, Grando LJ, Daniel FI. Proliferative verrucous leukoplakia: diagnosis, management and current advances. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017; 83(5): 585-93.
49. Guillemot F, Billault A, Auffray C: Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86(12): 4594-98.
50. Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(3): 839-43.
51. Besson A, Wilson TL, Yong VW. The anchoring protein RACK1 links protein kinase C epsilon to integrin beta chains: requirements for adhesion and motility. *J Biol Chem.* 2002; 14; 277(24): 22073-84.
52. Chang BY, Chiang M, Cartwright CA. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem.* 2001; 276(23): 20346-56.
53. Steele MR, McCahill A, Thompson DS, MacKenzie C, Isaacs NW, Houslay MD et al. Identification of a surface on the beta-propeller protein RACK1 that interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Cell Signal.* 2001; 13(7): 507–13.
54. Kubota T, Yokosawa N, Yokota S, Fujii N. Association of mumps virus V protein with RACK1 results in dissociation of STAT-1 from the alpha interferon receptor complex. *J Virol.* 2002; 76(24): 12676–82.
55. Hermanto U, Zong CS, Li W, Wang LH. RACK1, an insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-interacting protein, modulates IGF-I-dependent integrin signaling and promotes cell spreading and contact with extracellular matrix. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(7): 2345–65.

56. Baumann M, Gires O, Kolch W, Mischak H, Zeidler R, Pich D et al. The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *Eur J Biochem.* 2000; 267(12): 3891–901.
57. Wang S, Chen JZ, Zhang Z, Gu S, Ji C, Tang R et al. Cloning, expression and genomic structure of a novel human GNB2L1 gene, which encodes a receptor of activated protein kinase C (RACK). *Mol Biol Rep.* 2003; 30(1): 53-60.
58. Del Vecchio I, Zuccotti A, Pisano F, Canneva F, Lenzken SC, Rousset F et al. Functional mapping of the promoter region of the GNB2L1 human gene coding for RACK1 scaffold protein. *Gene.* 2009, 430(1-2):17-29.
59. Ashique AM, Kharazia V, Yaka R, Phamluong K, Peterson AS, Ron D. Localization of the scaffolding protein RACK1 in the developing and adult mouse brain. *Brain Res.* 2006; 1069(1): 31-8.
60. Battaini F, Pascale A, Lucchi L, Pasinetti GM, Govoni S: Protein kinase C anchoring deficit in postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Exp Neurol.* 1999, 159(2): 559-64.
61. Battaini F, Pascale A: Protein kinase C signal transduction regulation in physiological and pathological aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1057: 177-92.
62. Peyrl A, Weitzdoerfer R, Gulesserian T, Fountoulakis M, Lubec G: Aberrant expression of signaling-related proteins 14-3-3 gamma and RACK1 in fetal down syndrome brain (trisomy 21). *Electrophoresis.* 2002, 23(1): 152-57.
63. Chang BY, Conroy KB, Machleder EM, Cartwright CA. RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(6): 3245-56.
64. Kiely PA, Sant A, O'Connor R. RACK1 is an insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor-interacting protein that can regulate IGF-1-mediated Akt activation and protection from cell death. *J Biol Chem.* 2002; 277(25): 22581-589.
65. Sklan EH, Podoly E, Soreq H. RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2006; 78(2): 117-34.
66. Schechtman D, Mochly-Rosen D. Adaptor proteins in protein kinase C-mediated signal transduction. *Oncogene.* 2001; 20(44): 6339-47.
67. Ron D, Jiang Z, Yao L, Vagts A, Diamond I, Gordon A. Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC. *J Biol Chem.* 1999; 274(38): 27039-46.
68. Pass JM, Gao J, Jones WK, Wead WB, Wu X, Zhang J et al. Enhanced PKC beta II translocation and PKC beta II-RACK1 interactions in PKC epsilon-induced heart failure: a role for RACK1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281(6): H2500-10.
69. López-Bergami P, Habelhah H, Bhoumik A, Zhang W, Wang LH, Ronai Z. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol Cell.* 2005; 19(3): 309-20.
70. Bird RJ, Baillie GS, Yarwood SJ. Interaction with receptor for activated C-kinase 1 (RACK1) sensitizes the phosphodiesterase PDE4D5 towards hydrolysis of cAMP and activation by protein kinase C. *Biochem J.* 2010; 432(1): 207-16.

71. He DY, Neasta J, Ron D. Epigenetic regulation of BDNF expression via the scaffolding protein RACK1. *J Biol Chem*. 2010; 285(25): 19043-50.
72. Yarwood SJ, Steele MR, Scotland G, Houslay MD, Bolger GB. The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform. *J Biol Chem*. 1999; 274(21): 14909-17.
73. Houslay MD, Adams DR. PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*. 2003; 370(Pt 1):1-18.
74. Bolger GB, Baillie GS, Li X, Lynch MJ, Herzyk P, Mohamed A et al. Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Biochem J*. 2006; 398(1):23-36.
75. Bolger GB, McCahill A, Yarwood SJ, Steele MR, Warwicker J, Houslay MD. Delineation of RAID1, the RACK1 interaction domain located within the unique N-terminal region of the cAMP-specific phosphodiesterase, PDE4D5. *BMC Biochem*. 2002; 3:24.
76. Serrels B, Sandilands E, Serrels A, Baillie G, Houslay MD, Brunton VG et al. A complex between FAK, RACK1, and PDE4D5 controls spreading initiation and cancer cell polarity. *Curr Biol*. 2010; 20(12):1086-92.
77. Serrels B, Sandilands E, Frame MC. Signaling of the direction-sensing FAK/RACK1/PDE4D5 complex to the small GTPase Rap1. *Small Gtpases*. 2011; 2(1):54-61.
78. Mamidipudi V, Chang BY, Harte RA, Lee KC, Cartwright CA. RACK1 inhibits the serum- and anchorage-independent growth of v-Src transformed cells. *FEBS Lett*. 2004a; 567(2-3): 321-26.
79. Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA. RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol*. 2004b; 24(15): 6788-98.
80. Mamidipudi V, Dhillon NK, Parman T, Miller LD, Lee KC, Cartwright CA. RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints. *Oncogene*. 2007; 26(20): 2914-24.
81. Cox EA, Bennin D, Doan AT, O'Toole T, Huttenlocher A. RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell*. 2003; 14(2): 658-69.
82. Swaminathan G, Cartwright CA. Rack1 promotes epithelial cell-cell adhesion by regulating E-cadherin endocytosis. *Oncogene*. 2012; 31(3): 376-89.
83. Mamidipudi V, Cartwright CA. A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. *Oncogene*. 2009; 28(50): 4421-33.
84. Robles MS, Boyault C, Knutti D, Padmanabhan K, Weitz CJ. Identification of RACK1 and protein kinase Calpha as integral components of the mammalian circadian clock. *Science*. 2010; 327(5964): 463-66.

85. Kiely PA, Baillie GS, Barrett R, Buckley DA, Adams DR, Houslay MD, et al. Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 2009; 284(30): 20263-74.
86. Sklan EH, Podoly E, Soreq H. RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2006; 78(2): 117-34.
87. Onishi I, Lin PJ, Diering GH, Williams WP, Numata M. RACK1 associates with NHE5 in focal adhesions and positively regulates the transporter activity. *Cell Signal.* 2007; 19(1): 194-203.
88. Liliental J, Chang DD. Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem.* 1998; 273(4): 2379-83.
89. Lo SH. Focal adhesions: what's new inside. *Dev Biol.* 2006; 294(2): 280-91.
90. Guan JL. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB Life.* 2010; 62(4): 268-76.
91. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006; 18(5): 516-23.
92. Buensuceso CS, Obergfell A, Soriani A, Eto K, Kiosses WB, Arias-Salgado EG et al. Regulation of outside-in signaling in platelets by integrin-associated protein kinase C beta. *J Biol Chem.* 2005; 280(2): 644-53.
93. Wehner P, Shnitsar I, Urlaub H, Borchers A. RACK1 is a novel interaction partner of PTK7 that is required for neural tube closure. *Development.* 2011; 138(7): 1321-27.
94. Zakrzewicz A, Hecker M, Marsh LM, Kwapiszewska G, Nejman B, Long L et al. Receptor for activated C-kinase 1, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2007; 115(23): 2957-68.
95. Padanilam BJ. Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia. *Kidney Int.* 2001; 59(5): 1789-97.
96. Calura E, Cagnin S, Raffaello A, Laveder P, Lanfranchi G, Romualdi C. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC Genomics.* 2008; 9: 630.
97. Mor I, Sklan EH, Podoly E, Pick M, Kirschner M, Yogev L et al. Acetylcholinesterase-R increases germ cell apoptosis but enhances sperm motility. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(2): 479-95.
98. Mourtada-Maarabouni M, Kirkham L, Farzaneh F, Williams GT. Functional expression cloning reveals a central role for the receptor for activated protein kinase C 1 (RACK1) in T cell apoptosis. *J Leukoc Biol.* 2005; 78(2): 503-14.
99. Li JJ, Xie D. RACK1, a versatile hub in cancer. *Oncogene.* 2015; 34(15): 1890-8.
100. Al-Reefy S, Mokbel K. The role of RACK1 as an independent prognostic indicator in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010; 123(3): 911, author reply 912.

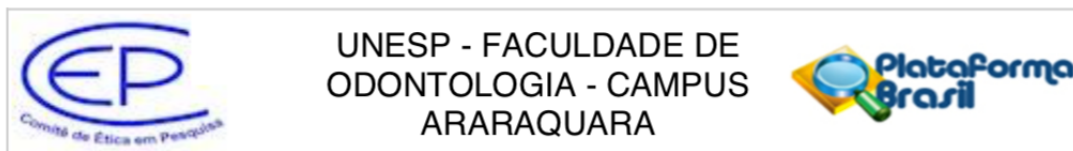
101. Cao XX, Xu JD, Liu XL, Xu JW, Wang WJ, Li QQ et al. RACK1: a superior independent predictor for poor clinical outcome in breast cancer. *Int J Cancer*. 2010; 127(5): 1172-9.
102. Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, Kageyama T, Satoh Y, Shinichiron R et al. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas. *Lung Cancer*. 2010; 69(1): 54-9.
103. Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, L'Helgoualc'h A, Théret N. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *J Biol Chem*. 2008; 283(38): 26000-9.
104. Egidy G, Julé S, Bossé P, Bernex F, Geffrotin C, Vincent-Naulleau S et al. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation. *Mol Cancer*. 2008; 7: 34.
105. Lopez-Bergami P, Huang C, Goydos JS, Yip D, Bar-Eli M, Herlyn M et al. Rewired ERK-JNK signaling pathways in melanoma. *Cancer Cell*. 2007; 11(5): 447-60.
106. Hellberg CB, Burden-Gulley SM, Pietz GE, Brady-Kalnay SM: Expression of the receptor protein-tyrosine phosphatase, PTPmu, restores E-cadherin- dependent adhesion in human prostate carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2002; 277(13): 11165-73.
107. Williams SR, Son DS, Terranova PF. Protein kinase C delta is activated in mouse ovarian surface epithelial cancer cells by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Toxicology*. 2004; 195(1):1-17.
108. Hennig EE, Butruk E, Ostrowski J. RACK1 protein interacts with Helicobacter pylori VacA cytotoxin: the yeast two-hybrid approach. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289(1): 103-10.
109. Berns H, Humar R, Hengerer B, Kiefer FN, Battegay EJ. RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas. *FASEB J*. 2000; 14(15): 2549-58.
110. Amir S, Wang R, Simons JW, Mabjeesh NJ. SEPT9_v1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1 by preventing its RACK1-mediated degradation. *J Biol Chem*. 2009; 284(17): 11142-51.
111. Amir S, Golan M, Mabjeesh NJ. Targeted knockdown of SEPT9_v1 inhibits tumor growth and angiogenesis of human prostate cancer cells concomitant with disruption of hypoxia-inducible factor-1 pathway. *Mol Cancer Res*. 2010; 8(5): 643-52.
112. Buensuceso CS, Woodside D, Huff JL, Plopper GE, O'Toole TE. The WD protein Rack1 mediates protein kinase C and integrin-dependent cell migration. *J Cell Sci*. 2001; 114(Pt 9): 1691-8.
113. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015; 65(2): 87–108.
114. Panzarella V, Pizzo G, Calvino F, Compilato D, Colella G, Campisi G. Diagnostic delay in oral squamous cell carcinoma: the role of cognitive and psychological variables. *Internat J Oral Sci*. 2014; 6(1): 39–45.

115. Liu S, Liu J, Wang J, Cheng J, Zeng X, Ji N et al. RACK1 is an organ-specific prognostic predictor in OSCC. *Oral Oncol.* 2018; 76: 22-6.
116. Gouvea AF, Moreira AE, Reis RR, de Almeida OP, Lopes MA. Proliferative verrucous leukoplakia, squamous cell carcinoma and axillary metastasis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(5): e704-8.
117. Li J, Guo Y, Feng X, Wang Z, Wang Y, Deng P et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1): a regulator for migration and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(4): 563-71.
118. Zhang X, Liu N, Ma D, Liu L, Jiang L, Zhou Y et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) promotes the progression of OSCC via the AKT/mTOR pathway. *Int J Oncol.* 2016; 49(2): 539-48.
119. Franke TF. PI3K/Akt: Getting it right matters. *Oncogene.* 2008; 27(50): 6473-88.
120. Wu Y, Wang Y, Sun Y, Zhang L, Wang D, Ren F et al. RACK1 promotes Bax oligomerization and dissociates the interaction of Bax and Bcl-XL. *Cell Signal.* 2010; 22(10):1495-1501
121. Rebelo MAB, Rebelo Vieira JM, Pereira JV, Quadros LN, Vettore MV. Does oral health influence school performance and school attendance? a systematic review and meta-analysis. *Int J Paediatr Dent.* 2018 Oct 26. doi: 10.1111/ipd.12441.
122. Javidi H, Vettore M, Benson PE. Does orthodontic treatment before the age of 18 years improve oral health-related quality of life? a systematic review and meta-analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2017; 151(4): 644-55.
123. GRADEpro GDT: GRADEpro guideline development tool [Software]. Hamilton: McMaster University; 2020. [acesso em 3 jul. 2023]. Disponível em: gardepro.org.
124. 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.
125. Lafuente Ibáñez de Mendoza I, Lorenzo Pouso AI, Aguirre Urizar JM, Barba Montero C, Blanco Carrón A, Gándara Vila P et al. Malignant development of proliferative verrucous/multifocal leukoplakia: a critical systematic review, meta-analysis and proposal of diagnostic criteria. *J Oral Pathol Med.* 2022; 51(1): 30-8.
126. 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):1896-1907.
127. Dan H, Liu S, Liu J, Liu D, Yin F, Wei Z et al. RACK1 promotes cancer progression by increasing the M2/M1 macrophage ratio via the NF-κB pathway in oral squamous cell carcinoma. *Mol Oncol.* 2020; 14(4): 795-807.
128. R SA, B N P, Hegde U, K U, G S, G K, et al. Inter- and intra-observer variability in diagnosis of oral dysplasia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; 18(12): 3251-54.

129. Zhu L, Chen W, Li G, Chen H, Liao W, Zhang L et al. Upregulated RACK1 attenuates gastric cancer cell growth and epithelial-mesenchymal transition via suppressing Wnt/ β -catenin signaling. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 4795–805.
130. Wang A, Yang W, Li Y, Zhang Y, Zhou J, Zhang R et al. CPNE1 promotes non-small cell lung cancer progression by interacting with RACK1 via the MET signaling pathway. *Cell Commun Signal.* 2022; 20(1): 16.
131. Yu Z, Jiang X, Qin L, Deng H, Wang J, Ren W et al. A novel UBE2T inhibitor suppresses Wnt/ β -catenin signaling hyperactivation and gastric cancer progression by blocking RACK1 ubiquitination. *Oncogene.* 2021; 40(5): 1027-42.
132. Wang J, Chen S. RACK1 promotes miR-302b/c/d-3p expression and inhibits CCNO expression to induce cell apoptosis in cervical squamous cell carcinoma. *Cancer Cell Int.* 2020; 20: 385.
133. Zhang L, Lv Y, Rong Y, Chen W, Fang Y, Mao W et al. Downregulated expression of RACK1 results in pancreatic cancer growth and metastasis. *Onco Targets Ther.* 2019; 12: 1007-20.
134. Xu L, Li J, Tursun M, Hai Y, Tursun H, Mamtimin B et al. Receptor for activated C kinase 1 promotes cervical cancer lymph node metastasis via the glycolysis-dependent AKT/mTOR signaling. *Int J Oncol.* 2022; 61(1): 83.
135. Lacombe J, Mangé A, Jarlier M, Bascoul-Mollevi C, Rouanet P, Lamy PJ et al. Identification and validation of new autoantibodies for the diagnosis of DCIS and node negative early-stage breast cancers. *Int J Cancer.* 2013; 132(5): 1105-13.
136. Lacombe J, Mangé A, Bougnoux AC, Prassas I, Solassol J. A multiparametric serum marker panel as a complementary test to mammography for the diagnosis of node-negative early-stage breast cancer and DCIS in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23(9): 1834-42.
137. Myklebust LM, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Receptor for activated protein C kinase 1 (RACK1) is overexpressed in papillary thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2011; 21(11): 1217-25.
138. Guo Y, Wang W, Wang J, Feng J, Wang Q, Jin J et al. Receptor for activated C kinase 1 promotes hepatocellular carcinoma growth by enhancing mitogen-activated protein kinase kinase 7 activity. *Hepatology.* 2013; 57(1): 140-51.
139. Xiao T, Zhu W, Huang W, Lu SS, Li XH, Xiao ZQ et al. RACK1 promotes tumorigenicity of colon cancer by inducing cell autophagy. *Cell Death Dis.* 2018; 9(12): 1148.
140. Li X, Xiao Y, Fan S, Xiao M, Wang X, Chen X et al. RACK1 overexpression associates with pancreatic ductal adenocarcinoma growth and poor prognosis. *Exp Mol Pathol.* 2016; 101(2): 176-86.
141. Zhou T, Lv X, Guo X, Ruan B, Liu D, Ding R et al. RACK1 modulates apoptosis induced by sorafenib in HCC cells by interfering with the IRE1/XBP1 axis. *Oncol Rep.* 2015; 33(6): 3006-14.
142. Zhong X, Li M, Nie B, Wu F, Zhang L, Wang E et al. Overexpressions of RACK1 and CD147 associated with poor prognosis in stage T1 pulmonary adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013; 20(3): 1044-52.

143. Han H, Wang D, Yang M, Wang S. High expression of RACK1 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2018; 15(2): 2073-78.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Participação do receptor da quinase C 1 ativada (RACK1) no potencial de transformação maligna de leucoplasia oral e leucoplasia verrucosa proliferativa

Pesquisador: Andreia Bufalino

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 39015420.2.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.538.852

Apresentação do Projeto:

As desordens potencialmente malignas orais (DPMOs) são apresentações clínicas que apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer na cavidade oral. Atualmente é bem estabelecido que as DPMOs com displasia epitelial são mais frequentemente associadas a transformação maligna para carcinoma espinocelular oral (CECO). A leucoplasia oral (LO) e leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) são DPMOs caracterizadas por placas brancas não raspáveis que microscopicamente revelam lesões epiteliais sem ou com graus variados de displasia. Mesmo compartilhando vários aspectos clínicos e microscópicos, a LVP mostra um comportamento clínico mais agressivo e persistente, com taxa de transformação maligna maior que 70% e sem resposta às modalidades terapêuticas atualmente aplicadas. Além disso, a LVP parece não compartilhar os fatores de risco presentes na LO como o tabaco e o álcool, os quais estão associados ao CECO. Os diferentes graus de displasias identificados nestas DPMOs são utilizados atualmente como preditores de risco para transformação maligna, no entanto diversos estudos mostram que este não é um preditor fiel. Dentro deste contexto, devido a inexistência de características clínicas e microscópicas específicas destas DPMOs nas fases iniciais, se faz necessário investigar um potencial biomarcador que seja efetivo no prognóstico, diagnóstico diferencial e precoce entre os casos de LO e LVP e que futuramente possa ser um alvo terapêutico. Com base na literatura e em achados prévios obtidos pelo nosso grupo, este trabalho tem como objetivo verificar o nível de expressão imuno-histoquímica e gênica de RACK1 nas lesões de LO e

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



Continuação do Parecer: 4.538.852

LVP e seu papel no potencial de malignização destas DPMOs. Assim, o estudo será dividido em duas etapas. Na etapa 1 será realizada a análise imuno-histoquímica de RACK1 utilizando blocos parafinados de 90 pacientes divididos em 3 grupos. O grupo 1 será composto por blocos parafinados oriundos de 30 pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LO, o grupo 2 será composto por blocos parafinados obtidos em diferentes momentos do acompanhamento clínico de 30 pacientes com diagnóstico clínico-patológico de LVP e o grupo 3 será composto por blocos parafinados de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) de 30 pacientes, o qual será o grupo controle. Todas as amostras incluídas no grupo 1 e 2 deverão revelar microscopicamente aspectos que variam desde hiperqueratose sem ou com variados graus de displasia (leve, moderada ou severa). Serão excluídos os blocos que revelarem microscopicamente um carcinoma espinocelular ou carcinoma verrucoso. Todos os blocos parafinados e os respectivos prontuários clínicos dos pacientes a serem utilizados neste estudo serão oriundos do Serviço de Medicina Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara. As reações de imuno-histoquímica serão realizadas por meio da técnica de estraptavidina-biotina-peroxidase, utilizando o anticorpo que identifique o RACK1. Posteriormente, será realizada a quantificação das células positivas e a intensidade de marcação e os dados serão tabulados. Na etapa 2 será avaliada a expressão gênica de RACK1 por meio de qRT-PCR. Neste experimento serão utilizadas amostras congeladas obtidas de biópsias incisionais/excisionais de pacientes com diagnóstico clínico de LO e de LVP. O grupo 1 será composto por 10 amostras congeladas de LO, o grupo 2 será composto por 10 amostras congeladas de LVP e o grupo 3 será o grupo controle, o qual será composto por 10 amostras congeladas de HFI. 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:

O objetivo deste trabalho será comparar por meio de imuno-histoquímica a expressão do RACK1 em lesões de LO e LVP, avaliar a expressão gênica de RACK1 nestas duas DPMOs, analisar a associação dessa expressão com os parâmetros clínico-patológicos e com o potencial de transformação maligna de LO e LVP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: No caso dos blocos parafinados, a pesquisa utilizara amostras já coletadas de pacientes atendidos em nossa clínica de Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de Araraquara, apresentando risco mínimo, uma vez que a pesquisa manterá a privacidade dos indivíduos, bem como evitara exposição dos dados dos prontuários já que apenas os pesquisadores terão acesso às informações. Além disso, todos os procedimentos serão sempre realizados de acordo com as

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

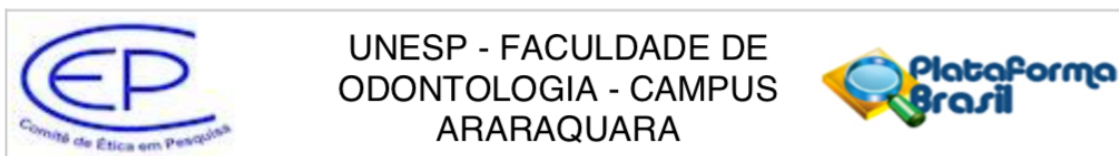
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.538.852

normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Em relação as amostras de tecido congelado que serão obtidas de biópsia incisional/excisional, os riscos relativos que podem ocorrer são hemorragias, infecções e má cicatrização da região biopsiada. Para minimizar tais riscos os procedimentos serão realizados com assepsia e anti-sepsia rigorosa, técnica adequada e os pacientes irão receber todas as orientações necessárias para um pós-operatório adequado. Ressaltamos que os procedimentos para

realização de biopsias também serão realizados de acordo com as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Para os blocos parafinados que serão utilizados para análise imuno-histoquímica não haverá benefício direto aos pacientes neste estudo, uma vez que os pacientes já foram tratados e diagnosticados. Para os pacientes submetidos à biópsia incisional/excisional, o material obtido será dividido ao meio sendo uma parte enviada para análise histopatológica e a outra parte congelada. Estes pacientes terão como benefício o diagnóstico final da lesão biopsiada após confirmação histopatológica e então poderão receber o tratamento, conduta e tempo de acompanhamento adequados. Além disso, na literatura não há estudos que correlacionam a expressão de RACK1 com as desordens potencialmente malignas, sendo assim, será um estudo que poderá compreender melhor o comportamento clínico destas lesões e correlacionar com o seu potencial de malignidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenho do Estudo: estudo nacional, observacional retrospectivo

Apoio Financeiro: Financiamento próprio

Início do estudo: março/2021; Término: setembro/2024.

Critério de Inclusão: Blocos parafinados oriundos de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de leucoplasia oral, leucoplasia verrucosa proliferativa e hiperplasia fibrosa inflamatória. Além disso, os blocos parafinados deverão apresentar qualidade e quantidade suficientes para a realização de novos cortes histológicos com 5 mm de espessura. Amostras de tecido congelado que serão obtidas a partir de biópsia incisional/excisional de lesões com diagnóstico clínico de leucoplasia oral, leucoplasia verrucosa proliferativa e hiperplasia fibrosa inflamatória.

Critério de Exclusão: Serão excluídos os blocos parafinados que revelarem microscopicamente um carcinoma in situ, carcinoma espinocelular ou carcinoma verrucoso, assim como, serão excluídos os blocos com qualidade e quantidade insuficientes para a realização das análises do estudo

Tamanho da Amostra no Brasil: 120

Haverá uso de fontes secundárias de dados: dados epidemiológicos básicos tais como idade,

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

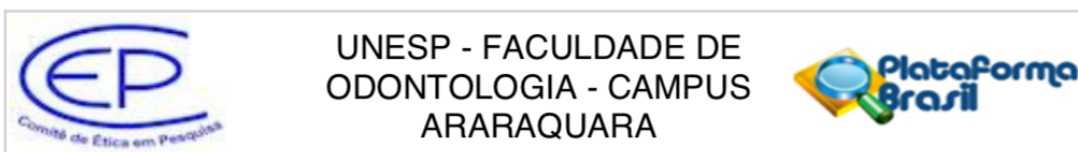
UF: SP

Telefone: (16)3301-6459

Município: ARARAQUARA

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.538.852

gênero, hábitos como consumo de tabaco e álcool, tamanho da lesão, sítio bucal acometido e histórico de transformação maligna

Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco, visto que o estudo trata de amostras que podem evoluir para uma neoplasia maligna, mais comumente para carcinoma espinocelular, alguns pacientes podem vir a óbito. Além disso, pode haver a impossibilidade de contato com alguns pacientes e nestes casos então, não será possível aplicar o TCLE. Para os pacientes que conseguirmos contato, além de serem contactados para assinatura do TCLE, também vamos solicitar a assinatura do termo de doação do material para possível utilização do mesmo em pesquisas futuras.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados: Termo de doação de amostras biológicas para utilização em pesquisas futuras; Orçamento detalhado; Cronograma; Projeto detalhado; TCLE; Solicitação de dispensa do TCLE com a devida justificativa; Autorização para uso de prontuários e para acesso aos blocos parafinados; Autorização para uso do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia; Declaração do pesquisador; e Folha de rosto.

Recomendações:

Vide campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As seguintes pendências foram atendidas:

- 1- Faltam acentos em muitas palavras no formulário da PB, favor adequar. PARCIALMENTE ATENDIDA
- 2- O nome de uma das participantes da equipe da pesquisa não está no arquivo do projeto completo nomeado "PROJETO_CEP", favor adequar. ATENDIDA
- 3- Nos critérios de inclusão, no formulário da PB, favor mencionar os critérios para blocos parafinados de HFI, que farão parte do grupo controle, bem como para as amostras congeladas. ATENDIDA
- 4- Ajustar o cronograma na PB e no documento nomeado "CRONOGRAMA_DE_DESENVOLVIMENTO_DA_PESQUISA_camila_doc.docx" para início do estudo em março/2021. ATENDIDA
- 5- O pesquisador menciona que o apoio financeiro será do CNPq, mas não apresenta informações que comprovem o referido apoio. Por favor, apresentar comprovação ou informar que será

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

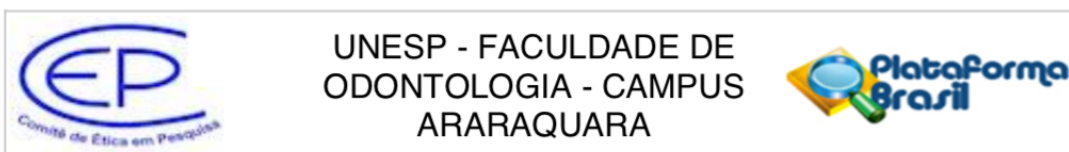
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.538.852

financiamento próprio. ATENDIDA

6- No item Riscos da PB, informar que os procedimentos para biópsia também serão realizados de acordo com as normas da Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo APROVADO em reunião de 11 de fevereiro de 2021.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1632486.pdf	08/01/2021 12:07:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_CEPalterado.docx	08/01/2021 12:01:55	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
Brochura Pesquisa	PROJETO_CEP.docx	08/01/2021 11:53:56	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CARTARESPOSTA04012021.docx	08/01/2021 11:50:55	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTODETALHADONOVO.pdf	08/01/2021 11:49:57	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMADESENVOLVIMENTO_DA_PESQUISA_camila_doc08012021.docx	08/01/2021 11:49:08	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	NORMAS2020.docx	07/10/2020 15:16:38	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_laboratorio_Camila.pdf	07/10/2020 15:09:16	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_2020.pdf	28/09/2020 11:51:47	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_doacao_amstras.docx	28/09/2020 11:40:25	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

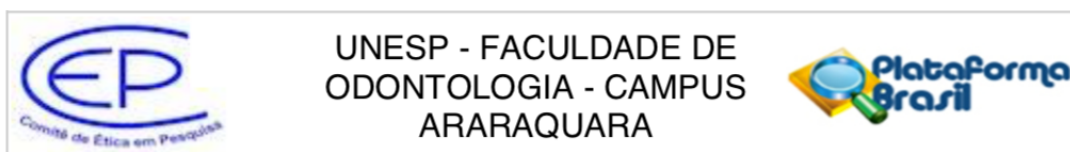
CEP: 14.801-903

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

E-mail: cep@foar.unesp.br



Continuação do Parecer: 4.538.852

Folha de Rosto	Folha_de_rosto_2020.pdf	28/09/2020 11:00:24	CAMILA DE OLIVEIRA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AUTORIZACAO_BLOCO_PRONTUARIOS.docx	16/09/2020 21:25:31	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	16/09/2020 21:21:25	CAMILA DE OLIVEIRA BARBEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 12 de Fevereiro de 2021

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: HUMAITA 1680

Bairro: CENTRO

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-6459

CEP: 14.801-903

E-mail: cep@foar.unesp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de até 2 anos após a data de defesa

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 11 de setembro de 2023.