



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSION DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE
GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS DA APOPTOSE (BCL-2 E BAX) EM QUEILITES
ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR**

LUANA SAMARA BALDUINO DE SENA

CAMPINA GRANDE/ PB

2017

LUANA SAMARA BALDUINO DE SENA

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSION DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS DA APOPTOSE (BCL-2 E BAX) EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

CAMPINA GRANDE/ PB

2017

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da Dissertação.

S474a Sena, Luana Samara Balduino de.
Análise da imunoexpressão da isoforma alfa do receptor de Glicocorticoide e de proteínas da Apoptose (BCL-2 e BAX) em Queilites actínicas e Carcinomas de células escamosas de lábio inferior [manuscrito] / Luana Samara Balduino de Sena. - 2017
106 p. : il. colorido.
Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.
"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia - CCBS."
1. Queilite actínica. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Neoplasias labiais. 4. Apoptose. 5. Imuno-histoquímica.
21. ed. CDD 616.994 31

LUANA SAMARA BALDUINO DE SENA

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSIONÃO DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE
GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS DA APOPTOSE (BCL-2 E BAX) EM QUEILITES
ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR**

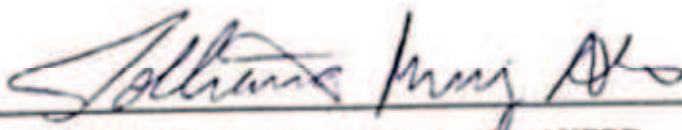
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em 12/06/2017

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Aline Carvalho Batista/ UFG
Membro Titular (1º Examinador)



Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves/ UEPB
Membro Titular (2º Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB
Membro Titular (Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus;

Aos meus pais Luciano Alves de Sena e Sandra Valéria Balduino de Sena;

Aos meus irmãos Katia Mayane Balduino Torres e Heberton Richer Balduino de Sena;

A minha sobrinha Camila Balduino Torres;

Ao meu noivo Jamesson de Macêdo Andrade;

Que sempre estiveram ao meu lado, em todas as minhas escolhas e decisões,

Permitindo que eu permanecesse firme para conquistar meus ideais,

E, forte na FÉ que é o “firme fundamento das coisas que se esperam,

E a prova das coisas que não se vêem!”

Hebreus (11:1)

“Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu!

É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu!

Não é sobre tudo que o teu dinheiro é capaz de comprar,

E sim sobre cada momento, sorriso a se compartilhar...”

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, meu querido orientador! Como já falei para o senhor, se eu fosse expressar o quanto sou grata não conseguiria terminar de agradecer! Mas de forma verdadeira e singela, te agradeço por todo ensinamento e conhecimento científico transmitido, por toda paciência e por sempre me compreender nos momentos de dificuldade, por sua disponibilidade em sempre querer ajudar, pela confiança em mim depositada, amizade, pelos momentos de descontração, generosidade e dedicação! Tenho muito orgulho de ser sua orientanda, de fazer parte do *Team Nonaka*! Muito obrigada pela brilhante orientação, pelo empenho dedicado na realização desta pesquisa e na minha formação como futura professora, assim como pelas correções e sugestões que sempre foram muito relevantes e construtivas, me fazendo crescer ao longo desses dois anos de mestrado. Não poderia deixar de agradecer por ter se tornado para mim, mais que um orientador, um grande amigo! Muito obrigada!!!

Ao meu noivo **Jamesson de Macêdo Andrade**, que sempre esteve comigo durante esta caminhada em todos os momentos que necessitei, por todo amor dedicado, pelo incentivo constante, sempre me fazendo seguir em frente, por sempre me apoiar e compreender com tamanha paciência, muito obrigada por tudo, eu te amo!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus, Ele é o meu refúgio, a minha fortaleza, meu porto seguro e Nele confio! Tu és o meu **Deus**; graças te darei! Ó meu Deus, eu te exaltarei! Deem graças ao Senhor, porque Ele é bom; O seu amor dura para sempre!

Aos meus pais **Luciano Alves de Sena e Sandra Valéria Balduino de Sena**, que são os meus anjos aqui na Terra, minha fonte de inspiração, esforço, dedicação, amor e bondade, minha fortaleza e base, que sempre estiveram comigo me apoiando, incentivando, torcendo e vibrando com minhas conquistas! Tudo o que sou devo a vocês!

Aos meus irmãos **Katia Mayane Balduino Torres e Heberton Richer Balduino de Sena**, que sempre me ajudaram e apoiaram em todos os momentos, me fortalecendo a cada obstáculo e me fazendo seguir em frente! À minha sobrinha **Camila Balduino Torres** por todo amor e carinho!

Aos meus colegas de turma **Ana Priscila e Ana Helena, Diego Romário, Érick Tássio, Ernani Canuto, Fabianna Medeiros, Isabella Jardelino, José de Alencar, Laio Dutra, Liege Helena, Luan Éverton, Niebla Melo, Rodolfo Carolino, Sheila Dornelas e Tomás Lúcio**, em ordem alfabética, mas não em ordem de importância, pois todos vocês foram e sempre serão essenciais e que cada amizade conquistada tem grande valor, crescemos e aprendemos juntos, criamos um sentimento único: o de ajudar! Essa turma é especial!

Aos meus sogros **Fernando e Eunice**, pelo apoio e incentivo que me foram dados.

A professora **Dra. Pollianna Muniz Alves**, por toda ajuda, apoio, considerações e sugestões, contribuindo para o desenvolvimento desta pesquisa e para meu crescimento como pessoa e futura professora. Por sempre estar disposta a ajudar e sempre querer o nosso melhor! Pelo exemplo de amor pelo que faz!

A professora **Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira** pelas contribuições dadas para o desenvolvimento deste trabalho, pelas sugestões que engradeceram o trabalho realizado, pela disposição em ajudar! Seu apoio foi fundamental para a conclusão desta pesquisa!

A professora **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro**, pela amizade e carinho contruídos durante esse tempo! Pelo exemplo de simplicidade e generosidade que encanta a todos em sua volta!

A professora **Msc. Maria Luiza de Sousa Lopes**, pela disposição em ajudar e contribuir com o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do PPGO e colaboradores (Prof. **Dr. Alessandro Cavalcanti**, Profa. **Dra. Ana Cláudia**, Prof. **Dr. Cassiano Nonaka**, Profa. **Dra. Daliana Queiroga**, Profa. **Dra. Daniela Pita**, Profa. **Dra. Edja Maria**, Profa. **Dra. Jozinete Vieira**, Prof. **Dr. Kenio Lima**, Prof. **Dr. Manuel Gordón**, Profa. **Dra. Maria Helena**, Profa. **Dra. Patrícia Bento**, Profa. **Dra. Pollianna Muniz**, Profa. **Dra. Renata Rocha**, Profa. **Dra. Rilva Suely**, Prof. **Dr. Sérgio d'Ávila** e Prof. **Dr. Yuri Cavalcanti**), que com vontade, sabedoria e competência compartilharam conosco seus conhecimentos tornando-nos eternos aprendizes da ciência!

Aos professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação Profa. **Dra. Aline Carvalho Batista**; Profa. **Dra. Pollianna Muniz Alves**, Prof. **Dr. Elismauro Francisco de Mendonça**; Prof. **Dr. Manuel Antônio Gordón-Nuñez**, pelo aceite em participar desta banca, pelo empenho e dedicação na leitura deste trabalho e desde já, pelas contribuições que serão apresentadas!

A técnica do laboratório e grande amiga **Ana Luzia**! Tem pessoas que Deus coloca em nossas vidas, para nos mostrar que anjos existem, e com você foi assim! **Aninha**, muito obrigada por toda ajuda, carinho e irmandade! Tua fé é encantadora, és grandiosa, sempre querendo e disposta a ajudar, como já lhe disse várias vezes, você é mais que uma amiga, és como uma irmã! Amigo é aquela parte da família que a gente pode escolher!

A técnica do laboratório **Denize Núbia**, por todo auxílio, pela amizade e carinho que sempre teve comigo, além das boas risadas e momentos de descontração, você tem um jeito que é só seu!

A minha querida amiga **Ana Priscila Lira de Farias Freitas**, muito obrigada pela sua amizade, pelo carinho e cumplicidade, és um ser iluminado! Teu exemplo de mãe e guerreira é encantador! Você que ajuda sem querer nada em troca, Deus te abençoe sempre! Tua amizade é muito importante para mim!

Ao meu querido amigo **Luan Éverton Galdino Barnabé**, minha dupla sertaneja, ou quem sabe *rock and roll*, obrigada pela tua amizade e cuidado, por sempre me ajudar e por tornar os dias mais divertidos e engraçados! “Um bom amigo supera todas as riquezas do mundo”. Obrigada por fazer parte dessa etapa tão importante na minha vida, levarei sua amizade/irmandade sempre comigo!

A todos os amigos que fizeram e fazem parte do laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB: **Jamesson, Hellen, Matheus, Livia, Marayza, Geisa, Fabianna**, por todo aprendizado, sempre contribuindo e deixando suas marcas e transmitindo seus conhecimentos adquiridos aos que chegam! Aos colegas **Rodolfo, Robeci, Amanda e Emanuene**, pela construção do conhecimento em conjunto e pela amizade. Aos alunos de Iniciação Científica: **Diego Silva, Vinicius Rodrigues, Deyse Kelly, Marina Amaral**, pelos bons momentos compartilhados!

Aos amigos que sempre me apoiaram e torceram por mim: **Ana Cláudia, Nelmara Sousa, Dayane Siqueira, Diogo Andrade, Mayanna Freitas, Thamyres Simões, Anny Mirene e Rodolfo Amador**.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, especialmente **Pâmella** pela amizade e sempre ajudar em todos os momentos que precisei, **Dione e Alexandre**, pelo exemplo de dedicação e esforço!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta pesquisa! Muito obrigada!

RESUMO

RESUMO

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna, causada pela exposição crônica à radiação ultravioleta (UV). A transformação dessa lesão em um carcinoma de células escamosas (CCE) pode ser observada em até 20% dos casos, mas os eventos moleculares envolvidos neste processo ainda não são completamente conhecidos. No desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas, investigações têm destacado o papel do receptor de glicocorticoide (RG). Através da modulação de diversos processos, com destaque para a apoptose, a alta expressão da isoforma α do RG (RG α) tem sido associada a indicadores de comportamento biológico menos agressivo em neoplasias. Apesar dessas evidências e do eventual uso de corticoides no tratamento das QAs, pouco se sabe sobre a expressão da RG α nestas lesões e sobre uma eventual participação no desenvolvimento dos CCEs de lábio inferior. Dessa forma, este estudo se propôs a avaliar a expressão da RG α e de proteínas envolvidas na apoptose (BCL-2 e BAX) em casos de QA, com riscos variados de transformação maligna, e de CCE de lábio inferior. A amostra foi constituída por 22 casos de QA e 44 casos de CCE (22 com metástase nodal regional e 22 sem metástase nodal regional). Dados clínicos (sexo e idade dos pacientes, tamanho do tumor, metástase regional, metástase à distância e estágio clínico) foram coletados a partir de fichas de requisição de biópsia e de prontuários médicos. No estudo morfológico, as QAs foram classificadas de acordo com o risco de transformação maligna (KUJAN et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008) e o grau histopatológico de malignidade dos CCEs foi avaliado no *front* de invasão tumoral (BRYNE et al., 1992). Para o estudo imunoistoquímico, sob aumento de 400 \times , foram estabelecidos os percentuais de células epiteliais com positividade nuclear (RG α) e citoplasmática (RG α , BCL-2 e BAX) em 5 campos microscópicos do revestimento epitelial das QAs e em 10 campos do *front* de invasão dos CCEs. Todos os casos de QA e de CCE revelaram expressão da RG α , tanto em núcleo como no citoplasma, com altos percentuais de imunopositividade. Comparadas aos CCEs, as QAs revelaram menor percentual de positividade citoplasmática ($p < 0,05$) e maior percentual de expressão nuclear para RG α ($p < 0,05$). As QAs também exibiram, em comparação aos CCEs, menor percentual de células positivas para BAX ($p < 0,001$) e maior expressão de BCL-2 ($p < 0,001$). Não foram identificadas diferenças significativas nas expressões de RG α (citoplasma e núcleo), BCL-2 e BAX em relação à presença ou ausência de metástase regional nos CCEs ($p > 0,05$). Considerando os parâmetros clinicopatológicos das lesões, houve diferença significativa apenas na expressão citoplasmática da RG α em relação ao grau histopatológico de malignidade dos CCEs ($p = 0,036$), caracterizada pela tendência para maior positividade nas lesões com alto grau quando comparadas às lesões de baixo grau. Foram constatados percentuais de positividade significativamente maiores para BAX em relação à BCL-2, tanto para QAs como para CCEs, independente das características clinicopatológicas das lesões ($p < 0,05$). Foi identificada fraca correlação positiva, estatisticamente significativa, apenas para as expressões citoplasmáticas e nucleares da RG α nos CCEs ($r = 0,406$; $p = 0,006$). Os resultados do presente estudo sugerem um papel importante para a RG α na carcinogênese labial, o qual parece não estar primariamente relacionado à modulação das expressões das proteínas BCL-2 e BAX. A progressão tumoral nos CCEs de lábio inferior, no entanto, pode não estar relacionada à expressão da RG α .

Palavras-chave: Queilite; Carcinoma de células escamosas; Neoplasias labiais; Receptores de glucocorticoides; Apoptose; Imunoistoquímica.

ABSTRACT

ABSTRACT

Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant disorder caused by ultraviolet (UV) radiation. The transformation of this lesion into a squamous cell carcinoma (SCC) can be observed in up to 20% of cases, but the molecular events involved in this process are not yet fully understood. In the development and progression of malignant neoplasms, investigations have highlighted the role of the glucocorticoid receptor (GR). Through the modulation of several processes, with emphasis on apoptosis, the high expression of the GR α isoform (GR α) has been associated with less aggressive biological behavior indicators in neoplasms. Despite this evidence and the possible use of corticosteroids in the treatment of ACs, little is known about the expression of GR α in these lesions and on a possible participation in the development of lower lip SCCs. Thus, this study aimed to evaluate the expression of GR α and proteins involved in apoptosis (BCL-2 and BAX) in cases of AC, with varied risks of malignant transformation, and of lower lip SCC. The sample consisted of 22 cases of AC and 44 cases of SCC (22 with regional nodal metastasis and 22 without regional nodal metastasis). Clinical data (sex and age of patients, tumor size, regional metastasis, distant metastasis and clinical stage) were collected from biopsy request forms and medical records. In the morphological study, the ACs were classified according to the risk of malignant transformation (KUJAN et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008) and the histopathological grade of malignancy of the SCC was evaluated on the tumor invasion front (BRYNE et al., 1992). For the immunohistochemical study, under 400 \times magnification, the percentages of epithelial cells with nuclear (GR α) and cytoplasmic (GR α , BCL-2 and BAX) were established in 5 microscopic fields of the epithelial lining of the ACs and in 10 fields of the SCC invasion front. All cases of AC and SCC revealed expression of GR α , both in nucleus and cytoplasm, with high percentages of immunopositivity. Compared to the SCCs, the ACs showed a lower percentage of cytoplasmic positivity ($p < 0.05$) and a higher percentage of nuclear expression for GR α ($p < 0.05$). The ACs also exhibited, compared to SCCs, lower percentages of BAX positive cells ($p < 0.001$) and higher BCL-2 expression ($p < 0.001$). No significant differences were identified in the expression of GR α (cytoplasm and nucleus), BCL-2 and BAX in relation to the presence or absence of regional metastasis in SCCs ($p > 0.05$). Considering the clinicopathological parameters of the lesions, there was a significant difference only for the cytoplasmic expression of the GR α in relation to the histopathological grade of malignancy of the SCC ($p = 0.036$), characterized by the tendency to higher positivity in the lesions with a high grade when compared to the low grade lesions. Significantly higher positivity percentages for BAX in relation to BCL-2 were found, both for ACs and SCCs, regardless of the clinicopathological characteristics of the lesions ($p < 0.05$). There was a weak positive correlation, statistically significant, only for the cytoplasmic and nuclear expressions of the GR α in the SCCs ($r = 0.406$; $p = 0.006$). The results of the present study suggest an important role for GR α in lip carcinogenesis, which does not appear to be primarily related to the modulation of the expression of BCL-2 and BAX proteins. Tumor progression in lower lip SCCs, however, may not be related to GR α expression.

Keywords: Cheilitis; Squamous cell carcinoma; Lip neoplasms; Glucocorticoid receptor; Apoptosis; Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACTH:** Do inglês *adrenocorticotropic hormone*, traduzido como hormônio adrenocorticotrópico.
- APAF-1:** Do inglês *Apoptotic peptidase activating factor 1*, traduzido como fator de ativação de apoptose 1.
- BAD:** Do inglês *BCL-2-associated death promoter*, refere-se à proteína BAD.
- BAK:** Do inglês *BCL-2 homologous antagonist killer*, refere-se à proteína BAK.
- BAX:** Do inglês *BCL-2-associated X protein*, refere-se à proteína BAX.
- BAX α :** Do inglês *alpha isoform BCL-2-associated X protein*, refere-se à proteína BAX α .
- BAX β :** Do inglês *beta isoform BCL-2-associated X protein*, refere-se à proteína BAX β .
- BCL-2:** Do inglês *B-cell lymphoma 2*, refere-se à proteína BCL-2.
- BCL-xL:** Do inglês *B-cell lymphoma-extra large*, refere-se à proteína BCL-xL.
- BCL-W:** Do inglês *BCL2 like 2*, refere-se à proteína BCL-W.
- BH:** Domínios homólogos de BCL-2.
- BH3:** Domínio homólogo de BCL-2 de ligação 3.
- BIM:** Do inglês *BCL2 like 11*, refere-se à proteína BIM.
- CA:** Califórnia (Estado norte-americano).
- CCE:** Carcinoma de células escamosas.
- COX-2:** Do inglês *Ciclooxigenase-2*, traduzido como ciclooxigenase-2
- DAB:** Do inglês *3,3'-diaminobenzidine*, traduzido como 3,3'-diaminobenzidina.
- DNA:** Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico.
- FasL:** Do inglês *Fas ligand*, traduzido como ligante de Fas.
- FasR:** Do inglês *Fas cell surface death receptor*, traduzido como receptor de Fas.
- HHA:** Hipotálamo-hipófise-adrenal.
- HLC:** Hormônio liberador de corticotropina.
- HSP:** Do inglês *heat shock protein*, traduzido como proteína de choque térmico.
- IL-6:** Do inglês *interleukyne-6*, traduzido como interleucina-6.
- IL-8:** Do inglês *interleukyne-8*, traduzido como interleucina-8.
- I κ B α :** Do inglês *nuclear factor kappa B inhibitor alpha*, traduzido como inibidor alfa do fator nuclear kappa B.
- kDa:** Do inglês *kilodalton*, traduzido como quilodalton.

- Ki-67:** Do inglês *marker of proliferation Ki-67*, refere-se à proteína Ki-67.
- Mcl-1:** Do inglês *myeloid cell leukemia 1*, refere-se à proteína MCL-1.
- MDM2:** Do inglês *mouse double minute 2*, refere-se à proteína MDM2.
- MAPKs:** Do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*, traduzido como quinases ativadas por mitógenos.
- MMP2:** Do inglês *matrix metalloproteinase 2*, traduzido como metaloproteinase de matriz 2.
- MO:** Missouri (Estado norte-americano).
- NR3C1:** Do inglês *nuclear receptor subfamily 3 group C member 1*, traduzido como receptor nuclear da subfamília 3, grupo C, membro 1.
- OMS:** Organização Mundial da Saúde.
- PAI-1:** Do inglês *Inhibitor type I plasminogen activator*, traduzido como inibidor tipo I do ativador de plasminogênio.
- P21:** Do inglês *protein p21*, refere-se a proteína 21.
- P27:** Do inglês *protein p27*, refere-se a proteína 27.
- P53:** Do inglês *protein p53*, refere-se a proteína P53.
- PB:** Paraíba (Estado brasileiro).
- PUMA:** Do inglês *p53 upregulated modulator of apoptosis*, refere-se a proteína PUMA.
- QA:** Queilite actínica.
- RG α :** Do inglês *alpha isoform of the glucocorticoid receptor*, traduzido como isoforma alfa do receptor de glicocorticoide.
- RG β :** Do inglês *beta isoform of the glucocorticoid receptor*, traduzido como isoforma beta do receptor de glicocorticoide.
- RG γ :** Do inglês *gamma isoform of the glucocorticoid receptor*, traduzido como isoforma gama do receptor de glicocorticoide.
- RGP:** Do inglês *p isoform of the glucocorticoid receptor*, traduzido como isoforma P do receptor de glicocorticoide.
- RGA:** Do inglês *a isoform of the glucocorticoid receptor*, traduzido como isoforma A do receptor de glicocorticoide.
- RG:** Do inglês *glucocorticoid receptor*, traduzido como receptor de glicocorticoide.
- RNA m :** Do inglês *messenger ribonucleic acid*, traduzido como ácido ribonucleico mensageiro.

- SGHM:** Sistema de gradação histopatológica de malignidade.
- SUMO-1:** Do inglês *small ubiquitin-like modifier 1*, refere-se à proteína SUMO-1.
- tBID:** Do inglês *truncated BH3 interacting domain death agonist*, refere-se à proteína BID truncada.
- TNF α :** Do inglês *tumor necrosis factor alpha*, traduzido como fator de necrose tumoral alfa.
- TNFR1:** Do inglês *tumor necrosis factor receptor 1*, traduzido como receptor 1 do fator de necrose tumoral.
- TNM:** Tumor-Nodo-Metástase.
- TRAIL:** Do inglês *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*, refere-se à proteína TRAIL.
- TRIS-HCl:** Do inglês *Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride*, traduzido como Tris-hidroximetil-aminometano cloridrato.
- TWEAK:** Do inglês *TNF-related weak inducer of apoptosis*, refere-se à proteína TWEAK.
- UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba.
- USA:** Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América.
- UV:** Ultravioleta.
- VEGF:** Do inglês *vascular endothelial growth factor*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.....	40
Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.....	41
Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	42
Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	42
Quadro 5. Alterações arquiteturais e citológicas utilizadas para o diagnóstico da displasia epitelial e sua classificação de acordo com o grau.....	43
Quadro 6. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne et al. (1992).....	44
Quadro 7. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	47
Figura 1. Ações genômica e não genômica do RG. Após a adesão de glicocorticoides, o RG citoplasmático sofre mudança de conformação (ativação), torna-se hiperfosforilado (P), se dissocia do heterocomplexo (HsP90, p23) e transloca para o núcleo, onde regula a expressão gênica. O RG também pode se associar a outras proteínas citoplasmáticas (MAPKs, quinases e fosfolipases) e modular canais iônicos e a fluidez das membranas.....	31
Figura 2. Expressão citoplasmática e nuclear (núcleos positivos indicados por setas vermelhas e núcleos negativos por setas amarelas) da RG α em QA de baixo risco (A) e em CCE de baixo grau (B) (Reveal, 400 \times). Positividade citoplasmática para BAX em QA de alto risco (C) (Reveal, 200 \times) e em CCE de alto grau (D) (Reveal, 400 \times). Imunoexpressão citoplasmática de BCL-2 em QA de alto risco (E) e em CCE de alto grau (F) (Reveal, 400 \times).....	71
Figura 3. BoxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-RG α (citoplasma [A] e núcleo [B]), anti-BAX (C) e anti-BCL-2 (D) em QAs e CCEs de lábio inferior metastáticos e não metastáticos.....	72

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	67
Tabela 2. Distribuição absoluta e relativa dos casos de QA e CCE de lábio inferior de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.....	68
Tabela 3. Mediana e distribuição quartílica (Q_{25} - Q_{75}) para os percentuais de células imunopositivas para RGA, BAX e BCL-2 em QAs e CCEs de lábio inferior, e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	69
Tabela 4. Distribuição dos casos [n (%)] de QA e CCE de lábio inferior de acordo com os postos para os percentuais de células imunopositivas para BCL-2 e BAX, e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	70

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	27
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3	METODOLOGIA	39
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	39
3.2	TIPO DE ESTUDO.....	39
3.3	POPULAÇÃO.....	39
3.4	AMOSTRA.....	39
3.4.1	Critérios de inclusão	40
3.4.2	Critérios de exclusão	40
3.5	VARIÁVEIS.....	40
3.6	ESTUDO CLÍNICO.....	41
3.7	ESTUDO MORFOLÓGICO.....	43
3.8	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	45
3.8.1	Método imunoistoquímico	45
3.8.2	Análise imunoistoquímica	47
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4	ARTIGO	50
4.1	APRESENTAÇÃO.....	50
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	51
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXOS	85
	APÊNDICES	103

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A radiação ultravioleta (UV) induz diversas alterações genótípicas e fenotípicas nas células epiteliais que resultam em atrofia epitelial e redução da capacidade fotoprotetora do lábio. Tais alterações podem culminar com o desenvolvimento de desordens potencialmente malignas nesta região anatômica, com destaque para a queilite actínica (QA) (RON, 1998; SAVAGE; MCKAY; FAULKNER, 2010).

A QA é uma lesão relativamente comum, observada em adultos de meia-idade e idosos de pele clara (VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI, 2013) expostos cronicamente à radiação UV, como pescadores e trabalhadores rurais e da construção civil (MARTINS-FILHO et al., 2011; DE OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2014). No Brasil, estudos revelam que a prevalência dessa lesão nessas populações varia de 11,4% a 39,6% (JUNQUEIRA et al. 2011; DE SOUZA LUCENA et al., 2012; DE OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2014; MIRANDA FERREIRA et al., 2016).

São identificadas duas formas de apresentação clínica da QA: aguda e crônica. A QA aguda, menos comum, é observada em pessoas expostas excessivamente ao sol por um curto período de tempo. Nesses casos, os indivíduos podem apresentar lábios avermelhados, exibindo edema, além de formação de bolhas e crostas. A QA crônica, comum em pessoas expostas cronicamente à radiação UV, é caracterizada por atrofia e perda de elasticidade do vermelhão do lábio, com formação de placas ceratóticas que se sobrepõem irregularmente em áreas eritematosas, além da presença de úlceras e fissuras (DE SOUZA LUCENA et al., 2012; DE SANTANA SARMENTO et al., 2014). Um aspecto relevante é a perda da separação clara entre a semimucosa labial e a pele (MARKOPOULOS et al., 2004).

Histopatologicamente, as QAs apresentam alterações tanto no tecido epitelial como no conjuntivo. O tecido epitelial revela áreas de atrofia e hiperqueratose e pode apresentar graus variados de displasia (DOS SANTOS et al., 2003; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008). As displasias epiteliais se caracterizam pela associação entre alterações arquiteturais e citológicas (GALE et al., 2005). Embora sejam reconhecidos diversos critérios morfológicos para o diagnóstico da displasia epitelial, com destaque para os elencados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a identificação das manifestações iniciais deste processo constitui um verdadeiro desafio (GALE et al., 2005). Por sua vez, o tecido conjuntivo exibe áreas basofílicas amorfas que resultam da degeneração das fibras colágenas, denominadas de elastose solar, além de vasodilatação e inflamação em graus variados (MARKOPOULOS et al., 2004; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

Diversos métodos terapêuticos são utilizados para o tratamento das QAs, que podem ser tanto por procedimentos cirúrgicos, como não cirúrgicos. Dentre os cirúrgicos, citam-se a crioterapia, eletrocirurgia, ablação por laser de dióxido de carbono e vermelhectomia cirúrgica. Os tratamentos conservadores incluem, retinoides tópicos, creme de 5-fluorouracilo, creme de imiquimod, terapia fotodinâmica, anti-inflamatórios e corticoides (LEITE et al., 2003; SAVAGE; MCKAY; FAULKNER, 2010; LOPES et al., 2015; DUTRA et al., 2016). Embora aproximadamente 16,9% a 20% dos casos de QA sofram transformação para um carcinoma de células escamosas (CCE) (MARKOPOULOS et al., 2004; OLIVEIRA ALVES et al., 2014), os eventos moleculares envolvidos neste processo ainda não são completamente conhecidos. Particularmente sob uma perspectiva morfológica, a displasia epitelial tem sido considerada um parâmetro importante para estimar a transformação maligna dessas lesões (WARNAKULASURIYA et al., 2008; PILATI et al., 2017).

O CCE de lábio representa aproximadamente 20% a 30% dos carcinomas orais (MARUCCIA et al., 2012; VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI; 2013), acomete principalmente homens, entre a quinta e sexta década de vida, e apresenta como principal fator etiológico a exposição excessiva a radiação UV (MARKOPOULOS et al., 2004; MARTINS-FILHO et al., 2011; VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI, 2013; SARMENTO et al., 2013). Clinicamente, o CCE de lábio se apresenta, na maioria dos casos, como uma lesão ulcerada de margens elevadas. Mais raramente, pode se apresentar como uma lesão exofítica de margens relativamente definidas (VIVIANO; ADDAMO; LORENZINI, 2013). Por ser uma região mais exposta ao sol, o lábio inferior é afetado com maior frequência quando comparado ao lábio superior (BATISTA et al., 2010). Porém, nesta última localização, sugere-se que os CCEs tenham um comportamento biológico mais agressivo (HASSON, 2008).

Com a finalidade de se planejar o tratamento, definir o prognóstico e estimar a sobrevida de pacientes com neoplasias malignas, foi desenvolvido o sistema de classificação Tumor-Nodo-Metástase (TNM) dos tumores malignos. Nesse sistema, as lesões são classificadas quanto ao tamanho e extensão do tumor (T), ao envolvimento de linfonodos regionais (N) e quanto à presença de metástase à distância (M). Por meio da avaliação dos três parâmetros descritos anteriormente, pode-se estabelecer o estadiamento clínico da doença, que pode variar dos estágios I ao IV (SOBIN; WITTEKIND, 2002; MARZOUK; SCHOFIELD, 2011).

Histopatologicamente, o CCE de lábio é caracterizado por ninhos ou cordões invasivos de células escamosas neoplásicas. Individualmente, as células neoplásicas exibem citoplasma

eosinofílico abundante e núcleos volumosos, geralmente hipercromáticos. É possível constatar alterações na relação núcleo/ citoplasma, além de graus variados de pleomorfismo celular e nuclear. Tipicamente, podem ser evidenciadas áreas de disqueratose, bem como formação de pérolas de ceratina (NEVILLE et al., 2009; VIEIRA et al., 2012).

Os sistemas de gradação histopatológica de malignidade (SGHM) foram criados na tentativa de auxiliar na determinação do comportamento biológico dos CCEs orais (LIMA et al., 2014). Dentre esses sistemas, destaca-se o proposto por Bryne et al. (1992), que avalia quatro parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, intensidade do infiltrado inflamatório e padrão de invasão. Essa análise é realizada no *front* de invasão tumoral, por constituir uma área onde ocorrem vários eventos moleculares importantes, como angiogênese, perdas e ganhos de moléculas de adesão e secreção de enzimas proteolíticas (BRYNE, 1998; LIMA et al., 2014). Esses parâmetros são classificados em escores que, após somados, resultam em um escore final de malignidade (BRYNE et al., 1992).

Embora o lábio inferior seja uma localização anatômica de fácil visualização, favorecendo a identificação precoce do CCE, alguns casos são diagnosticados apenas em estágios mais avançados, quando já desenvolveram metástases regionais (VUKADINOVIC et al., 2007; SOUZA et al., 2011). Nestes casos, estudos sugerem que apenas 25% a 50% dos pacientes alcançam uma sobrevida de 5 anos, caracterizando um pior prognóstico (BILKAY et al., 2003; KORNEVS et al., 2005; SARGERAN et al., 2009; GUTIÉRREZ-PASCUAL et al., 2012). Tais constatações, em conjunto com o potencial de transformação maligna das QAs, ressaltam a importância de uma melhor compreensão dos eventos moleculares envolvidos na carcinogênese labial.

Pesquisas têm demonstrado que o desenvolvimento das QAs, bem como sua eventual progressão para o CCE, pode envolver alterações moleculares em processos diversos, como a divisão, o crescimento e a diferenciação celulares (DOS SANTOS et al., 2003; XAVIER et al., 2009; BIANCO et al., 2015; CORREA et al., 2015; LOPES et al., 2015), o reparo do DNA (SARMENTO et al., 2013; SARMENTO et al., 2016; LOPES et al., 2016), os mecanismos de evasão das respostas imunes (GONÇALVES et al., 2016) e a apoptose (MARTÍNEZ et al., 2005; OLIVEIRA ALVES et al., 2014; LEITE et al., 2016).

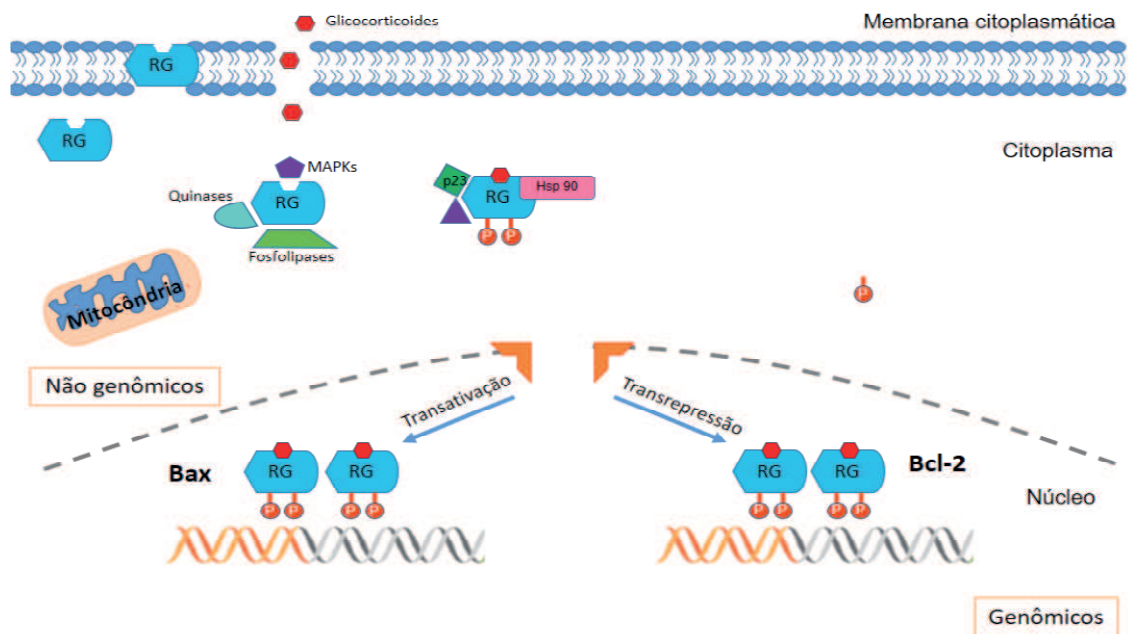
No contexto do desenvolvimento e da progressão de neoplasias malignas, estudos têm destacado o papel do receptor de glicocorticoide (RG) (SCHLOSSMACHER et al., 2013; BERDEL et al., 2014; ABDULJABBAR et al., 2015). Neste sentido, a alta expressão do RG tem sido associada a indicadores de comportamento biológico menos agressivo, como menor tamanho tumoral, estágios clínicos iniciais, menor grau de pleomorfismo celular e menor

índice mitótico (BUXANT; ENGOHAN-ALOGHE; NOËL, 2010; YAKIREVICH et al., 2011; ABDULJABBAR et al., 2015). Além disso, pesquisas têm relatado maiores taxas de sobrevida geral e de sobrevida livre de doença para pacientes cujos tumores exibem alta expressão do RG (LU et al., 2006; YAKIREVICH et al., 2011). Apesar dessas evidências e da utilização, em alguns casos, de corticosteroides no tratamento das QAs (LOPES et al., 2015), pouco se sabe sobre a expressão do RG nestas lesões e sobre uma eventual participação no desenvolvimento dos CCEs de lábio inferior.

Os glicocorticoides, hormônios essenciais para a vida, representam os produtos das glândulas adrenais e são sintetizados na zona fasciculada. A produção adrenal de glicocorticoides é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (OAKLEY, CIDLOWSKI; 2013; CAIN et al., 2015). O hipotálamo responde aos sinais neuronais, endócrinos e de liberação de citocinas, através da secreção de hormônio liberador de corticotropina (HLC), que estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) da hipófise anterior (WEBSTER et al., 2002; CAIN et al., 2015). O ACTH induz a síntese de glicocorticoides nas glândulas adrenais e posterior secreção na circulação (CAIN et al., 2015). Os glicocorticoides regulam uma infinidade de processos fisiológicos, incluindo metabolismo intermediário, função imune, crescimento esquelético, função cardiovascular, reprodução e cognição (SAPOLSKY; ROMERO; MUNCK, 2000). Em um *feedback* negativo clássico, os glicocorticoides agem sobre o hipotálamo e hipófise, para inibir a produção e liberação de HLC e ACTH (OAKLEY, CIDLOWSKI; 2013; CAIN et al., 2015).

O RG constitui um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição dependentes de ligantes. Após a ativação pelo seu ligante, esse receptor pode atuar na expressão de genes-alvo específicos (SCHAAF; CIDLOWSKI, 2002). O gene RG humano, também conhecido como *NR3C1*, situa-se no cromossomo 5q31-32 (HOLLENBERG et al., 1985; FRANCKE; FOELLMER, 1989; RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013). Estudos identificaram 9 formas alternativas do éxon 1 (1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1H, 1I e 1J) que provavelmente são responsáveis pela expressão tecido-específica do RG. Por sua vez, o *splicing* alternativo no éxon 9 gera dois transcritos de RNAm altamente homólogos, que resultam na produção de duas isoformas de RG, denominadas RG α e RG β . Ambas as isoformas contêm os éxons de 1 a 8, diferindo apenas no éxon 9 (9 α e 9 β , respectivamente) (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013; CAIN; CIDLOWSKI, 2015). Cinco isoformas do receptor foram descritas (RG α , RG β , RG γ , RG-P e RG-A), sendo a isoforma alfa a principal responsável pela atividade de transcrição mediada pelo RG (GOVINDAN et al., 1985; LU; CIDLOWSKI, 2005).

Na ausência do ligante hormonal, o RG se encontra inativo no citoplasma, formando complexos oligoméricos com proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs permitem que o receptor adquira uma conformação tridimensional adequada para a sua ligação ao hormônio. Este, livre no plasma e no interstício, induz alterações conformacionais que permitem a dissociação de tais proteínas. Quando glicocorticoides lipofílicos se difundem através da membrana plasmática e ligam-se ao receptor, este induz um rearranjo, levando a homodimerização e a translocação nuclear. O complexo ligante-receptor, em seguida, é transportado ativamente até o núcleo, onde interage com o DNA (ação genômica) ou com outras proteínas implicadas no processo de transcrição (ação não genômica). Uma vez no



interior do núcleo, o RG pode regular a transcrição gênica positiva ou negativamente (RAMAMOORTHY; CIDLOWSKI, 2013; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; CAIN; CIDLOWSKI, 2015) (FIGURA 1).

Figura 1. Ações genômica e não genômica do RG. Após a adesão de glicocorticoides, o RG citoplasmático sofre mudança de conformação (ativação), torna-se hiperfosforilado (P), se dissocia do heterocomplexo (Hsp90, p23) e transloca para o núcleo, onde regula a expressão gênica. O RG também pode se associar a outras proteínas citoplasmáticas (MAPKs, quinases e fosfolipases) e modular canais iônicos e a fluidez das membranas.

Através de suas ações genômicas e não genômicas, o RG é capaz de modular diversos processos, com destaque para a apoptose (SCHLOSSMACHER et al., 2013). Os mecanismos pelos quais o RG é capaz de modular a morte celular programada permanecem pouco compreendidos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a superexpressão do RG é capaz de aumentar a morte de células tumorais (SOMMER et al., 2007; SOMMER et al., 2010), possivelmente por inibir a expressão das proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-xL (SOMMER et al., 2010; KAY et al., 2011). Por outro lado, resultados de investigações *in vitro* revelaram que a superexpressão do RG seria capaz de estimular a apoptose através do aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAD (SOMMER et al., 2007).

A apoptose é uma via de morte celular programada e estritamente regulada, na qual as células ativam enzimas que degradam seu próprio DNA, além de proteínas nucleares e citoplasmáticas. Existem duas vias distintas para conduzir a apoptose: a via extrínseca e a intrínseca (VANGESTEL et al., 2009; VOGLER, 2014). A via extrínseca, também chamada de via do receptor de morte, é iniciada através da estimulação de receptores transmembranares por ligantes específicos (FasR, FasL, TNFR1, TNF α , TRAIL, TWEAK) (BURZ et al., 2009). Uma vez ativado, o receptor se liga a proteínas do domínio de morte associado ao Fas ou ao TNFR1 para formar um complexo de indução de morte, com o recrutamento de pró-caspase 8. Em seguida, a pró-caspase 8 é ativada proteoliticamente e inicia a via das caspases, ativando adicionalmente proteínas efetoras, tais como as caspases 3 e 7 (BURZ et al., 2009).

Por outro lado, a via intrínseca envolve o controle de pró-enzimas mitocondriais. As mitocôndrias contêm uma série de proteínas que são capazes de induzir a apoptose, com destaque para o citocromo c. A sobrevivência ou a morte celular é definida pela permeabilidade da mitocôndria, que é controlada por uma família de mais de 20 proteínas classificadas quanto a presença de domínios homólogos de BCL-2 (BH) (UM, 2016; HENNESSY, 2016). Quando ocorrem alterações celulares, os sensores BH3 ativam as proteínas BAX e BAK, que se inserem na membrana mitocondrial e formam canais por onde o citocromo c e outras proteínas extravasam para o citosol. No citosol, o citocromo c atua como cofator de ativação da Apaf-1, ligando-se também à pró-caspase 9 e formando um apoptossomo. Este inicia a ativação da pró-caspase 9 que, por sua vez, ativa a caspase 3, o que resulta na morte celular e, finalmente, fragmentação nuclear (WANG; YOULE, 2009).

A família BCL-2 inclui proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-xL, BCL-w e Mcl-1) e pró-apoptóticas (BAX e BAK) (UM, 2016; HENNESSY, 2016). A proteína BCL-2 humana foi descrita pela primeira vez em 1984 por Tsujimoto et al., em linfomas não-Hodgkin. É uma proteína de 26 kDa, componente do envelope nuclear, retículo endoplasmático e membrana

mitocondrial externa (TSUJIMOTO; CROCE, 1986). Particularmente nesta última, BCL-2 se localiza na hélice $\alpha 9$ da membrana mitocondrial, com sua dobra globular exposta no citoplasma. Estudos revelam que a proteína BCL-2 pode inibir a apoptose por meio de dois mecanismos: ligação a proteínas pró-apoptóticas que apresentam apenas o domínio BH3 (BIM, PUMA e tBID) e, alternativamente, através da ligação direta a proteínas efetoras pró-apoptóticas, com destaque para o BAX (UM, 2016; HENNESSY, 2016; BIRKINSHAW; CZABOTAR, 2017).

A BAX é uma proteína da família BCL-2 que pode estimular o processo de morte celular pela formação de dímeros (homo ou heterodímeros) com outras proteínas da família (HASNAN et al., 2010). São reconhecidas várias isoformas dessa proteína, principalmente geradas por *splicing* alternativo do protótipo BAX α entre os éxons 1 e 3 ou entre os éxons 5 e 6 (OLTVAI et al., 1993; CARTRON et al., 2002). Estas isoformas podem existir tanto em células normais como em células cancerosas (CARTRON et al., 2002). A atividade pró-apoptótica das isoformas de BAX pode ser bem preservada, enquanto os domínios BH funcionais de BAX permanecerem intactos (LETAI et al., 2002). Algumas das isoformas da BAX, tais como BAX β , podem alterar a estabilidade de proteínas, enquanto que outras podem alterar a regulação da morte celular. No entanto, a maioria das isoformas de BAX promove a apoptose através da ativação da via mitocondrial (CARTRON et al., 2003; FU et al., 2009).

As células normalmente expressam todas as classes de proteínas BCL-2, e este modelo propõe que as proteínas antiapoptóticas devem inibir continuamente a função de BAX e BAK para garantir a integridade mitocondrial e a sobrevivência celular (CHIPUK; GREEN, 2008). Dado que BAX e BAK são proteínas pró-apoptóticas, espera-se que elas funcionem como supressores de tumores. Por outro lado, pressupõe-se que proteínas antiapoptóticas, tais como BCL-2 e BCL-xL, atuem como oncogenes em células cancerígenas. De acordo com tais pressupostos, os cânceres com alta expressão de BCL-2 ou BCL-xL estariam associados a piores prognósticos, enquanto os tumores com expressão aumentada de BAX poderiam estar associados a desfechos clínicos mais favoráveis (BOSE et al., 2012).

A regulação positiva de moléculas antiapoptóticas e negativa de moléculas pró-apoptóticas pode tornar as células neoplásicas resistentes à morte celular programada (THOMAS et al., 2013). Nesse contexto, tem-se buscado avaliar a expressão dessas proteínas na carcinogênese labial. Martínez et al. (2005) avaliaram a imunexpressão de P53, BAX, BCL-2 e Ki-67 em amostras de lábio normal (n = 7), mucosa oral normal (n = 6) e QAs sem displasia epitelial (n = 13). Observaram um aumento na expressão de P53 nas QAs em comparação ao lábio e mucosa oral ($p < 0,05$), e uma diminuição na expressão de BCL-2 em

relação ao lábio ($p < 0,05$), enquanto que a expressão de BAX permaneceu inalterada ($p > 0,05$). Para os autores, o perfil de expressão das proteínas avaliadas sugere um papel importante para a apoptose na eliminação das células epiteliais danificadas por radiação UV nas QAs, inibindo o processo de transformação maligna destas lesões.

Através da avaliação da imunexpressão da caspase-3 clivada, Leite et al. (2016), avaliaram hiperplasias fibrosas inflamatórias ($n = 40$), leucoplasias orais ($n = 20$), QAs ($n = 20$), CCEs orais ($n = 20$) e CCEs de lábio inferior ($n = 20$). Índices apoptóticos foram significativamente superiores em CCE oral quando comparados aos CCEs de lábio inferior ($p = 0,0015$). Já para as QAs, o índice de área apoptótica foi maior em casos sem displasia epitelial que nos casos com displasia epitelial ($p = 0,036$). Estes resultados apontam um papel distinto da apoptose na carcinogênese intraoral e do lábio inferior, o que pode ser útil, para delinear o prognóstico e o tratamento desses tumores (LEITE et al., 2016).

Ao analisar os achados clínicos, microscópicos e imunoistoquímicos de 37 CCEs de lábio e 54 CCEs orais, Batista et al. (2010) identificaram um padrão distinto entre as lesões estudadas, observando menores tamanhos de tumores (T1-T2) nos CCEs de lábio e maiores tamanhos tumorais (T3-T4) em CCEs orais. Quanto ao perfil morfológico, os CCEs de lábio apresentaram maior número de casos com infiltrado inflamatório intenso na região peritumoral, em comparação aos CCEs orais. A análise do índice proliferativo demonstrou uma porcentagem significativamente maior de células positivas para PCNA e Ki-67 em CCEs orais em comparação aos CCEs de lábio. Por outro lado, os marcadores apoptóticos BCL-2 e BAX apresentaram maiores expressões em CCEs de lábio (T1-T2) quando comparados aos CCEs orais ($p < 0,05$). A relação BCL-2 / BAX foi aumentada em CCEs de lábio em comparação aos CCEs orais, sugerindo que a apoptose é menor em CCEs de lábio, o que pode estar associado ao menor índice de proliferação observado nestes. Dessa forma, os resultados encontrados sugerem características clínicas e microscópicas distintas, que refletem diferentes comportamentos biológicos e prognósticos para essas lesões.

Recentemente, Caldeira et al. (2017) avaliaram a imunexpressão de proteínas do sistema tioredoxina, que desempenha funções antiapoptóticas e está associado ao crescimento celular, e da metalotioneína em amostras de mucosa labial normal ($n = 5$), QAs ($n = 32$) e CCEs de lábio ($n = 20$). Em comparação com as QAs e amostras de mucosa labial normal, os CCEs revelaram maiores níveis de expressão de metalotioneína. Particularmente para a tioredoxina, os autores observaram proporções similares de células com positividade citoplasmática nas QAs e CCEs, sugerindo que este sistema poderia auxiliar na transformação maligna das queilites. De acordo com Caldeira et al. (2017), em razão de seu envolvimento na

manutenção da homeostase celular, especialmente na proteção contra danos induzidos pela radiação UV, as proteínas tioredoxina e metalotioneína poderiam desempenhar um papel importante na carcinogênese labial.

Apesar do importante papel sugerido para a $RG\alpha$ no desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas, até o momento, não há estudos sobre uma possível participação deste receptor na carcinogênese labial (Pubmed Database, acesso em 14/05/2017). A necessidade de investigações neste sentido torna-se ainda mais evidente em decorrência do uso relativamente frequente de corticosteroides tópicos como terapêutica conservadora para as QAs.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar, por meio da imunohistoquímica, a expressão da $RG\alpha$ e de proteínas envolvidas na apoptose (BCL-2 e BAX) em casos de QA, com riscos variados de transformação maligna, e de CCE de lábio inferior.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de displasia epitelial nos casos de QA e classificá-los de acordo com o risco de transformação maligna;
- Determinar o grau histopatológico de malignidade nos casos de CCE de lábio inferior;
- Estabelecer os percentuais de células epiteliais imunopositivas para $RG\alpha$, BCL-2 e BAX nos casos de QA e de CCE de lábio inferior;
- Relacionar as imunoexpressões de $RG\alpha$, BCL-2 e BAX nos CCEs de lábio inferior, com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos regionais, metástase à distância e estágio clínico);
- Relacionar as imunoexpressões de $RG\alpha$, BCL-2 e BAX com o risco de transformação maligna das QAs;
- Estabelecer relações entre a imunoexpressão de $RG\alpha$, BCL-2 e BAX e o grau histopatológico de malignidade dos tumores;
- Correlacionar as imunoexpressões de $RG\alpha$, BCL-2 e BAX, em casos de QA e CCE de lábio inferior.

3 METODOLOGIA

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, e submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 58762016.3.0000.5187 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

3.2 TIPO DE ESTUDO

A pesquisa desenvolvida consistiu em um estudo do tipo transversal, observacional, analítico, caracterizado pela avaliação quantitativa da imunexpressão de $RG\alpha$, BCL-2 e BAX em casos de QA e de CCE de lábio inferior, estabelecendo-se relações com o risco de transformação maligna nas QAs e com parâmetros clinicopatológicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico) nos CCEs de lábio inferior.

3.3 POPULAÇÃO

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de QA diagnosticados e arquivados no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB/ Campina Grande – PB, no período de 2011 a 2016, e todos os casos de CCE de lábio inferior, diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no período de Janeiro de 2006 a Agosto de 2016.

3.4 AMOSTRA

A amostra do estudo foi do tipo não-probabilística, por conveniência, constituída por 22 casos de QA e 44 casos de CCE de lábio inferior, todos emblocados em parafina, obtidos dos serviços anteriormente citados.

3.4.1 Critérios de inclusão

Para o grupo das QAs, foram incluídos na amostra os casos localizados em lábio inferior que apresentaram, ao exame histopatológico, áreas de elastose solar, associadas ou não à displasia epitelial. Para os CCEs de lábio inferior, foram selecionados os casos tratados por excisão cirúrgica, que possibilitaram a avaliação do *front* de invasão tumoral e cujas fichas clínicas dos pacientes contivessem informações relativas à localização anatômica da lesão, ao tamanho do tumor, às metástases linfonodais regionais e à distância e ao estágio clínico.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da pesquisa os casos de QA e CCE de lábio inferior que não apresentaram quantidades suficientes de material biológico para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos. Para o grupo das QAs, foram excluídos os casos tratados previamente com corticoide tópico ou cremes à base de vitaminas. Em relação aos CCEs, foram excluídas as lesões de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia.

3.5 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes, analisadas no presente estudo, estão listadas no Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
RGα (citoplasma)	Imunopositividade para RG α no citoplasma de células epiteliais	Percentual de células positivas
RGα (núcleo)	Imunopositividade para RG α no núcleo de células epiteliais	Percentual de células positivas
BCL-2	Imunopositividade para BCL-2 no citoplasma de células epiteliais	Percentual de células positivas
BAX	Imunopositividade para BAX no citoplasma de células epiteliais	Percentual de células positivas

Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Tipo de lesão	Classificação da lesão considerando os achados histopatológicos	QA CCE
Tamanho do tumor	Tamanho/extensão do tumor primário	T1 T2 T3 T4a ou T4b
Metástase linfonodal Regional	Metástase em linfonodos regionais	N0 N1 N2 N3
Metástase à distância	Presença de metástase à distância	M0 M1
Estágio clínico	Classificação da lesão considerando o tamanho do tumor (T), a metástase regional (N) e a metástase à distância (M)	Estágio 0 Estágio I Estágio II Estágio III Estágio IVa, IVb ou IVc
Grau histopatológico de malignidade (BRYNE et al., 1992)	Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório, na área mais invasiva da lesão	Baixo grau de malignidade Alto grau de malignidade
Risco de transformação maligna (KUJAN et al., 2006; WARNAKULASURIYA et al., 2008)	Classificação histopatológica da QA considerando a ausência/presença e o grau de displasia epitelial	Baixo risco Alto risco

3.6 ESTUDO CLÍNICO

A partir de fichas de requisição de biópsia e de prontuários médicos, foram coletadas informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como sobre a localização anatômica das lesões. Com base nos parâmetros elencados na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), os quais são apresentados nos Quadros 3 e 4, também foram coletadas informações sobre o tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico nos casos de CCE. Os dados coletados foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE A).

Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

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

Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO TNM
Estágio 0	Tis N0 M0
Estágio I	T1 N0 M0
Estágio II	T2 N0 M0
Estágio III	T1, T2 N1 M0
	T3 N0, N1 M0
Estágio IVA	T1, T2, T3 N2 M0
	T4a N0, N1, N2 M0

Estágio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estágio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

3.7 ESTUDO MORFOLÓGICO

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise morfológica.

Para as QAs, os espécimes foram avaliados quanto à presença e ao grau de displasia epitelial, com base nos aspectos arquiteturais e citológicos descritos pela OMS (GALE et al., 2005) (QUADRO 5). Após a análise, seguindo as recomendações propostas pela OMS (GALE et al., 2005) e por Warnakulasuriya et al. (2008), os casos foram classificados como: sem displasia, displasia leve, displasia moderada e displasia severa (QUADRO 5).

Quadro 5. Alterações arquiteturais e citológicas utilizadas para o diagnóstico da displasia epitelial e sua classificação de acordo com o grau.

Alterações avaliadas no diagnóstico da displasia epitelial	
Arquiteturais	Citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal no tamanho do núcleo (anisonucleose)
Perda de polaridade das células basais	Variação anormal na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal no tamanho da célula (anisocitose)
Aumento do número de figuras de mitose	Variação anormal na forma da célula (pleomorfismo celular)
Mitoses superficiais anormais	Aumento da relação núcleo/citoplasma
Disceratose (ceratinização pré-matura em células individuais)	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas de ceratina no interior das cristas	Figuras atípicas de mitose

epiteliais		Aumento do número e tamanho dos nucléolos
		Hipercromatismo
Classificação da displasia epitelial		
Grau	Características	
Leve	Alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio, ou que se estendem ao terço médio, acompanhadas de mínima atipia citológica.	
Moderada	Alterações arquiteturais estendem-se até o terço médio do epitélio, acompanhadas de atipias citológicas em quantidade moderada.	
Severa	Alterações arquiteturais em mais de 2/3 do epitélio, acompanhadas de atipias citológicas, ou que se estendem ao terço médio do epitélio e são acompanhadas por marcantes atipias citológicas.	

Fonte: Adaptado de Gale et al. (2005) e Warnakulasuriya et al. (2008).

Em seguida, utilizando o sistema binário de gradação inicialmente proposto por Kujan et al. (2006), com subseqüentes modificações (WARNAKULASURIYA et al., 2008), os casos sem displasia ou com displasia leve foram classificados como QAs de baixo risco de transformação maligna e os casos com displasia moderada ou severa foram classificados como QAs de alto risco de transformação maligna. Os dados obtidos foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE B).

Para os CCEs de lábio inferior, a análise da gradação histopatológica foi realizada no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (1992) (QUADRO 6). Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final menor ou igual a 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA et al., 2007). Os dados coletados foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE C).

Quadro 6. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne et al. (1992).

Aspectos morfológicos	Escore de malignidade			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Alto (> 50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Pleomorfismo	Pouco (>75%)	Moderado	Intenso (>25<	Extremo (0 a 25% de

Nuclear	de células maduras)	(50 a 75% de células maduras)	50% de células maduras)	células maduras)
Padrão de Invasão	Bordas Infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.8.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*RevealTM*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), utilizando anticorpos primários policlonais anti-RGα e anti-BAX e monoclonal anti-BCL-2.

Como controle positivo para os anticorpos anti-BCL-2 e anti-BAX foram utilizados espécimes de tonsila. Para o anticorpo anti-RGα, o controle positivo foi realizado com cortes histológicos de carcinoma de mama. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

A técnica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

- Lavagem em água corrente (10 minutos)
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (QUADRO 7);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida;
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo secundário (*Complement*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- Passagens rápidas em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (2 trocas);
- Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP Conjugated*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*DAB Substrate system*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA) (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (8 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em resina *Permout®* (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 7. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
RG α *	P20	Santa Cruz Biotechnology	1:200	<i>Trilogy</i> , pH 6,0 <i>Pascal</i> , 121°C, 3 min	60 minutos
BCL-2	124	DAKO	1:150	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos
BAX	A3533	DAKO	1:300	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	<i>Overnight</i>

*Para este anticorpo, a desparafinização, a reidratação e a recuperação antigênica foram realizadas em etapa única, com uso da solução *Trilogy* (Cell MarqueTM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por um examinador previamente treinado. Para as análises imunoistoquímicas, foi realizado o mascaramento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Para todos os anticorpos, foram consideradas apenas as imunoexpressões nas células epiteliais das QAs e dos CCEs de lábio inferior. Destaca-se que, para BCL-2 e BAX, foi avaliada somente a imunorreatividade citoplasmática. Por sua vez, a análise da RG α foi realizada, separadamente, para as expressões citoplasmática e nuclear. Especificamente para os CCEs, as expressões da RG α , do BCL-2 e da BAX foram avaliadas apenas no *front* de invasão tumoral. Nos casos de QA, a imunoexpressão dessas proteínas foi avaliada em toda a extensão do revestimento epitelial.

Para a análise da imunoexpressão da RG α , do BCL-2 e da BAX, foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Moreno-Galindo et al. (2014). Sob aumento de 100 \times , foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade nas QAs e 10 campos de maior imunorreatividade nos CCEs de lábio inferior. Em seguida, para todos os casos, sob aumento de 400 \times , cada um destes campos foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ[®] (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi

realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se, por fim, o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE D).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Para caracterização da amostra, foi realizada estatística descritiva. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico, por sua vez, foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, as comparações das medianas dos percentuais de células imunopositivas para $RG\alpha$, BAX e BCL-2, em relação ao tipo de lesão e aos diversos parâmetros clinicopatológicos, foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Por sua vez, possíveis diferenças entre as imunoexpressões de BAX e BCL-2 foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon. Finalmente, correlações entre as imunoexpressões de $RG\alpha$, BAX e BCL-2 foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman.

Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: “**Imunoexpressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticoide, BCL-2 e BAX em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior**”.

O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de impacto: 1.926, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos são apresentadas no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Imunoexpressão da isoforma alfa do receptor de glicocorticoide, BCL-2 e BAX em queilites actínicas e carcinomas de células escamosas de lábio inferior

Título breve: **Expressão de RG α em queilites e carcinomas de lábio inferior**

Luana Samara Balduino de Sena¹, Éricka Janine Dantas da Silveira², Aline Carvalho Batista³, Elismauro Francisco de Mendonça³, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

¹*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.*

³*Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil.*

Autor correspondente:

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Juvêncio Arruda, s/n – Bodocongó – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-600 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant disorder that can progress to squamous cell carcinoma (SCC), but this process is not fully understood. This study evaluated the immunoexpressions of alpha isoform of glucocorticoid receptor (GR α) and apoptotic proteins (BCL-2 and BAX) in ACs and SCCs of the lower lip.

METHODS: Twenty-two ACs and 44 SCCs (22 with regional nodal metastasis and 22 without regional nodal metastasis) were selected. The percentages of nuclear (GR α) and cytoplasmic (GR α , BCL-2 and BAX) staining in epithelial cells were assessed. Immunohistochemical findings were correlated with clinical (tumor size, regional metastasis and clinical stage) and histopathological parameters (risk of malignant transformation for ACs and histopathological grade of malignancy for SCCs).

RESULTS: Expression of GR α was observed in all cases of AC and SCC, with relatively high percentages of immunopositivity. When compared to SCCs, cases of AC revealed higher nuclear expression and lower cytoplasmic expression of GR α ($p < 0.05$). Regarding clinicopathological parameters, significant differences were observed only for cytoplasmic expression of GR α according to the grade of malignancy in SCCs ($p = 0.036$). Higher expression of BAX compared to BCL-2 was observed in ACs and SCCs, irrespective of the clinicopathological parameters ($p < 0.05$). There was a significant positive correlation between nuclear and cytoplasmic expressions of GR α in SCCs ($p = 0.006$).

CONCLUSIONS: GR α may play an important role in lip carcinogenesis, which does not appear to be primarily related to the modulation of the expressions of BCL-2 and BAX. Tumor progression in SCCs of the lower lip, on the other hand, may not be related to GR α expression.

Keywords: actinic cheilitis; squamous cell carcinoma; glucocorticoid receptors; immunohistochemistry.

Introdução

A queilite actínica (QA) é uma desordem potencialmente maligna do lábio resultante da exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta (UV) (1). No Brasil, estudos revelam que a prevalência da QA em populações expostas cronicamente à radiação UV, como pescadores e trabalhadores rurais e da construção civil, pode variar de 11,4% a 39,6% (1, 2). Além de constituir uma lesão relativamente comum, aproximadamente 16,9% a 20% dos casos de QA sofrem transformação para um carcinoma de células escamosas (CCE) (3, 4).

Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento da QA e a sua eventual progressão para um CCE podem envolver alterações na proliferação e diferenciação celulares (5-7), no reparo do DNA (8), na evasão das respostas imunes (9) e na apoptose (4, 10, 11). Embora as investigações científicas direcionadas à compreensão desse processo tenham se intensificado nos últimos anos, os eventos moleculares envolvidos na carcinogênese labial ainda não são completamente conhecidos.

No desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas, pesquisas têm destacado a participação do receptor de glicocorticoide (RG) (12, 13). Essa proteína, que pertence a uma superfamília de fatores de transcrição dependentes de ligantes (12, 14), se encontra associada a proteínas de choque térmico (HSPs) no citoplasma, em um estado inativo. Ao interagir com glicocorticoides que atravessam a membrana citoplasmática, o RG se dissocia das HSPs e sofre translocação nuclear, onde é capaz de regular a transcrição gênica, tanto positiva como negativamente (14, 15). Dentre as cinco isoformas do RG já identificadas, a alfa (RG α) se apresenta como a principal responsável pelas atividades transcricionais deste receptor (16).

A alta expressão da RG α tem sido associada a indicadores de comportamento biológico menos agressivo em neoplasias malignas, como menor tamanho tumoral, estágios clínicos iniciais e maiores taxas de sobrevida dos pacientes, tanto geral como livre de doença (12, 17-19). Tais resultados têm sido atribuídos à participação da RG α na regulação das respostas imunes e inflamatórias, além da proliferação celular e da apoptose (15, 20, 21). Neste sentido, estudos têm demonstrado que a RG α é capaz de suprimir a expressão de diversas proteínas, como interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e ciclooxigenase-2 (COX-2), bem como estimular a expressão de p27, p21 e do inibidor alfa do fator nuclear kappa B (I κ B α) (15, 20, 22).

Os mecanismos pelos quais o RG é capaz de modular a morte celular programada permanecem pouco compreendidos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a superexpressão da RG estimula a morte de células tumorais (23, 24), possivelmente por inibir a expressão das proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-xL (24). Por outro lado,

investigações *in vitro* revelaram que o RG seria capaz de contribuir para a apoptose através do aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAD (23).

Apesar do importante papel sugerido para a RG α no desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas, até o momento, não há estudos sobre uma possível participação deste receptor na carcinogênese labial (Pubmed Database, acesso em 14/05/2017). A necessidade de investigações neste sentido torna-se ainda mais evidente em decorrência do eventual uso de corticosteroides no tratamento das QAs (7, 25, 26). Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a imunexpressão da RG α e de proteínas envolvidas na apoptose (BCL-2 e BAX) em casos de QA e de CCE de lábio inferior. Pretendeu-se, com este estudo, contribuir com mais esclarecimentos a respeito dos mecanismos envolvidos na carcinogênese labial.

Material e métodos

Espécimes

Vinte e dois casos de QA e 44 casos de CCE de lábio inferior, obtidos no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) / Campina Grande – PB e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, Brasil, respectivamente, foram selecionados para este estudo. Para todos os casos de QA e CCE, foram coletadas informações relativas ao sexo, idade dos pacientes e localização anatômica das lesões. Com base na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (27), também foram coletadas informações sobre o estadiamento clínico nos casos de CCE. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UEPB (Protocolo: 58762016.3.0000.5187).

Análise morfológica

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5 μ m de espessura. Subsequentemente, os cortes histológicos foram corados em hematoxilina e eosina e examinados sob microscopia de luz (*Leica DM 500*, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) por dois avaliadores previamente treinados. Para as QAs, os espécimes foram analisados quanto à presença e ao grau de displasia epitelial, com base nos aspectos arquiteturais e citológicos e nas recomendações propostas pela OMS (28) e por Warnakulasuriya et al. (29). Em sequência, utilizando o sistema binário de gradação proposto por Kujan et al. (30), com subseqüentes modificações (29), os casos sem displasia ou com displasia leve foram classificados como QAs de baixo risco de transformação maligna

e os casos com displasia moderada ou severa foram classificados como QAs de alto risco de transformação maligna.

Para os CCEs, a análise do grau histopatológico de malignidade foi realizada no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (31). Nesse sistema, são atribuídos escores aos seguintes parâmetros: grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório. Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. Com base na metodologia utilizada por Silveira et al. (32), lesões com escore final igual ou menor que 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade e tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade.

Imunoistoquímica

A partir do material fixado em formol e embocado em parafina, cortes com 3 µm de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo a base de organosilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica (Tabela 1). Em sequência, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Após incubação com os anticorpos primários policlonais anti-RG α e anti-BAX e monoclonal anti-BCL-2 (Tabela 1), os cortes teciduais foram lavados com tampão TRIS-HCl e tratados com complexo baseado em polímeros (*RevealTM*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes em diaminobenzidina (*DAB Substrate system, Spring Bioscience Corp.*, Pleasanton, CA, USA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer, desidratados e montados com lamínula. Cortes histológicos de carcinoma de mama foram utilizados como controle positivo para o anticorpo anti-RG α . Por sua vez, cortes histológicos de tonsila foram utilizados como controle positivo para os anticorpos anti-BCL-2 e anti-BAX. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários no protocolo descrito anteriormente.

Análise imunoistoquímica

Os cortes teciduais foram analisados por um examinador previamente treinado, sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sem que o mesmo tivesse conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Para

todos os anticorpos, foram consideradas apenas as imunorexpressões nas células epiteliais das QAs e dos CCEs. Para as proteínas BAX e BCL-2, foi avaliada somente a imunorreatividade citoplasmática. Por sua vez, para $RG\alpha$, as análises foram realizadas separadamente para as expressões citoplasmática e nuclear. Nas QAs, as imunorexpressões de $RG\alpha$, BAX e BCL-2 foram avaliadas em toda a extensão do revestimento epitelial. Nos CCEs, as expressões dessas proteínas foram avaliadas no *front* de invasão tumoral.

Para a análise da expressão da $RG\alpha$, do BCL-2 e da BAX, foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Moreno-Galindo et al. (33). Sob aumento de 100 \times , foram selecionados 5 campos de maior imunorreatividade nas QAs e 10 campos de maior imunorreatividade nos CCEs. Sob aumento de 400 \times , cada um destes campos foi fotomicrografado (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para o programa ImageJ® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Foi realizada a contagem das células imunomarcadas e das células negativas em cada um dos campos fotomicrografados. Em sequência, para cada um dos anticorpos, foi estabelecido o percentual de células positivas em relação ao total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com o estudo imunoistoquímico foram analisados por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual demonstrou ausência de distribuição normal. Dessa forma, o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para $RG\alpha$, BAX e BCL-2, de acordo com o tipo de lesão e os diversos parâmetros clinicopatológicos. Diferenças entre as imunorexpressões de BAX e BCL-2 foram avaliadas com o auxílio do teste não paramétrico de Wilcoxon e, por fim, correlações entre as imunorexpressões de $RG\alpha$, BAX e BCL-2 foram analisadas por meio do teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

Análises clínicas e morfológicas

Os resultados das análises clínicas e morfológicas se encontram sumarizados na Tabela 2. Dezoito (81,8%) dos 22 casos de QA foram diagnosticados em indivíduos do sexo

masculino, com uma proporção homem/ mulher de 4,5:1. A idade dos pacientes variou de 38 a 72 anos, com uma média de $54,6 \pm 10,4$ anos. A análise do risco de transformação maligna revelou uma distribuição similar entre casos de baixo risco (50,0%) e de alto risco (50,0%).

No grupo dos CCEs, 32 (72,7%) dos 44 casos foram diagnosticados em indivíduos do sexo masculino, com uma proporção homem/ mulher de 2,7:1. A idade dos pacientes variou de 26 a 97 anos, com uma média de $66,2 \pm 17,0$ anos. Em relação ao tamanho do tumor e à metástase nodal regional, foi observado um predomínio de casos classificados como T2 (56,8%) e N0 (50,0%). Metástases à distância foram constatadas em apenas dois casos (4,5%). A análise do estadiamento clínico revelou maior frequência de casos classificados nos estágios III (34,1%) e II (31,8%). Por sua vez, a avaliação do grau histopatológico de malignidade revelou maior frequência de casos com alto grau (65,9%).

Análises imunoistoquímicas

Imunoexpressão de RGα

Foi observada positividade citoplasmática para RGα em todos os casos de QA (mediana; 96,5%; variação: 27,2% – 100,0%) e de CCE (mediana: 100,0%; variação: 0,7% – 100,0%) avaliados no presente estudo (Fig. 2A,B). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou percentuais significativamente menores de expressão citoplasmática para RGα nas QAs, quando comparadas aos CCEs sem metástase nodal regional ($p = 0,005$) e com metástase nodal regional ($p = 0,001$) (Fig. 3A). Nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão citoplasmática dessa proteína foi observada entre CCEs com e sem metástase nodal regional ($p = 0,901$). Em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCEs de lábio inferior, foi observada diferença estatisticamente significativa nos percentuais de positividade para RGα apenas para o grau histopatológico de malignidade dos CCEs (Tabela 3). Lesões com alto grau de malignidade apresentaram uma tendência à maior expressão dessa proteína quando comparadas às lesões de baixo grau ($p = 0,036$).

Expressão nuclear de RGα foi observada em todos os casos de QA (mediana: 89,9%; variação: 7,7% – 99,9%) e de CCE (mediana: 64,5%; variação: 1,4% – 98,1%) analisados no presente estudo (Fig. 2A,B). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou percentuais significativamente maiores de positividade nuclear para RGα nas QAs, quando comparadas aos CCEs sem metástase nodal regional ($p = 0,002$) e com metástase nodal regional ($p = 0,013$) (Fig. 3B). Quando comparados os CCEs com e sem metástase nodal regional, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão nuclear de RGα ($p =$

0,796). De forma similar, nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão nuclear dessa proteína foi observada em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCEs ($p > 0,05$; Tabela 3).

Imunoexpressão de BAX e BCL-2

Todos os casos de QA (mediana; 80,0%; variação: 7,7% – 98,8%) e de CCE (mediana: 99,9%; variação: 25,6% – 100,0%) avaliados revelaram positividade para BAX (Fig. 2C,D). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou percentuais significativamente menores de expressão dessa proteína nas QAs, quando comparadas aos CCEs sem metástase nodal regional ($p < 0,001$) e com metástase nodal regional ($p < 0,001$) (Fig. 3C). Nenhuma diferença estatisticamente significativa na expressão citoplasmática de BAX foi observada entre CCEs com e sem metástase nodal regional ($p = 0,950$). Em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCEs de lábio inferior, não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas nos percentuais de positividade para BAX ($p > 0,05$; Tabela 3).

Positividade para BCL-2 foi identificada em 21 (95,4%) dos 22 casos de QA (mediana: 19,7%; variação: 0,0% – 69,0%) e em 31 (70,4%) dos 44 casos de CCE (mediana: 1,0%; variação: 0,0% – 99,4%) analisados no presente estudo (Fig. 2E,F). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou percentuais significativamente maiores de positividade para BCL-2 nas QAs, quando comparadas aos CCEs sem metástase nodal regional ($p < 0,001$) e com metástase nodal regional ($p < 0,001$) (Fig. 3D). Quando comparados os CCEs com e sem metástase nodal regional, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de BCL-2 ($p = 0,626$). Nenhuma diferença significativa na expressão dessa proteína foi observada em relação aos diversos parâmetros clinicopatológicos das QAs e CCEs ($p > 0,05$; Tabela 3).

O teste de postos sinalizados de Wilcoxon revelou percentuais de imunopositividade significativamente maiores para BAX em relação à BCL-2, tanto para QAs como para CCEs, independente das características clinicopatológicas dessas lesões ($p < 0,05$; Tabela 4).

Correlação entre as imunoexpressões de RGα, BAX e BCL-2

Ao relacionar as imunoexpressões de RGα, BAX e BCL-2, o teste de correlação de Spearman revelou significância estatística apenas para as expressões citoplasmáticas e nucleares de RGα nos CCEs ($r = 0,406$; $p = 0,006$). Para as QAs, não foram constatadas

correlações estatisticamente significativas entre as expressões das proteínas avaliadas no presente estudo ($p > 0,05$).

Discussão

Particularmente nos últimos anos, a carcinogênese labial tem se apresentado como objeto de intensa investigação científica. Pesquisas têm demonstrado que esse processo pode envolver alterações moleculares na proliferação e diferenciação celulares (5-7), no reparo do DNA (8), na evasão das respostas imunes (9) e na apoptose (10, 11). Apesar disso, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da QA e na progressão para um CCE ainda não são completamente conhecidos.

No contexto do desenvolvimento e progressão neoplásicos, estudos têm destacado o papel da $RG\alpha$. Esta proteína, cuja expressão tem sido associada a comportamentos biológicos variados em tumores malignos, é responsável pela modulação de diversos eventos celulares, com destaque para a apoptose (18, 19, 23, 24). Apesar dessas evidências, pouco se sabe sobre a expressão da $RG\alpha$ nas QAs e CCEs de lábio inferior. Tais fatos, associados ao uso ocasional de corticoides no tratamento das QAs (7, 25, 26), ressaltam a necessidade de investigações sobre uma eventual participação da $RG\alpha$ na carcinogênese labial.

No presente estudo, foi observada expressão citoplasmática e nuclear para $RG\alpha$ em todos os casos de QA e de CCE, com elevados percentuais de imunopositividade. Quando comparadas aos CCEs, as QAs revelaram menor positividade citoplasmática e maior expressão nuclear para $RG\alpha$ ($p < 0,05$). Por sua vez, nos CCEs, foi identificada fraca correlação positiva entre as expressões citoplasmáticas e nucleares da $RG\alpha$ ($r = 0,406$; $p = 0,006$). Em conjunto, tais resultados sugerem um papel importante para essa proteína na patogênese das QAs e CCEs de lábio inferior. A ausência de correlação estatisticamente significativa entre as expressões de $RG\alpha$, BAX e BCL-2, nas lesões estudadas, sugere que a participação desse RG na carcinogênese labial não envolve a modulação das expressões dessas proteínas apoptóticas.

Nas QAs, os maiores índices de positividade nuclear para $RG\alpha$ podem estar relacionados a um provável papel supressor tumoral dessa proteína. Em consonância com essa hipótese, estudos têm revelado que essa isoforma do RG, no núcleo, é capaz de inibir a expressão de proteínas envolvidas nas respostas inflamatórias, na proliferação e migração celulares e na angiogênese, como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), IL-6, IL-8, VEGF e COX-2 (15, 20-22). Tais atividades da $RG\alpha$ também podem ser decorrentes do

seu estímulo à expressão de inibidores de quinases dependentes de ciclinas, como p27 e p21, e de inibidores de fatores de transcrição, como I κ B α (15, 20, 22).

Informações sobre o papel dos glicocorticoides nos CCEs orais são escassas. Hayashido et al. (34) observaram que concentrações de dexametasona superiores a 10^{-8} M eram capazes de inibir a síntese do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) e aumentar a síntese do inibidor tipo I do ativador de plasminogênio (PAI-1) em linhagens celulares de CCE oral, com consequente redução na invasão de gel de colágeno tipo I. Por outro lado, Xie et al. (35) constataram que o estresse crônico, caracterizado por níveis aumentados de catecolaminas e glicocorticoides, resultou em maior tamanho tumoral, padrão de crescimento mais invasivo, além de maior expressão de VEGF e metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) em linhagem de CCE oral implantada em murinos. Por sua vez, Bernabé et al. (36) verificaram que concentrações farmacológicas (1000 nM) de cortisol inibiram a produção de IL-6 por linhagens celulares de CCE oral, ao passo que concentrações que simulam situações de estresse (10 nM) estimularam a expressão de IL-6 e a proliferação celular. Dessa forma, é possível que os efeitos dos glicocorticoides sobre células de CCEs orais sejam variáveis, dependendo dos seus níveis sistêmicos ou locais (35, 36).

No presente estudo, não foram identificadas diferenças significativas nas expressões de RG α (citoplasma e núcleo) em relação aos diversos parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase nodal regional e estágio clínico) avaliados nos CCEs ($p > 0,05$). Tais resultados sugerem que a progressão tumoral nessas lesões não estaria relacionada à expressão desse RG. Em contraposição a esses achados, pesquisas com câncer renal (19) e de mama (12, 18) revelaram que a alta expressão do RG está relacionada a indicadores de comportamento biológico menos agressivo, como menor tamanho tumoral e estágios clínicos iniciais. Por outro lado, em câncer de ovário, a expressão dessa proteína tem sido relacionada a estágios clínicos mais avançados e piores prognósticos (13).

Em conjunto, os achados descritos anteriormente sugerem que, apesar de suas funções predominantemente anti-inflamatórias e antiproliferativas, a RG α pode desempenhar papéis relativamente distintos em neoplasias malignas. Neste sentido, destacam-se os mecanismos de ação não genômicos dos glicocorticoides, os quais incluem: interações inespecíficas com lipídios e proteínas de membranas celulares, efeitos não genômicos modulados por RG citosólico e interações específicas com RG associado às membranas (37, 38). Embora tais mecanismos ainda não sejam completamente compreendidos, estudos revelam que eles envolvem modulações na fluidez das membranas, em canais iônicos, nas MAPKs e nas fosfolipases (37, 38). Os altos níveis de expressão citoplasmática e os menores percentuais de

positividade nuclear para RG α nas neoplasias avaliadas no presente estudo, em comparação às QAs, ressaltam uma provável participação importante desses mecanismos nos CCEs de lábio inferior.

Em relação aos parâmetros morfológicos, não foram constatadas diferenças significativas nas imunoexpressões nucleares e citoplasmáticas da RG α em relação ao risco de transformação maligna das QAs, sugerindo que a progressão destas lesões provavelmente não está relacionada à expressão deste RG. Por outro lado, para os CCEs, os resultados deste estudo identificaram uma tendência à maior expressão dessa proteína nas lesões de alto grau quando comparadas às lesões de baixo grau ($p = 0,036$). Apesar da significância estatística, não se considera uma diferença expressiva do ponto de vista biológico, tendo em vista os valores muito próximos das medianas das lesões de alto e baixo grau de malignidade. Estudos relacionando o grau de malignidade de neoplasias malignas com a expressão do RG têm demonstrado resultados divergentes. Em alguns casos, como no carcinoma de mama a alta expressão nuclear do RG tem sido associada ao menor grau de pleomorfismo celular e a menores números de mitoses (12) e ao menor grau de malignidade em carcinoma renal (19). Em contraposição, estudos em carcinoma de ovário, a alta expressão nuclear de RG estava associada a um maior grau de malignidade (13).

Uma das principais funções descritas para a RG α é o estímulo à apoptose, seja pela inibição da expressão das proteínas antiapoptóticas BCL-2 e BCL-xL ou pelo aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAD (24). No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que a participação da RG α na carcinogênese labial não envolve a modulação das expressões de BAX e BCL-2. Um achado particularmente interessante da presente pesquisa foi a maior expressão de BAX em comparação com BCL-2, tanto nas QAs como nos CCEs, independente das características clinicopatológicas dessas lesões ($p < 0,05$). Pesquisas envolvendo a morte celular programada na carcinogênese labial são escassas e têm revelado achados divergentes (10, 11). Em estudo com QAs, Martinez et al. (10) observaram maiores percentuais de positividade para BCL-2 ($12,2 \pm 5,8\%$) em relação à BAX ($6,8 \pm 3,0\%$) nas células epiteliais. Por outro lado, ao analisar a expressão da caspase 3 clivada, Leite et al. (11) constataram maiores índices de área apoptótica nos CCEs de lábio quando comparados às QAs. Neste mesmo estudo, Leite et al. (11) observaram maiores índices de área apoptótica nas QAs sem displasia epitelial quando comparadas às QAs com displasia.

A maior expressão de BAX em relação à BCL-2 em QAs e CCEs de lábio inferior, observada no presente estudo, pode ser reflexo da participação importante de outras proteínas envolvidas na regulação da apoptose, com destaque para a P53. Nas QAs, a P53 em sua forma

selvagem reconheceria a célula com danos no DNA causados pela radiação UV, elevando os níveis de BAX e reduzindo a expressão de BCL-2, induzindo a célula à apoptose (39, 40). Nos CCEs, por sua vez, a alta expressão de BAX em relação à BCL-2 poderia ser parcialmente decorrente de mutações no gene *TP53*. Em consonância com essa sugestão, Ostwald et al. (41) reportaram uma alta frequência de mutações no gene *TP53* em CCEs de lábio, especialmente em sítios bipyrimidina. Além disso, Huang et al. (42) observaram que carcinomas de células não pequenas de pulmão que apresentavam mutações de *P53* no motivo alça-hélice-folha, importante para o contato desta proteína com o DNA, apresentaram expressão significativamente maior de BAX em comparação com tumores sem mutações no gene *P53*.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem um papel importante para a *RGα* na carcinogênese labial, o qual parece não estar primariamente relacionado à modulação das expressões das proteínas BCL-2 e BAX. A progressão tumoral nos CCEs de lábio inferior, no entanto, pode não estar relacionada à expressão da *RGα*.

Referências

1. de Oliveira Ribeiro A, da Silva LC, Martins-Filho PR. Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. *Int J Dermatol* 2014; **53**: 1370–6.
2. Junqueira JL, Bönecker M, Furuse C, et al. Actinic cheilitis among agricultural workers in Campinas, Brazil. *Community Dent Health* 2011; **28**: 60–3.
3. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis* 2004; **10**: 212–6.
4. Oliveira Alves MG, da Mota Delgado A, Balducci I, et al. Study of MDM2 and SUMO-1 expression in actinic cheilitis and lip cancer. *Arch Dermatol Res* 2014; **306**: 837–41.
5. Xavier FC, Takiya CM, Reis SR, Ramalho LM. p63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. *J Mol Histol* 2009; **40**: 131–7.
6. Correa GT, Bernardes VF, de Sousa SF, et al. Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. *Tumour Biol* 2015; **36**: 9059–66.

7. Lopes ML, Silva Júnior FL, Lima KC, Oliveira PT, Silveira ÉJ. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. *An Bras Dermatol* 2015; **90**: 505–12.
8. Lopes ML, de Oliveira DH, Sarmento DJ, Queiroz LM, Miguel MC, da Silveira ÉJ. Correlation between cell cycle proteins and hMSH2 in actinic cheilitis and lip cancer. *Arch Dermatol Res* 2016; **308**: 165–71.
9. Gonçalves AS, Oliveira JP, Oliveira CF, et al. Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. *Hum Immunol* 2016; **77**: 785–90.
10. Martínez A, Brethauer U, Rojas IG, et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med* 2005; **34**: 257–62.
11. Leite AF, Bernardo VG, Buexm LA, et al. Immunoexpression of cleaved caspase-3 shows lower apoptotic area indices in lip carcinomas than in intraoral cancer. *J Appl Oral Sci* 2016; **24**: 359–65.
12. Abduljabbar R, Negm OH, Lai CF, et al. Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2015; **150**: 335–46.
13. Veneris JT, Darcy KM, Mhaweche-Fauceglia P, et al. High glucocorticoid receptor expression predicts short progression free survival in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2017; **146**: 153–60.
14. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev* 2013; **24**: 41–56.
15. Hu J, Chen Q. The role of glucocorticoid receptor in prostate cancer progression: from bench to bedside. *Int Urol Nephrol* 2017; **49**: 369–80.
16. Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 2005; **18**: 331–42.

17. Lu YS, Lien HC, Yeh PY, et al. Glucocorticoid receptor expression in advanced non-small cell lung cancer: clinicopathological correlation and in vitro effect of glucocorticoid on cell growth and chemosensitivity. *Lung Cancer* 2006; **53**: 303–10.
18. Buxant F, Engohan-Aloghe C, Noël JC. Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010; **18**: 254–7.
19. Yakirevich E, Matoso A, Sabo E, et al. Expression of the glucocorticoid receptor in renal cell neoplasms: an immunohistochemical and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. *Hum Pathol* 2011; **42**: 1684–92.
20. McBeth, Grabnar M, Selman S, Hinds TD Jr. Involvement of the androgen and glucocorticoid receptors in bladder cancer. *Int J Endocrinol* 2015; **2015**: 384860.
21. Mihailidou C, Panagiotou C, Kiaris H, Kassi E, Moutsatsou P. Crosstalk between C/EBP homologous protein (CHOP) and glucocorticoid receptor in lung cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2016; **436**: 211–23.
22. Sundahl N, Clarisse D, Bracke M, Offner F, Berghe WV, Beck IM. Selective glucocorticoid receptor-activating adjuvant therapy in cancer treatments. *Oncoscience* 2016; **3**: 188–202.
23. Sommer P, Le Rouzic P, Gillingham H, et al. Glucocorticoid receptor overexpression exerts an antisurvival effect on human small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2007; **26**: 7111–21.
24. Sommer P, Cowen RL, Berry A, et al. Glucocorticoid receptor over-expression promotes human small cell lung cancer apoptosis in vivo and thereby slows tumor growth. *Endocr Relat Cancer* 2010; **17**: 203–13.
25. Leite RMS, Leite AAC, Friedman H, Friedman I. Chronic oral breathing as a risk factor for the development of actinic cheilitis. *An Bras Dermatol* 2003; **78**: 73–8.

26. Dutra DM, Nascimento MAG, Soares MSM. Actinic cheilitis: A case report and a review of the literature. *Rev Odonto Cienc* 2016; **31**: 45–7.
27. Sobin LH, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumors*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002; 264.
28. Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon: IARC Press, 2005; 177–9.
29. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**: 127–33.
30. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006; **42**: 987–93.
31. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; **166**: 375–81.
32. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol* 2007; **15**: 376–83.
33. Moreno-Galindo C, Hermsen M, García-Pedrero JM, Fresno MF, Suárez C, Rodrigo JP. p27 and BCL2 expression predicts response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2014; **50**: 128–34.
34. Hayashido Y, Shirasuna K, Sugiura T, Nakashima M, Matsuya T. Effect of dexamethasone on invasion of human squamous cell carcinoma cells into collagen gel. *Cancer Lett* 1996; **108**: 81–6.

35. Xie H, Li C, He Y, Griffin R, Ye Q, Li L. Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. *Oral Oncol* 2015; **51**: 991–7.
36. Bernabé DG, Tamae AC, Biasoli ÉR, Oliveira SH. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain Behav Immun* 2011; **25**: 574–83.
37. Stahn C, Löwenberg M, Hommes DW, Buttgereit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007; **275**: 71–8.
38. Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol* 2008; **29**: 273–91.
39. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 1994; **54**: 2095–97.
40. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; **80**: 293–99.
41. Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer* 2000; **88**: 82–6.
42. Huang C, Kohno N, Inufusa H, Kodama K, Taki T, Miyake M. Overexpression of bax associated with mutations in the loop-sheet-helix motif of p53. *Am J Pathol* 1999; **155**: 955–65.

Tabelas

Tabela 1 Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
RG α *	P20	Santa Cruz Biotechnology	1:200	<i>Trilogy</i> , pH 6,0 <i>Pascal</i> , 121°C, 3 min	60 minutos
BCL-2	124	DAKO	1:150	Tris-EDTA, pH 9,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos
BAX	A3533	DAKO	1:300	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	<i>Overnight</i>

*Para este anticorpo, a desparafinização, a reidratação e a recuperação antigênica foram realizadas em etapa única, com uso da solução *Trilogy* (Cell MarqueTM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Tabela 2 Distribuição absoluta e relativa dos casos de QA e CCE de lábio inferior de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros clinicopatológicos	n (%)
Queilite actínica	
<i>Sexo</i>	
Masculino	18 (81,8)
Feminino	4 (18,2)
<i>Risco de transformação maligna</i>	
Baixo risco	11 (50,0)
Alto risco	11 (50,0)
Carcinoma de células escamosas	
<i>Sexo</i>	
Masculino	32 (72,7)
Feminino	12 (27,3)
<i>Tamanho do tumor</i>	
T1	14 (31,8)
T2	25 (56,8)
T3	3 (6,8)
T4	2 (4,5)
<i>Metástase nodal regional</i>	
N0	22 (50,0)
N1	16 (36,3)
N2	5 (11,4)
N3	1 (2,3)
<i>Metástase à distância</i>	
M0	42 (95,5)
M1	2 (4,5)
<i>Estágio clínico</i>	
Estágio I	7 (15,9)
Estágio II	14 (31,8)
Estágio III	15 (34,1)
Estágio IV	8 (18,2)
<i>Grau histopatológico de malignidade</i>	
Baixo grau	15 (34,1)
Alto grau	29 (65,9)

Tabela 3 Mediana e distribuição quartílica (Q₂₅-Q₇₅) para os percentuais de células imunopositivas para RG α , BAX e BCL-2 em QAs e CCEs de lábio inferior, e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros	RG α				BAX		BCL-2	
	Citoplasma		Núcleo		Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P
	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P	Mediana (Q ₂₅ -Q ₇₅)	P				
Queilite actínica								
<i>Risco de transformação</i>								
Baixo risco (n = 11)	95,6 (70,9–99,5)	0,621	89,5 (79,5–94,7)	0,491	79,2 (24,5–89,9)	0,670	21,6 (4,4–28,5)	0,818
Alto risco (n = 11)	97,8 (89,7–99,8)		91,6 (81,0–91,6)		80,8 (41,9–92,6)		17,6 (8,6–27,6)	
Carcinoma de células escamosas								
<i>Tamanho do tumor</i>								
T1 (n = 14)	99,9 (95,9–100,0)	0,107	85,4 (36,3–93,1)	0,182	99,7 (98,8–100,0)	0,603	0,9 (0,0–3,1)	0,818
T2 – T4 (n = 30)	100,0 (99,9–100,0)		52,9 (18,3–81,1)		99,9 (99,2–100,0)		1,1 (0,0–2,2)	
<i>Estágio clínico</i>								
Estágio I/II (n = 21)	100,0 (97,8–100,0)	0,739	65,7 (24,6–88,3)	0,860	100,0 (98,8–100,0)	0,921	0,9 (0,0–1,7)	0,520
Estágio III/IV (n = 23)	100,0 (99,8–100,0)		57,1 (12,8–93,3)		99,8 (98,8–100,0)		1,3 (0,0–3,0)	
<i>Grau histopatológico</i>								
Baixo grau (n = 15)	99,8 (97,0–100,0)	0,036	67,9 (17,6–86,2)	0,990	99,9 (98,3–100,0)	0,694	0,4 (0,0–1,3)	0,069
Alto grau (n = 29)	100,0 (99,9–100,0)		57,1 (28,5–92,9)		99,9 (99,1–100,0)		1,4 (0,2–3,0)	

Tabela 4 Distribuição dos casos [n (%)] de QA e CCE de lábio inferior de acordo com os postos para os percentuais de células imunopositivas para BCL-2 e BAX, e suas diferenças em relação aos parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros	BCL-2 > BAX n (%)	BCL-2 < BAX n (%)	BCL-2 = BAX n (%)	p
Lesão				
Queilite actínica (n = 22)	2 (9,1)	20 (90,9)	0 (0,0)	< 0,001
CCE sem metástase regional (n = 22)	0 (0,0)	22 (100,0)	0 (0,0)	< 0,001
CCE com metástase regional (n = 22)	1 (4,6)	21 (95,4)	0 (0,0)	< 0,001
Queilite actínica				
<i>Risco de transformação maligna</i>				
Baixo risco (n = 11)	1 (9,1)	10 (90,9)	0 (0,0)	0,006
Alto risco (n = 11)	1 (9,1)	10 (90,9)	0 (0,0)	0,004
Carcinoma de células escamosas				
<i>Tamanho do tumor</i>				
T1 (n = 14)	1 (7,1)	13 (92,9)	0 (0,0)	0,001
T2 – T4 (n = 30)	0 (0,0)	30 (100,0)	0 (0,0)	< 0,001
<i>Estágio clínico</i>				
Estágio I/II (n = 21)	0 (0,0)	21 (100,0)	0 (0,0)	< 0,001
Estágio III/IV (n = 23)	1 (4,4)	22 (95,6)	0 (0,0)	< 0,001
<i>Grau histopatológico</i>				
Baixo grau (n = 15)	0 (0,0)	15 (100,0)	0 (0,0)	0,001
Alto grau (n = 29)	1 (3,5)	28 (96,5)	0 (0,0)	< 0,001

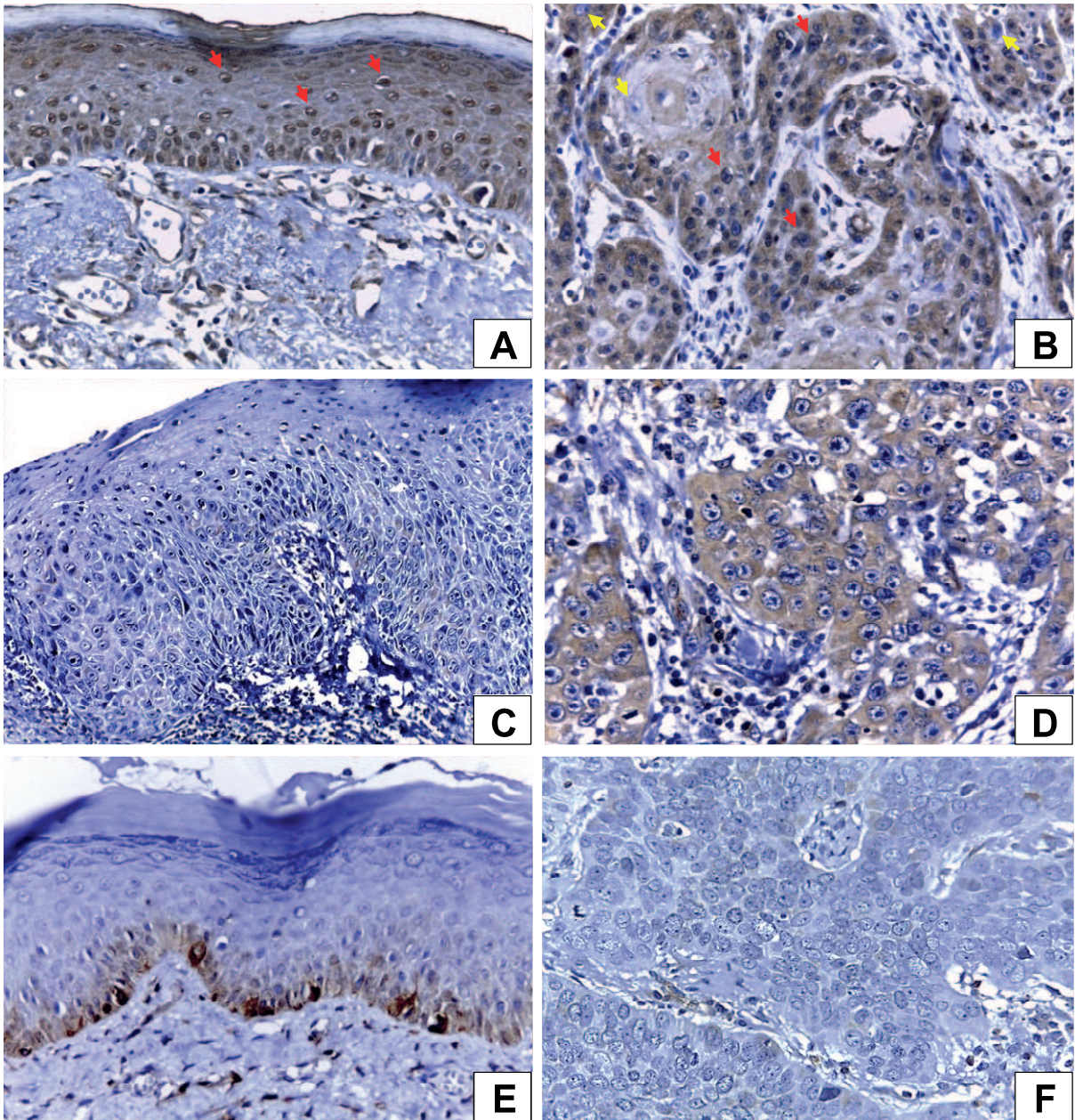


Figura 2 Expressão citoplasmática e nuclear (núcleos positivos indicados por setas vermelhas e núcleos negativos por setas amarelas) da RG α em QA de baixo risco (A) e em CCE de baixo grau (B) (Reveal, 400 \times). Positividade citoplasmática para BAX em QA de alto risco (C) (Reveal, 200 \times) e em CCE de alto grau (D) (Reveal, 400 \times). Imunoexpressão citoplasmática de BCL-2 em QA de alto risco (E) e em CCE de alto grau (F) (Reveal, 400 \times).

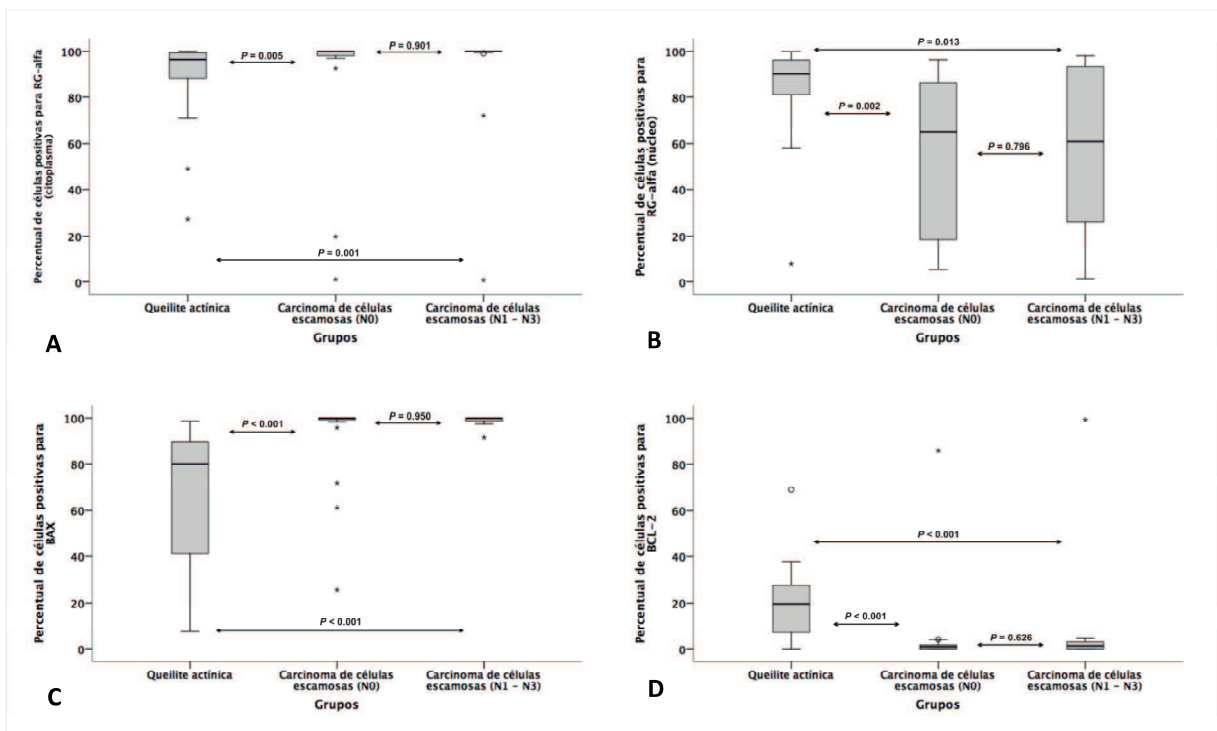


Figura 3 BoxPlots relativos aos percentuais de células imunopositivas aos anticorpos anti-RG α (citoplasma [A] e núcleo [B]), anti-BAX (C) e anti-BCL-2 (D) em QAs e CCEs de lábio inferior metastáticos e não metastáticos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A carcinogênese labial tem se apresentado como objeto de intensa investigação científica, especialmente nos últimos anos, com diversas pesquisas voltadas à compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da QA e na sua progressão para um CCE. O entendimento desse processo demonstra-se ainda mais necessário ao se considerar os impactos na sobrevida dos pacientes quando do desenvolvimento de metástases regionais nos CCEs de lábio inferior.

Diversos estudos têm destacado o envolvimento dos glicocorticoides e de seus receptores, especialmente a $RG\alpha$, no desenvolvimento e progressão neoplásicos. Particularmente nas QAs, o eventual uso de corticoides no seu tratamento não cirúrgico, associado ao risco de transformação maligna dessas lesões, ressaltam a necessidade de investigações sobre uma eventual participação da $RG\alpha$ na carcinogênese labial.

Nesse contexto, os resultados do presente estudo são importantes, por demonstrarem a expressão da $RG\alpha$ em QAs e CCEs de lábio inferior, bem como seu potencial envolvimento na carcinogênese labial. Possivelmente, o papel da $RG\alpha$ nessas lesões não envolve a modulação das expressões das proteínas BCL-2 e BAX, ao contrário do observado em outras lesões, especialmente em neoplasias malignas.

A $RG\alpha$, provavelmente, desempenha um papel supressor tumoral nas QAs, tendo em vista sua alta expressão nuclear nessas lesões. A progressão tumoral nos CCEs de lábio inferior, por sua vez, parece não estar relacionada à expressão desse RG. Apesar disso, a alta expressão citoplasmática da $RG\alpha$, especialmente nos CCEs, destaca a importância de investigações direcionadas aos mecanismos não genômicos dos glicocorticoides e seus receptores na carcinogênese labial.

REFERÊNCIAS

- ABDULJABBAR, R. et al. Clinical and biological significance of glucocorticoid receptor (GR) expression in breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 150, n. 2, p. 335–46, 2015.
- BASCHANT, U.; TUCKERMANN, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 120, n. 2-3, p. 69–75, 2010.
- BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n. 3, p. e74–9, 2010.
- BERDEL, H. O. et al. Targeting serum glucocorticoid-regulated kinase-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck: a novel modality of local control. **PLoS One.**, v. 9, n. 12, p. e113795, 2014.
- BERNABÉ, D.G. et al. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. **Brain Behav Immun.**, v. 25, n. 3, p. 574–83, 2011.
- BIANCO, B. C. et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, myofibroblasts and Ki-67 in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Int J Exp Pathol.**, v. 96, n. 5, p. 311–18, 2015.
- BILKAY, U. et al. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. **Ann. Plast. Surg.**, v. 50, p. 43–50, 2003.
- BIRKINSHAW, R. W.; CZABOTAR, P. E. The BCL-2 family of proteins and mitochondrial outer membrane permeabilisation. **Semin Cell Dev Biol.**, 2017. [Epub ahead of print].
- BLOCK, T. S. et al. Glucocorticoid receptor expression in 20 solid tumor types using immunohistochemistry assay. **Cancer Manag Res.**, v. 9, p. 65–72, 2017.
- BOLDIZSAR, F. et al. Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. **Immunobiology.**, v. 215, n. 7, p. 521–26, 2010.
- BOSE, P. et al. BAX expression measured by AQUAnalysis is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 12, p. 332, 2012.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v. 166, n. 4, p. 375–81, 1992.
- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v. 4, p. 70–7, 1998.
- BURZ, C. et al. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncol.**, v. 48, n. 6, p. 811–21, 2009.

- BUXANT, F.; ENGOHAN-ALOGHE, C.; NOËL, J. C. Estrogen receptor, progesterone receptor, and glucocorticoid receptor expression in normal breast tissue, breast in situ carcinoma, and invasive breast cancer. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 18, n. 3, p. 254–7, 2010.
- CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 29, n. 4, p. 545–56, 2015.
- CALDEIRA, P. C. et al. Thioredoxin and metallothionein: Homeostasis-related proteins in lip carcinogenesis. **Arch Oral Biol.**, v. 77, p. 75–81, 2017.
- CARTRON, P. F. et al. The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule BAX, BAXpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. **Hum. Mol. Genet.**, v. 11, n. 6, p. 675–87, 2002.
- CARTRON, P. F. et al. The N-terminal end of BAX contains a mitochondrial-targeting signal. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 13, p. 11633–41, 2003.
- CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 3, p. 498–503, 2008.
- CHEBOTAEV, D. et al. The mechanisms of tumor suppressor effect of glucocorticoid receptor in skin. **Mol Carcinog.**, v. 46, n. 8, p. 732–40, 2007.
- CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends Cell Biol.**, v. 18, n. 4, p. 157–64, 2008.
- CORREA, G. T. et al. Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. **Tumour Biol.**, v. 36, n. 11, p. 9059–66, 2015.
- DE OLIVEIRA RIBEIRO, A. et al. Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. **Int J Dermatol.**, v. 53, n. 11, p. 1370–6, 2014.
- DE SANTANA SARMENTO, D. J. et al. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **Int. J. Dermatol.**, v. 53, n. 4, p. 466–72, 2014.
- DE SOUZA LUCENA, E. E. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis.**, v. 18, n. 6, p. 575–9, 2012.
- DOS SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J. Cutan. Pathol.**, v. 30, n. 4, p. 237–41, 2003.
- DUTRA, D. M. et al., Actinic cheilitis: A case report and a review of the literature. **Rev Odonto Cienc.**, v. 31, n. 1, p. 45–7, 2016.
- FRANCKE, U.; FOELLMER, B. E. The glucocorticoid receptor gene is in 5q31-q32 [corrected]. **Genomics**, v. 4, n. 4, p. 610–12, 1989.

- FU, N. Y. et al. Bax beta: a constitutively active human Bax isoform that is under tight regulatory control by the proteasomal degradation mechanism. **Mol Cell.**, v. 33, n. 1, p. 15–29, 2009.
- GALE, N. et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes, L. et al. **World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors.** Lyon: IARC Press, 2005, p. 118–21.
- GONÇALVES, A. S. et al. Relevance of HLA-G, HLA-E and IL-10 expression in lip carcinogenesis. **Hum Immunol.**, v. 77, n. 9, p. 785–90, 2016.
- GOVINDAN, M. V. et al. Cloning of the human glucocorticoid receptor cDNA. **Nucl. Acids Res.**, v. 13, n. 23, p. 8293–304, 1985.
- GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. et al. Squamous cell carcinoma of the lip: a retrospective study of 146 patients. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 26, p. 1116–21, 2012.
- HAYASHIDO, Y. et al. Effect of dexamethasone on invasion of human squamous cell carcinoma cells into collagen gel. **Cancer Lett.**, v. 108, n.1, p. 81–6, 1996.
- HALDAR, S. et al. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 54, n. 8, p. 2095–7, 1994.
- HALLER, J.; MIKICS, E.; MAKARA, G. B. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. **Front Neuroendocrinol.**, v. 29, n. 2, p. 273–91, 2008.
- HASNAN, J. et al. Relationship between apoptotic markers (BAX and BCL-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. **Singapore Med. J.**, v. 51, n. 1, p. 50–5, 2010.
- HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 6, p. 1259–62, 2008.
- HENNESSY, E. J. Selective inhibitors of BCL-2 and Bcl-xL: Balancing antitumor activity with on-target toxicity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 26, n. 9, p. 2105–14, 2016.
- HOLLENBERG, S. M. et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. **Nature**, v. 318, n. 6047, p. 635–41, 1985.
- HU, J. et al. The role of glucocorticoid receptor in prostate cancer progression: from bench to bedside. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 49, n. 3, p. 369–80, 2017.
- HUANG, C. et al. Overexpression of bax associated with mutations in the loop-sheet-helix motif of p53. **Am. J. Pathol.**, v. 155, n. 3, p. 955–65, 1999.
- JUNQUEIRA, J. L. et al. Actinic cheilitis among agricultural workers in Campinas, Brazil. **Community Dent. Health.**, v. 28, n. 1, p. 60-3, 2011.

- KAY, P. et al. Loss of glucocorticoid receptor expression by DNA methylation prevents glucocorticoid induced apoptosis in human small cell lung cancer cells. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e24839, 2011.
- KFIR-ERENFELD, S. et al. Non-genomic events determining the sensitivity of hemopoietic malignancies to glucocorticoid-induced apoptosis. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 63, n. 1, p. 37–43, 2014.
- KORNEVS, E. et al. 5 year experience with lower lip cancer. **Stomatologija**, v. 7, p. 95–8, 2005.
- KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol.**, v. 42, n. 10, p. 987–93, 2006.
- LEITE, R. M. S. et al. Chronic oral breathing as a risk factor for the development of actinic cheilitis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 1, p. 73–8, 2003.
- LEITE, A. F. et al. Immunoexpression of cleaved caspase-3 shows lower apoptotic area indices in lip carcinomas than in intraoral cancer. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 24, n. 4, p. 359–65, 2016.
- LETAI, A. et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 2, n. 3, p. 183–92, 2002.
- LIEN, H. C. et al. Differential expression of glucocorticoid receptor in carcinomas of the human digestive system. **Histopathology**, v. 52, n. 3, p. 314–24, 2008.
- LIMA, F. J. et al. Estudo clínico e histopatológico de carcinomas de células escamosas de lábio inferior. **Pesqui. bras. odontopediatria clín. Integr.**, v. 14, n. 3, p. 24–33, 2014.
- LOPES, M. L. et al. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 90, n. 4, p. 505–12, 2015.
- LOPES, M. L. et al. Correlation between cell cycle proteins and hMSH2 in actinic cheilitis and lip cancer. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 308, n. 3, p. 165–71, 2016.
- LU, N. Z.; CIDLOWSKI, J. A. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. **Mol. Cell**, v. 18, n. 3, p. 331–42, 2005.
- LU, Y. S. et al. Glucocorticoid receptor expression in advanced non-small cell lung cancer: clinicopathological correlation and in vitro effect of glucocorticoid on cell growth and chemosensitivity. **Lung Cancer**, v. 53, n. 3, p. 303–10, 2006.
- LUCA, F. et al. Genetic, functional and molecular features of glucocorticoid receptor binding. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61654, 2013.
- MARKOPOULOS, A. et al. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis.**, v. 10, n. 4, p. 212–6, 2004.

- MARTÍNEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 5, p. 257–62, 2005.
- MARTINS-FILHO, P. R.; DA SILVA, L. C.; PIVA, M. R. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. **Int. J. Dermatol.**, v. 50, n. 9, p. 1109–14, 2011.
- MARUCCIA, M. et al. Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 4, p. 1543–6, 2012.
- MARZOUK, O.; SCHOFIELD, J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 2767–810, 2011.
- MATSUMOTO, M. et al. Cisplatin-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer cells is dependent on Bax- and Bak-induction pathway and synergistically activated by BH3-mimetic ABT-263 in p53 wild-type and mutant cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 473, n. 2, p. 490–6, 2016.
- McBETH, L. et al. Involvement of the androgen and glucocorticoid receptors in bladder cancer. **Int J Endocrinol.**, v. 2015, p. 384860, 2015.
- MIHAILIDOU, C. et al. Crosstalk between C/EBP homologous protein (CHOP) and glucocorticoid receptor in lung cancer. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 436, p. 211–23, 2016.
- MIRANDA FERREIRA, A. et al. Prevalence and factors associated with oral potentially malignant disorders in Brazil's rural workers. **Oral Dis.**, v. 22, n. 6, p. 536–42, 2016.
- MORENO-GALINDO, C. et al. P27 and BCL2 expression predicts response to chemotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 2, p. 128–34, 2014.
- MIYASHITA, T. et al. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 293–9, 1995.
- NEVILLE, B.W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2009.
- OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 132, n. 5, p. 1033–44, 2013.
- OLIVEIRA ALVES, M. G. et al. Study of MDM2 and SUMO-1 expression in actinic cheilitis and lip cancer. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 306, n. 9, p. 837–41, 2014.
- OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. BCL-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, BAX, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609–19, 1993.
- OSTWALD, C.; GOGACZ, P.; HILLMANN, T. et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. **Int. J. Cancer**, v. 88, n. 1, p. 82–6, 2000.

PILATI, S. et al. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. **Oral Dis.**, v. 23, n. 2, p. 219–24, 2017.

RAMAMOORTHY, S.; CIDLOWSKI, J. A. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. **Endocr. Dev.**, v. 24, p. 41–56, 2013.

RON, E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. **Radiat. Res.**, v. 150, n. 5, p. S30–41, 1998.

SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr Rev.**, v. 21, n. 1, p. 55-89, 2000.

SARMENTO, D. J. et al. Immunohistochemical analysis of mismatch proteins in carcinogenesis of the lower lip. **Histopathology**, v. 63, n. 3, p. 371–7, 2013.

SARMENTO, D. J. et al. Link between immunoexpression of hMLH1 and hMSH2 proteins and clinical-epidemiological aspects of actinic cheilitis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 91, n. 4, p. 463–7, 2016.

SAVAGE, N. W.; MCKAY, C.; FAULKNER, C. Actinic cheilitis in dental practice. **Aust. Dent. J.**, v. 55, n. 1, p. 78-84, 2010.

SARGERAN, K. et al. Survival after lip cancer diagnosis. **J. Craniofac. Surg.**, v. 20, p. 248–52, 2009.

SCHAAF, M. J.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 83, n. 1-5, p. 37–48, 2002.

SCHLOSSMACHER, G. et al. Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis in small-cell lung cancer requires interaction with BCL2. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 20, n. 6, p. 785–95, 2013.

SILVEIRA, E. J. D. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376–83, 2007.

SIONOV, R. V. et al. Glucocorticoid-induced apoptosis revisited: a novel role for glucocorticoid receptor translocation to the mitochondria. **Cell Cycle**, v. 5, n. 10, p. 1017–26, 2006.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 6th ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 264p.

SOMMER, P. et al. Glucocorticoid receptor overexpression exerts an antisurvival effect on human small cell lung cancer cells. **Oncogene**, v. 26, n. 50, p. 7111–21, 2007.

SOMMER, P. et al. Glucocorticoid receptor over-expression promotes human small cell lung cancer apoptosis in vivo and thereby slows tumor growth. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 17, n. 1, p. 203–13, 2010.

- SOUZA, R. L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 16, p. e757–62, 2011.
- SPIEGELMAN, V. S. et al. Resistance of transformed mouse keratinocytes to growth inhibition by glucocorticoids. **Mol. Carcinog.**, v. 20, n. 1, p. 99–107, 1997.
- STAHN, C. et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 275, n. (1-2), p. 71–8, 2007.
- SUNDAHL, N. et al. Selective glucocorticoid receptor-activating adjuvant therapy in cancer treatments. **Oncoscience**, v. 3, n. 7-8, p. 188–202, 2016.
- THOMAS, S. et al. Targeting the BCL-2 family for cancer therapy. **Expert Opin. Ther. Targets**, v. 17, n. 1, p. 61–75, 2013.
- TSUJIMOTO, Y. et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science**, v. 226, n. 4678, p. 1097–9, 1984.
- TSUJIMOTO, Y.; CROCE, C. M. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of BCL-2, the gene involved in human follicular lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 83, p. 5214–8, 1986.
- UM, H. D. BCL-2 family proteins as regulators of cancer cell invasion and metastasis: a review focusing on mitochondrial respiration and reactive oxygen species. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 5193–203, 2016.
- VANGESTEL, C. et al. Forcing cancer cells to commit suicide. **Cancer Biother. Radiopharm.**, v. 24, n. 4, p. 395–407, 2009.
- VENERIS, J.T. et al. High glucocorticoid receptor expression predicts short progression-free survival in ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, 2017 [Epub ahead of print].
- VIEIRA, R. A. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An. Bras. Dermatol.**, v. 87, n. 1, p. 105–14, 2012.
- VIVIANO, M; ADDAMO, A; LORENZINI, G. Oral cancer. **Int. J. Clin. Dent.**, v. 6, n. 3, p. 291–311, 2013.
- VOGLER, M. Targeting BCL2-proteins for the treatment of solid tumours. **Adv. Med.**, 2014.
- VUKADINOVIC, M. et al. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: 63 analysis of a 10-years experience in 223 patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, p. 675–9, 2007.
- XAVIER, F. C.; TAKIYA, C. M.; REIS, S. R.; RAMALHO, L.M. p63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. **J. Mol. Histol.**, v. 40, n. 2, p. 131–7, 2009.

WANG, C.; YOULE, R. J. The role of mitochondria in apoptosis*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 43, p. 95–118, 2009.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 127–33, 2008.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annu Rev Immunol.**, v. 20, p. 125–63, 2002.

YAKIREVICH, E. et al. Expression of the glucocorticoid receptor in renal cell neoplasms: in immunohistochemical and quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study. **Hum. Pathol.**, v. 42, n. 11, p. 1684–92, 2011.

YEMELYANOV, A. et al. Tumor suppressor activity of glucocorticoid receptor in the prostate. **Oncogene**, v. 26, n. 13, p. 1885–96, 2007.

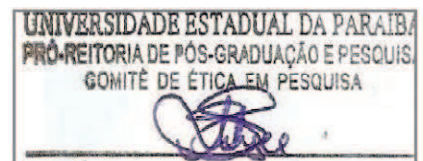
XIE, H. et al. Chronic stress promotes oral cancer growth and angiogenesis with increased circulating catecholamine and glucocorticoid levels in a mouse model. **Oral Oncol.**, v. 51, n. 11, p. 991–7, 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa da UEPB.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**



PARECER DO RELATOR: 08

Número do parecer: 58762016.3.0000.5187

Data da relatoria: 25 de agosto de 2016

Apresentação do Projeto: O Projeto é intitulado “ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA ISOFORMA ALFA DO RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE E DE PROTEÍNAS DA APOPTOSE (BCL-2 E BAX) EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR” O Projeto é para fins de elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação em Odontologia/UEPB.

Objetivo da Pesquisa: avaliar, por meio da imunoistoquímica, a expressão da RG e de proteínas envolvidas na apoptose (BCL-2 e BAX) em casos de QA, com riscos variados de transformação maligna, e de CCE de lábio inferior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Considerando a justificativa e os aportes teóricos e metodologia apresentados no presente projeto, e ainda considerando a relevância do estudo as quais são explícitas suas possíveis contribuições, percebe-se que a mesma não trará riscos aos participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A pesquisa a ser desenvolvida consistirá em um estudo do tipo transversal, observacional, analítico, caracterizado pela avaliação quantitativa da imunoexpressão da RG

alfa, do BCL-2 e da BAX em casos de QA e de CCE de lábio inferior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Os termos encontram-se devidamente anexados.

Recomendações: Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Sem pendências.

Situação do parecer: Aprovado

Confidential

ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*.

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine, Author Services, Wiley Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Journal of Oral Pathology & Medicine.

Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent form in all instances. Consent Form Template.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.8 OnlineOpen

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made

available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Gill Smith at JOPM.office@editorialoffice.co.uk

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine will be reviewed by two experts in the field. Journal of Oral Pathology & Medicine uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.6. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.7. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.8. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

3,000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

Review Papers: Journal of Oral Pathology & Medicine commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

3,000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

Case Reports: Please note that Journal of Oral Pathology & Medicine no longer accepts submissions of case reports.

Brief Reports: Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1,000 words maximum.

Letters to the Editor: Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in Journal of Oral Pathology & Medicine or they may raise new issues, but should have important implications.

750 words maximum. One figure or table, 5 references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

5.3. Structure

All papers submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

(ii) Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Reference numbers are cited in superscript. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based AMA style. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style, used in AMA 10th edition and follow below points:

- If there are more than 6 author names in a reference then first three author names are retained with ‘et al.’ and et al. is in roman.

- Article title in roman and sentence case.
- Journal title in italics and abbreviated with period at the end of the title only and not for all abbreviated terms.
- Semicolon used between year of publication and volume number.
- Colon used between volume number and page range.
- Full page range is used.
- End period at the end of a reference
- Place of publication is given first and then publisher name is given.
- Colon used between publisher location and publisher name.
- Year of publication is given after publisher name with semicolon separator.
- Chapter title given in roman and sentence case
- Book title given in italics and title case
- Query is raised for page range if it is not given
- Accessed date is must for websites

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow

Journal article: 1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book: 2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page. Tables with greater than 6 columns will be counted as multiple tables.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast. Multi-paneled figures will be counted as multiple figures. Figures can contain multiple images as long as these are grouped together on one page per figure with one legend for each figure.

Due to space constraints within the Journal, no more than 6 figures and/or tables will be allowed

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

6.2 Supporting Information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a

proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

6.3 Early View

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.4 Offprints

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more information.

6.5 Author Services

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

APÊNDICE D - Ficha para coleta de dados referente à análise do percentual de células positivas a RGα, BCL-2 e BAX.

Anticorpo: RGα Localização: Citoplasma
 BCL-2 Núcleo
 BAX

Caso	Campos microscópicos																				Total	Percentual				
	1		2		3		4		5		6		7		8		9		10							
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-						