



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Rúbia Teodoro Stuepp

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OCT4, SOX2 E HNK1 EM
QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

FLORIANÓPOLIS

2022

Rúbia Teodoro Stuepp

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OCT4, SOX2 E HNK1 EM QUEILITE
ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de
doutora em Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stuepp, Rúbia Teodoro
Expressão imuno-histoquímica de OCT4, Sox2 e HNK1 em
queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio / Rúbia
Teodoro Stuepp ; orientador, Filipe Modolo Siqueira, 2022.
75 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Câncer bucal. 3. Câncer labial. 4.
Queilite. 5. Imuno-histoquímica. I. Siqueira, Filipe
Modolo. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Rúbia Teodoro Stuepp

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE OCT4, SOX2 E HNK1 EM QUEILITE
ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Doutora em Odontologia e aprovado em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 18 de março de 2022

Prof.^a Dra. Mariane Cardoso Carvalho
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Prof. Dr. Filipe Modolo Siqueira
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Jussara Maria Gonçalves
Membro Externo
Univille

Prof.^a Dra. Elena Riet Correa Rivero
Membro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dra. Aline Cristina Batista Rodrigues Johann
Membro Externo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Dedico este trabalho às pesquisadoras e pesquisadores brasileiros, que se desdobram em meio a tantas dificuldades para produzir e disseminar conhecimentos, tecnologias e inovações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao **Universo** pelas oportunidades que tive, pela minha vida e pelas pessoas que surgiram em meu caminho.

Foram 12 anos vividos junto à Universidade Federal de Santa Catarina - cinco anos de graduação, dois anos de mestrado e quase cinco anos de doutorado. Ao longo deste período, percorri diversos laboratórios e salas de aula em diferentes centros de ensino, exerci diversas atividades como aluna, bolsista, voluntária e tive a oportunidade de ser docente na UFSC. Durante o doutoramento, também exerci a docência na escola de especialização ABCD e trabalhei como professora e coordenadora no curso Técnico em Saúde Bucal da Escola Técnica Qualificar. Além disso, atuei como cirurgiã-dentista no Centro de Especialidades Odontológicas da referida universidade e na Unidade Básica de Saúde no município de Alfredo Wagner. Foram muitas as pessoas que estiveram presentes neste período, que contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional, que me acolheram, proporcionaram palavras e gestos de incentivo e deixaram meus dias mais leves. Muitas destas pessoas se tornaram amigos queridos. Assim, são muitos os agradecimentos a fazer.

Aos meus pais, **Waldemar Stuepp e Rita de Cássia Teodoro Stuepp**, e à minha irmã **Júlia Teodoro Stuepp**, agradeço por guiar meus passos, pelo incentivo às minhas escolhas, pelo amor, carinho e por estar sempre presentes em minha vida. Aos meus avós, **Julita Monteiro e Jerobal Teodoro (in memoriam)**, por me apresentar um amor sereno, por me proporcionar uma infância leve e alegre e pelo apoio em minhas decisões.

Aos meus amigos, em especial **Natália Gonzales, Paulo Ricardo Kirchner, Rafael Coelho e Juliana Guimarães**, por me escutar, acolher, ajudar-me a enxergar as situações de forma positiva, por me tirar da minha zona de conforto, por me impulsionar pessoal e profissionalmente e por me completar. Vocês são o melhor presente que a vida me deu!

Às minhas amigas que a pós-graduação trouxe: **Fernanda Scotti, Jussara M., Caroline Zimmermann, Geórgia Martini, Emanuely da Silva, Angélica Reinheimer e Ana Gama**. Obrigada pelo companheirismo, por dividir as angústias e as alegrias e por toda a ajuda. Agradeço especialmente à **Jussara**, com quem morei por alguns anos e foi minha família, e à **Fernanda**, com quem dividi tantos momentos!

Aos amigos e colegas **Carlos William, Fillipe Ferreira, Daniele Feller, Daiane Bortoluzzi, Luiz Henrique Marola, Gilberto Melo e André Poletto**, muito presentes durante esta fase. Agradeço a convivência, a troca de conhecimentos, o companheirismo e os momentos descontraídos que tornaram esta fase mais gostosa de viver. Agradeço especialmente à **Sarah**

Pilati pela contribuição de material para esta pesquisa, à **Andressa Paza** que realizou parte da etapa laboratorial deste trabalho com zelo e dedicação. Ainda, agradeço à **Gilmara Lemos**, técnica do Laboratório de Patologia Bucal, sempre alegre e disposta em ajudar, e que se tornou uma querida amiga.

Ao meu companheiro **Artur Battisti Neto**, agradeço pelo amor, carinho, incentivo, por não medir esforços em me ajudar em tudo o que está ao seu alcance, por me confortar, animar e deixar a nossa vida mais feliz ao adotar a nossa “cãopanheira” **Brisa**. Agradeço também à sua família, por me acolher e estimular a alcançar meus objetivos.

À equipe da Unidade Básica de Saúde de Alfredo Wagner, agradeço pelo acolhimento, pela ajuda e pela troca de experiências. Especialmente à **Camila Marian** que, além de me auxiliar dentro e fora da Odontologia, se tornou uma querida amiga.

Ao meu orientador, **Filipe Modolo**, que me acompanha desde a iniciação científica na graduação, agradeço pelos ensinamentos, auxílio, incentivo à pesquisa e à vida acadêmica, e por me impulsionar sempre que precisei.

Aos queridos professores do programa de pós-graduação **Maria Inês Meurer, Liliane Janete Grando, Elena Riet Correa Rivero, Rogério de Oliveira Gondak e Michelle Tillmann Biz**, pelo conhecimento compartilhado durante os últimos anos, pelo carinho que tiveram comigo, por demonstrar o trabalho realizado com afeto, dedicação e perseverança.

Agradeço também aos professores **Alessandra Camargo, Etiene Munhoz, Márcio Correa e Henrique Ferrari**, com quem tive a oportunidade de trabalhar como colega docente na UFSC e me ampararam neste desafio.

À **Universidade Federal de Santa Catarina**, seus professores, técnicos e servidores que, através do Programa de Pós-graduação em Odontologia, possibilitaram-me mais uma vez ampliar meus conhecimentos.

À **FAPESC** pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação e a construção da pessoa que sou, meus sinceros agradecimentos.

“Vivemos com o que recebemos, mas marcamos a vida com o que damos”

(Winston Churchill)

RESUMO

Os cânceres de cavidade oral e orofaringe são o 7º câncer mais frequente e a 9ª causa de morte por câncer no mundo. O câncer de lábio representa cerca de um quarto dos cânceres orais e 95% dos casos são precedidos por queilite actínica (QA), uma doença oral potencialmente maligna (DOPM). O câncer bucal mais frequente é o carcinoma epidermoide (CEB), responsável por mais de 90% dos casos. Proteínas relacionadas às células-tronco cancerígenas (CTCs) têm sido associadas à iniciação, manutenção, migração celular e comportamento agressivo de neoplasias e já foram descritas em CEB e DOPM. Dentre os marcadores de CTCs, OCT4, Sox2 e HNK1 estão implicados na manutenção do estado celular indiferenciado e já foram identificados em diversos tipos de tumores. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar a expressão imuno-histoquímica de OCT4, Sox2 e HNK1 em carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e queilite actínica (QA). Para isso, foram avaliados 30 casos de CEL, 30 casos de QA e 10 casos de epitélio não-neoplásico (ENN), como controle. Considerou-se valor de $p < 0,05$ para dados com significância estatística. Verificou-se a superexpressão nuclear e citoplasmática de OCT4 em CEL comparado ao ENN e QA, sem diferença significativa. A expressão de Sox2 ocorreu apenas nos núcleos celulares e foi significativamente maior em ENN comparado ao CEL ($p = 0,000$), e em QA comparado ao CEL ($p = 0,000$). A expressão nuclear de HNK1 foi significativamente maior em CEL do que em ENN ($p = 0,036$), a expressão citoplasmática foi maior em CEL do que em ENN ($p = 0,000$) e em CEL comparado à QA ($p = 0,000$). Concluiu-se que OCT4, Sox2 e HNK1 podem estar envolvidos nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial, que parece estar relacionada com a perda de Sox2 e aumento da expressão de OCT4 e HNK1.

Palavras-chave: Câncer bucal; Câncer labial; Queilite, Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Background: Cancer stem cells (CSCs) proteins have been described in oral potentially malignant disorder (OPMD) and oral cancer associated with tumor initiation, maintenance, cell migration, and aggressive tumor behavior. **Aims:** to investigate the expression of OCT4, Sox2 and HNK1 in lip squamous cell carcinoma (LSCC), actinic cheilitis (AC), and non-neoplastic epithelium (NNE). **Methods:** thirty cases of LSCC, thirty cases of AC, and ten cases of NNE were submitted to immunohistochemical study. **Results:** Nuclear and cytoplasmic overexpression of OCT4 was seen in LSCC compared to NNE and AC, without significant difference. Sox2 was present only in nuclei and significantly overexpressed in NNE compared to LSCC ($p=0,000$) and in AC compared to LSCC ($p=0,000$). Nuclear HNK1 expression was significant higher in LSCC compared to NNE ($p=0,036$). Cytoplasmic HNK1 expression was higher in LSCC than in NNE ($p=0,000$) and in LSCC compared to QA ($p=0,000$). **Conclusions:** OCT4, Sox2 and HNK1 could be involved in initial phases of lip photocarcinogenesis, which seems to be linked with loss of Sox2 and increase of OCT4 and HNK1 expression.

Keywords: Human Oct4 protein; Human Sox2 protein; HNK-1 Antigen; Cancer stem cell; Oral Cancer; Lip Cancer

LISTA DE FIGURAS

Artigo de Pesquisa

Figura 1 –	Expressão imuno-histoquímica de OCT4, Sox2 e HNK1.....	50
------------	--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios arquiteturais e citológicos para classificação da displasia epitelial na Classificação da OMS de 2005	20
Quadro 2 – Anticorpos utilizados, clone, diluição, controle positivo e fabricante.....	42

LISTA DE TABELAS

Artigo de Pesquisa

Tabela 1 – Anticorpos primários e controles positivos.....	48
Tabela 2 – Expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo.....	51
Tabela 3 – Expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre os subgrupos	52
Tabela 4 – Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

QA – Queilite Actínica
DOPM – Doença Oral Potencialmente Maligna
UV – Ultravioleta
CEL – Carcinoma Epidermoide de Lábio
OMS – Organização Mundial da Saúde
CTCs – Células-tronco Cancerígenas
CEB – Carcinoma Epidermoide Bucal
TEM – Transição epitélio-mesenquimal
OCT4 – *Octamer-binding Transcription Factor 4*
Sox2 – *Sex determining region Y-related Homo box gene 2*
HNK1 – *Human Natural Killer 1*
DEO – Displasia Epitelial Oral
GBD – Global Burden Diseases
INCA – Instituto Nacional do Câncer
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
HPV – Vírus do Papiloma Humano
CTNs – Células-tronco Normais
NK – *Natural Killer*
CCN – Células da Crista Neural
ENN – Epitélio Não Neoplásico
LPB – Laboratório de Patologia Bucal
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
PBS – Tampão fosfato
BR – Baixo Risco
AR – Alto Risco
BD – Bem diferenciado
MD – Moderadamente diferenciado
PD – Pobrementemente diferenciado
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
CEPSH – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

CO₂ – Dióxido de Carbono

μm – Micrômetros

°C – Graus Celsius

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

M – Molar

pH – Potencial hidrogeniônico

® – Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1	QUEILITE ACTÍNICA.....	18
3.2	CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO.....	23
3.3	CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS.....	27
3.4	OCT4 E SOX2.....	32
3.5	HNK1.....	36
4	METODOLOGIA EXPANDIDA.....	40
4.1	DELINEAMENTO.....	40
4.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	40
4.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	40
4.4	REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	40
4.5	AVALIAÇÃO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	42
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	ARTIGO.....	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
7	CONCLUSÕES.....	63
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO.....	70

1 INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma doença oral potencialmente maligna (DOPM) (Warnakulasuriya 2018), resultante da exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV) (Vieira, Minicucci et al. 2012), sendo o lábio inferior o mais frequentemente afetado (Vieira, Minicucci et al. 2012, Warnakulasuriya 2018).

Histologicamente, o epitélio da QA pode apresentar-se atrófico ou acantótico, queratinizado ou não queratinizado e com diferentes graus de displasia (Reibel 2017). A gravidade da displasia epitelial é, atualmente, o fator preditivo mais importante da transformação maligna (Mello, Melo et al. 2019), uma vez que o potencial de desenvolvimento de carcinoma invasivo aumenta com o aumento da gravidade dessa alteração (Vieira, Minicucci et al. 2012). O risco de transformação maligna é controverso entre os estudos e a estimativa é diferente para cada tipo de DOPM (Reibel 2017).

O tratamento da QA deve ser individualizado, levando em consideração a sua graduação histológica e os efeitos adversos das várias opções de tratamento (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015). Apesar da ampla gama de recursos terapêuticos, o diagnóstico e o tratamento precoces da QA são a forma mais eficaz de prevenir sua progressão para carcinoma epidermoide de lábio (CEL) (Lai, Pampena et al. 2019).

O CEL também possui como principal fator etiológico a exposição solar crônica (Rena, Lia et al. 2014, Shield, Ferlay et al. 2017) e cerca de 95% dos casos de CEL são precedidos por QA (Vieira, Minicucci et al. 2012). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o CEL é uma das lesões malignas mais frequentes da região oral e maxilofacial, sendo responsável por 25-30% de todos os cânceres orais e 12% de todos os cânceres de cabeça e pescoço (Vieira, Minicucci et al. 2012, Takata 2017, Lang, Akbaba et al. 2021).

O CEL em estágio inicial apresenta taxa de cura de 80 a 90% e taxa de mortalidade entre 10% e 15% (Vieira, Minicucci et al. 2012) e, quando não há envolvimento metastático dos linfonodos regionais, o prognóstico é bom (87 – 96% dos pacientes livres da doença em 5 anos) (Bhandari, Wang et al. 2015). No entanto, quando a metástase linfonodal se desenvolve, a taxa de sobrevivência cai para 30% a 70% (Rena, Lia et al. 2014, Lang, Akbaba et al. 2021).

A modalidade de tratamento do CEL é determinada de acordo com o estágio clínico da doença e diversos outros fatores, como manutenção da competência oral, mastigação, deglutição e articulação da fala (Omura 2014). Os CEL têm um prognóstico favorável em termos de sobrevida e são uma das malignidades da cavidade oral com maior chance de cura, no entanto, os CEL estão relacionados à diversas sequelas, a depender do diagnóstico e

tratamento precoce (Lang, Akbaba et al. 2021). Assim, diante da complexidade do câncer e das suas implicações, é sempre importante entender sua patogênese visando possibilidades de terapias mais eficazes e específicas.

Neste sentido, as células-tronco cancerígenas (CTCs), que representam uma pequena subpopulação de células do tumor (Simple, Suresh et al. 2015), vem sendo estudadas quanto ao seu papel no câncer. Estas células possuem três características principais: potente capacidade de iniciação tumoral; capacidade de autorrenovação *in vivo*, gerando um tumor quando implantadas em um organismo receptor; capacidade de diferenciação celular, resultando em um tumor composto por múltiplas progênies (Habu, Imanishi et al. 2015).

Recentemente, diversos estudos tentaram identificar marcadores de CTCs que possam ser usados para fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos (Simple, Suresh et al. 2015, Tahmasebi, Alikhani et al. 2020, Yu and Cirillo 2020). Muitos dos marcadores específicos de CTCs conhecidos foram identificados também em DOPMs, em diferentes tumores sólidos e em áreas histologicamente normais adjacentes ao tumor (Simple, Suresh et al. 2015).

As CTCs, devido às suas estratégias de defesa molecular e características fisiológicas, possuem uma resistência natural à radioterapia e quimioterapia convencionais. Portanto, a baixa sobrevida para o carcinoma epidermoide bucal (CEB) pode ser atribuída a uma seleção inadequada de células-alvo para o tratamento (González-Moles, Scully et al. 2013). Assim, é necessário considerar abordagens para o CEB direcionadas contra as CTCs, exigindo o desenvolvimento de estratégias para identificar e elucidar as vias moleculares dessa subpopulação, selecionando marcadores previsíveis e confiáveis com valor prognóstico e terapêutico (González-Moles, Scully et al. 2013, Patel, Shah et al. 2014, Yu and Cirillo 2020).

Os fatores de transcrição OCT4 e Sox2 são marcadores de células-tronco embrionárias e sua expressão já foi identificada em diversos cânceres, inclusive em CEB, no entanto os resultados acerca da sua participação na carcinogênese oral são controversos (Qiao, He et al. 2014). Por sua vez, HNK1 é um epítipo de carboidrato (Seiki, Oka et al. 1999) relacionado à migração celular durante o período embrionário (Shih, Schnaar et al. 1997, Minarcik, Golden et al. 2003) e também identificado em tecidos neoplásicos humanos (Ueda, Yamasaki et al. 1986, Shih, Schnaar et al. 1997), porém ainda sem investigação no campo do CEB. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar a presença dos marcadores imunohistoquímicos OCT4, Sox2 e HNK1 em CEL, QA e epitélio oral não neoplásico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão imuno-histoquímica de OCT4, Sox2 e HNK1 em queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio diagnosticados na Universidade Federal de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as QAs de acordo com seu grau de displasia epitelial utilizando o sistema Binário;
- Classificar os CEL de acordo com seu grau de diferenciação utilizando o sistema da OMS;
- Determinar a expressão imuno-histoquímica das proteínas OCT4, Sox2 e HNK1 em tecido não neoplásico, QA e CEL;
 - Comparar a expressão de cada uma das proteínas entre os grupos estudados;
 - Comparar a expressão de cada uma das proteínas com o grau de displasia epitelial, segundo a classificação binária, nas QA e com a diferenciação histopatológica nos CEL;
 - Correlacionar os níveis de expressão das proteínas OCT4, Sox2 e HNK1 entre si.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUEILITE ACTÍNICA

É sabido que o câncer bucal pode se desenvolver em áreas de mucosa com lesões pré-existentes. Na literatura, essas lesões já foram referidas como "lesão precursora", "lesões pré-cancerosas/pré-malignas" e "neoplasias intraepiteliais". No entanto, a OMS adotou o termo "doenças orais potencialmente malignas" (DOPM), uma vez que não se há certeza de que todas essas lesões acabarão se transformando em uma neoplasia maligna. O espectro de DOPMs bucais inclui, dentre outras lesões e condições, a leucoplasia, eritroplasia, eritroleucoplasia e a QA (Warnakulasuriya 2018).

A QA é resultante da exposição excessiva à radiação UV solar ou à radiação UV artificial (Vieira, Minicucci et al. 2012, Warnakulasuriya 2018), sendo o lábio inferior o mais frequentemente afetado - 95% dos casos (Vieira, Minicucci et al. 2012, Dancyger, Heard et al. 2018, Salgueiro, de Jesus et al. 2019). Comparado à pele, que absorve a maior parte da radiação UV principalmente através da melanina, o lábio é menos protegido devido ao seu epitélio de revestimento mais fino, fina camada de queratina, menor quantidade de melanina e menor secreção de glândulas sebáceas e sudoríparas, tornando-o mais vulnerável aos danos da radiação (Vieira, Minicucci et al. 2012).

A exposição ao sol é o fator etiológico mais importante para a QA, cujo desenvolvimento é dose-tempo dependente e está associado à idade, predisposição genética, latitude geográfica de residência, ocupação profissional, atividades de lazer e não uso de agentes protetores labiais (Dancyger, Heard et al. 2018, Warnakulasuriya 2018). Outros fatores de risco também são apontados, como baixo nível socioeconômico, tabagismo e má alimentação (Dancyger, Heard et al. 2018).

A apresentação clínica abrange uma variedade de características e inclui presença de manchas ou placas brancas, áreas eritematosas, secura do lábio, descamação, crostas, edema, perda da junção mucocutânea, atrofia epitelial e lesões ulcerativas (Warnakulasuriya 2018, Mello, Melo et al. 2019). Embora os achados clínicos não consigam distinguir de forma confiável a QA do CEL, a presença de ulceração, atrofia e sangramento podem ser sinais de QA de alto risco e progressão para CEL (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015). Em vista disso, a biópsia é recomendada para casos de QA em que há perda da nitidez da junção mucocutânea, alteração à palpação na textura do lábio, alteração na espessura da semimucosa e presença de

ulceração (Vieira, Minicucci et al. 2012). O diagnóstico definitivo da QA é baseado no exame histopatológico (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015).

Histologicamente, o epitélio da QA pode apresentar-se atrófico ou acantótico e queratinizado e exibir displasia (Reibel 2017, Salgueiro, de Jesus et al. 2019). A lâmina própria mostra uma área acelular basófila amorfa, chamada área de degeneração basofílica do colágeno (Salgueiro, de Jesus et al. 2019), e o tecido conjuntivo adjacente está permeado por infiltrado inflamatório de intensidade variável, composto predominantemente por linfócitos (Vieira, Minicucci et al. 2012). A atipia dos queratinócitos é o aspecto mais importante e se instala gradativamente no epitélio (Vieira, Minicucci et al. 2012). A displasia epitelial oral (DEO) é um espectro de alterações epiteliais arquiteturais e citológicas causadas pelo acúmulo de alterações genéticas, associadas a um risco aumentado de progressão para carcinoma epidermoide (Reibel 2017). Tais alterações não se distribuem uniformemente pelo vermelhão do lábio, mesmo nas lesões clinicamente homogêneas (Vieira, Minicucci et al. 2012).

O sistema binário proposto por Kujan et al. (2007), utilizando os critérios arquiteturais e citológicos descritos pela OMS em 2005 (Quadro 1), categoriza as displasias epiteliais em alto risco de malignidade (presença de ao menos quatro critérios arquiteturais e cinco critérios citológicos) e baixo risco (menos de quatro critérios arquiteturais e menos de cinco critérios citológicos) (Kujan, Khattab et al. 2007).

Quadro 1 – Critérios arquiteturais e citológicos para classificação da displasia epitelial na Classificação da OMS de 2005.

Critérios Arquiteturais	Critérios Citológicos
Estratificação epitelial irregular	Variação no tamanho do núcleo
Alteração da polaridade das células basais	Variação no formato do núcleo
Cristas epiteliais em forma de gota	Variação no tamanho da célula
Número aumentando de figuras mitóticas	Variação no formato da célula
Mitoses superficiais anormais	Alteração da proporção núcleo/citoplasma
Disceratose	Aumento no tamanho do núcleo
Pérolas de ceratina	Figuras de mitose atípicas
	Aumento no número e tamanho dos nucléolos
	Hipercromatismo nuclear

Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2005

Embora os critérios para determinação da displasia estejam bem definidos, existem dificuldades práticas na graduação da displasia epitelial devido ao seu contínuo processo de evolução, o que dificulta prever com segurança a evolução de todas as displasias epiteliais com base apenas na histopatologia (Pilati, Bianco et al. 2017). Ainda assim, a gravidade da displasia epitelial é atualmente o fator preditivo mais importante da transformação maligna, uma vez que o potencial de desenvolvimento de carcinoma invasivo aumenta com o aumento da gravidade dessa alteração (Vieira, Minicucci et al. 2012).

O risco de transformação maligna da QA é controverso entre os estudos, e a estimativa é diferente para cada tipo de lesão. Na 4ª edição (2017) da classificação de tumores de cabeça e pescoço, a OMS reconheceu que em algumas condições o risco de transformação maligna é extremamente baixo e até mesmo reversível (Reibel 2017). Para a leucoplasia, estima-se que a taxa de transformação global média seja de 1-2% (Reibel 2017). Já para a QA estima-se que a transformação maligna seja entre 10-30%, e que 95% dos CEL sejam originários desta lesão (Gonzaga, Mafra et al. 2019).

A QA pode ocorrer em qualquer idade, no entanto as alterações clínicas são mais comumente observadas a partir da 5ª década de vida, uma vez que os danos causados pela radiação solar acumulam-se ao longo dos anos (Vieira, Minicucci et al. 2012). Assim, a QA é frequentemente observada em pacientes do sexo masculino, com idade acima de 40 anos, de

pele clara e que possuem ocupações que os expõem por longos períodos à luz solar (Salgueiro, de Jesus et al. 2019). A prevalência global de QA tem sido relatada entre 0,45% e 2,4%, e quando investigada em populações envolvidas com atividades ao ar livre a prevalência relatada é de 4,2% a 43,2% (Dancyger, Heard et al. 2018).

No estado de Santa Catarina/Brasil, aproximadamente 84% da população acima de 15 anos é composta por indivíduos de pele clara e 15% vivem em áreas rurais com alta exposição solar, ambas características de pacientes portadores de QA. Além disso, algumas áreas desse estado são altamente afetadas pela radiação UV, apresentando média 6 (considerado alto) no índice de UV da OMS, podendo ser ainda maior no verão. Conseqüentemente, Santa Catarina tem uma das taxas mais altas de câncer de pele no Brasil (INCA 2021).

Apesar do diagnóstico clínico precoce da QA ser fácil, vários fatores são atribuídos ao diagnóstico tardio, como: não conhecimento da lesão por parte dos pacientes, aspecto clínico inicialmente inofensivo, ausência de dor e desconhecimento por parte de muitos profissionais que consideram como uma simples condição inflamatória crônica (Vieira, Minicucci et al. 2012). Por se desenvolver lentamente, esta lesão com frequência é vista, erroneamente, como uma característica comum do envelhecimento, o que também dificulta o seu diagnóstico, sendo negligenciada até que um estágio mais avançado seja alcançado, incluindo o desenvolvimento de câncer (Dancyger, Heard et al. 2018, Salgueiro, de Jesus et al. 2019).

O diagnóstico e o tratamento precoces da QA são a forma mais eficaz de prevenir sua progressão para CEL (Lai, Pampena et al. 2019). O tratamento da QA deve ser individualizado, considerando-se a gravidade histológica e os efeitos adversos das várias opções terapêuticas (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015). Além disso, ainda que a displasia epitelial seja o fator prognóstico mais importante para a transformação maligna, as características clínicas como aparência (homogênea vs. não homogênea), tamanho e localização também têm implicações para o manejo clínico (Reibel 2017).

O tratamento da QA é complexo devido à proximidade com a mucosa, finas camadas teciduais e por ser uma área esteticamente sensível (Trager, Farmer et al. 2021). Vários estudos compararam a eficácia dos tratamentos, no entanto ainda faltam evidências de alta qualidade para orientar a decisão terapêutica (Lai, Pampena et al. 2019).

A vermelhectomia convencional oferece o tratamento mais definitivo até o momento para a QA, no entanto, é reservado para os casos com displasia severa ou com CEL, devido aos eventos adversos significativos, incluindo formação de hematoma, eritema prolongado, edema, cicatrizes, restrição dos movimentos da boca e sensibilidade prejudicada (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015, Trager, Farmer et al. 2021).

Terapias não invasivas, como cirurgia parcial, criocirurgia, ablação a laser de CO₂, terapia fotodinâmica, dermoabrasão, aplicação tópica de quimioterápicos (5-fluorouracil, imiquimode a 5%), aplicação tópica de anti-inflamatórios (diclofenaco 3%), entre outros (Lai, Pampena et al. 2019), também têm sido indicadas para casos de QA com displasia leve e moderada, embora também apresentem efeitos adversos locais como eritema, edema, erosões e ulcerações, resultados insatisfatórios e falta de colaboração do paciente (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015).

No que tange as terapias não invasivas, brevemente, os últimos resultados apontam que:

- Dentre as terapias não invasivas, a cirurgia parcial tem demonstrado a melhor taxa de cura (100% dos casos), sem haver recorrências (Lai, Pampena et al. 2019);

- Os estudos que avaliaram lasers de alta potência, incluindo dióxido de carbono (CO₂), YAG e lasers de vaporização mostraram melhora clínica em 60% a 100% dos pacientes tratados. A melhora do quadro histopatológico também é relatada por muitos autores, com diminuição da presença de atipias, displasias e degeneração basofílica do colágeno. No entanto, quando comparados com lasers de baixa potência, lasers de alta potência resultam em efeitos colaterais mais graves como parestesia, granulação, disestesia, dor, sensação de queimação e edema (Salgueiro, de Jesus et al. 2019);

- A aplicação tópica de imiquimode já demonstrou cura em 73,3% dos casos, e a aplicação de 5-Fluoracil demonstrou cura em 75% dos casos, no entanto, cerca de 10% dos pacientes descontinuaram o tratamento com 5-Fluoracil devido aos efeitos adversos (dor, irritação, dificuldade para comer e falar) (Lai, Pampena et al. 2019, Salgueiro, de Jesus et al. 2019);

- A terapia fotodinâmica associada ao fotossensibilizante tópico ácido 5-aminolevulínico (ALA) ou 5-aminolevulinato de metila (MAL), alcançou cura em 60,25% dos casos. Os eventos adversos mais relatados foram dor e queimação durante e após o procedimento, no entanto estes efeitos ocorreram de forma mais severa em uma minoria dos participantes, e nestes casos os tratamentos foram interrompidos. As reações locais mais comumente reportadas foram: eritema, edema, erosão, formação de crostas, bolhas, descamação, coceira, parestesia e ressecamento leve, resolvendo-se no máximo em 2 semanas (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015);

- A aplicação tópica de diclofenaco 3% com ácido hialurônico 2,5% resultou em remissão completa das placas esbranquiçadas e áreas esfoliativas em 44% dos casos, e melhora do quadro clínico da QA em 56% dos pacientes. Já a aplicação tópica de diclofenaco 3% isolado

revelou melhora clínica em 66% dos casos. O diclofenaco em gel provocou edema, eritema e sensação de queimação em todos os pacientes (Salgueiro, de Jesus et al. 2019).

Apesar da ampla gama de recursos terapêuticos e dos resultados promissores, é importante ressaltar que qualquer tratamento só será eficaz se o paciente tomar conhecimento da importância da adesão às consultas regulares para o controle clínico eficaz da doença, bem como da proteção solar (Vieira, Minicucci et al. 2012).

3.2 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

As doenças crônicas não transmissíveis atualmente são responsáveis pela maioria das mortes no mundo, e acredita-se que o câncer venha a ser a principal causa de morte e a barreira mais importante para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo no século 21 (Bray, Ferlay et al. 2018). Neste contexto, é importante ressaltar que as neoplasias malignas da cavidade oral e faringe são o 7º câncer mais frequente e a 9ª causa de morte por câncer no mundo (Bosetti, Carioli et al. 2020).

Um estudo da *Global Burden of Disease* (GBD) (do inglês: Carga Global de Doenças) estimou 678.900 novos cânceres de lábio, cavidade oral e faringe em todo o mundo em 2017, sendo os cânceres de lábio e cavidade oral os mais frequentes (57,4%), seguidos pelos cânceres faríngeos (26,4%) e nasofaríngeos (16,2%) (Du, Nair et al. 2020). Globalmente, verificou-se o aumento de aproximadamente 109% no período de 1990 a 2017 nos casos de câncer de lábio e cavidade oral (Du, Nair et al. 2020), e para o ano de 2020 a GLOBOCAN previu 377,713 novos casos e 177,757 óbitos (Sung, Ferlay et al. 2021).

A incidência e a mortalidade do câncer de boca variam de acordo com a região do mundo (Bray, Ferlay et al. 2018). Nos Estados Unidos da América, este é o 13º câncer mais incidente e em 2017 foram registrados a ocorrência de 49.670 casos e 9.700 óbitos (Bhandari, Wang et al. 2015). Já no Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o ano de 2020 a ocorrência de 15.190 novos casos (11.180 em homens e 4.010 em mulheres) e em 2019 foram registrados 6.605 óbitos (5.120 homens e 1.485 mulheres) e mostrou que o câncer de boca é o quinto tumor mais frequente no sexo masculino (INCA 2021).

Estudos que estimaram as tendências temporais da incidência de câncer de cabeça e pescoço no período de 1990 a 2017, usando os dados do GBD, revelaram o aumento na incidência dos cânceres de lábio e cavidade oral, com importantes variações: maior incidência e maior variação anual de câncer de lábio e de cavidade oral no Sul e Leste Asiático,

respectivamente; diminuição da incidência em homens de países com alto nível sociodemográfico; maior aumento anual para mulheres comparado aos homens; maior variação anual para a população de 15–49 anos comparado ao grupo de 50–69 anos. Ainda assim, em todas as faixas etárias a incidência de cânceres de lábio e cavidade oral foram mais altas em homens (Aupérin 2020, Du, Nair et al. 2020).

O tipo histológico mais comum dos cânceres de lábio e cavidade oral é o carcinoma epidermoide, correspondendo a 90% dos casos (Rena, Lia et al. 2014, Takata 2017). O carcinoma epidermoide bucal (CEB) é uma malignidade com diferenciação escamosa originária do epitélio de revestimento da mucosa e apresenta alto índice de mortalidade e morbidade, a despeito dos avanços na pesquisa e no tratamento (Warnakulasuriya 2009).

Quanto às características histopatológicas, a maioria dos CEB é bem diferenciado ou moderadamente diferenciado, sendo incomum o carcinoma epidermoide pouco diferenciado. Os CEB bem diferenciados são caracterizados por ninhos, cordões e ilhas de células epiteliais neoplásicas exibindo pleomorfismo celular e nuclear, núcleos hipercromáticos, discretas figuras de mitose, pontes intercelulares proeminentes e abundante disceratose e pérolas de ceratina. O estroma é composto por tecido conjuntivo denso com abundante infiltrado inflamatório predominantemente crônico, e nos CEL observa-se também intensa degeneração basofílica do colágeno. O pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear e figuras mitóticas (incluindo formas atípicas) aumentam com o aumento do grau do tumor. Em CEB pouco diferenciado, as características de diferenciação escamosa são mínimas ou ausentes, exigindo confirmação imuno-histoquímica (Takata 2017, de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020).

Com relação ao CEL, as taxas de ocorrência a cada 100.000 habitantes estão em torno de 13,5 na Oceania, 12 na Europa e 12,7 na América do Norte (Lang, Akbaba et al. 2021). No Brasil, a ocorrência anual de CEL varia de 3,0 a 13,5/100.000 habitantes e, nas últimas décadas, especialmente a partir de 2000, houve aumento no número de casos de CEL e QA (de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020).

Os motivos pelos quais a incidência e a mortalidade do câncer estão crescendo são complexos, mas refletem tanto o envelhecimento quanto o crescimento populacional e uma interação entre maior necessidade/uso e acesso aos serviços de saúde, bem como mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco para o câncer (Bray, Ferlay et al. 2018, Du, Nair et al. 2020).

Ainda hoje o consumo de tabaco e álcool são os principais fatores de risco para os cânceres de cabeça e pescoço (Aupérin 2020, Bosetti, Carioli et al. 2020, Du, Nair et al. 2020), sendo atribuídos à 75% dos casos de CEB e faríngeo em países desenvolvidos (Shield, Ferlay

et al. 2017). Recentemente, uma metanálise comprovou o aumento no risco de desenvolvimento de CEB pelo consumo sinérgico de álcool e tabaco quando comparado ao uso isolado de tabaco, e demonstrou que o consumo exclusivo de álcool não implica risco aumentado para esta condição (Mello, Melo et al. 2019).

Outro importante fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma epidermoide na região de orofaringe é o HPV (vírus do papiloma humano) (Shield, Ferlay et al. 2017), em especial o HPV16 (80% a 90% dos casos) (Aupérin 2020, Mariz, Kowalski et al. 2020). Uma recente metanálise revelou a prevalência de HPV em 44,8% dos carcinomas epidermóides orofaríngeos, acometendo homens e mulheres em proporção semelhante, no entanto ainda é muito variável a prevalência de HPV reportada pela literatura (Mariz, Kowalski et al. 2020).

No que diz respeito aos CEL, a exposição solar crônica é o fator etiológico mais importante (Rena, Lia et al. 2014, Shield, Ferlay et al. 2017). Os danos desencadeados pela radiação ionizante são causados pela interação direta com as moléculas-alvo ou indiretamente pela formação de radicais livres, que possuem alta afinidade por elétrons e ligações de hidrogênio, sendo o DNA o alvo primário. A quantidade relativa das alterações moleculares depende do tipo, dose e tempo de exposição, bem como da sensibilidade das células afetadas nos vários estágios do ciclo celular e da capacidade de reparo do DNA (Vieira, Minicucci et al. 2012).

O Brasil é um país tropical onde muitos indivíduos trabalham em ocupações ao ar livre ou têm o hábito de exposição prolongada à radiação UV sem a utilização de agentes protetores, como protetores solares e chapéus, e assim tende a apresentar maior número de casos de CEL e QA devido à alta incidência solar. Estas peculiaridades, bem como a ampliação do acesso ao atendimento odontológico e a intensificação das campanhas de prevenção do câncer bucal e diagnóstico precoce em todo o país podem estar associadas ao aumento da incidência de CEL, bem como de QA (de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020).

O tabagismo tem sido sugerido como um dos principais fatores secundários para o desenvolvimento de CEL (de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020) devido à transferência de calor pelo uso de cachimbos ou o hábito de descansar o cigarro no lábio inferior enquanto fuma (Shield, Ferlay et al. 2017). Como o câncer é uma doença multifatorial, outros fatores também podem contribuir para o desenvolvimento da doença, como condições sociodemográficas, suscetibilidade genética e imunossupressão (Warnakulasuriya 2009, INCA 2021).

O CEL é uma das lesões malignas mais frequentes da região oral e maxilofacial, sendo responsável por 25-30% de todos os cânceres orais e 12% de todos os cânceres de cabeça e pescoço (Vieira, Minicucci et al. 2012, Takata 2017, Lang, Akbaba et al. 2021). Homens de

pele clara são mais frequentemente afetados (79,3% à 97,1% dos casos), e o local mais comumente acometido é o lábio inferior, responsável por mais de 90% dos casos (Unsal, Unsal et al. 2018, de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020). Enquanto a QA tem pico de incidência na quinta década de vida, o CEL possui pico entre sexta e a sétima décadas de vida, demonstrando o caráter crônico de aquisição do fenótipo maligno (de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020).

Cerca de 95% dos casos de CEL são precedidos por QA, e desta forma muitas características clínicas da QA se mantêm no CEL, o que dificulta a distinção entre estas duas entidades frente à um CEL em estágio inicial (Vieira, Minicucci et al. 2012). Os primeiros sinais clínicos do CEL incluem crostas ou úlceras assintomáticas e em estágio avançado pode ocorrer úlcera exofítica dolorosa, coberta por escamas e crostas, com bordas elevadas e base endurecida e que não cicatriza. Em contraste com os carcinomas epidermóides de outros subsítios da cavidade oral, as lesões labiais são diagnosticadas mais precocemente, mas ainda assim lesões em estágio inicial são frequentemente negligenciadas por serem assintomáticas, muitas vezes retardando o diagnóstico (de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020).

A taxa de sobrevida em 5 anos é em torno de 90% a 100% para os CEL em estágio inicial e sem metástases detectáveis (Vieira, Minicucci et al. 2012, Bhandari, Wang et al. 2015). Todavia, comparado à carcinomas epidermóides cutâneos de outras localizações da cabeça e pescoço, o CEL tem maior probabilidade de se tornar invasivo e metastático, sendo descrito na literatura taxas de metástase linfonodal até 4 vezes maior, com porcentagens de 5% a 20% a depender do tamanho e diferenciação do tumor (Abyaneh, Falto-Aizpurua et al. 2015, Unsal, Unsal et al. 2018, Trager, Farmer et al. 2021). Uma vez que a metástase linfonodal se desenvolve, a taxa de sobrevivência do CEL cai para 30% a 70% (Rena, Lia et al. 2014, Lang, Akbaba et al. 2021).

Ainda não há um tratamento ideal para o CEB, todos eles causam sequelas ao paciente, diminuindo sua qualidade de vida. A modalidade de tratamento é determinada em cada caso de acordo com o estágio clínico da doença e com diversos fatores, como a manutenção da competência oral, mastigação, deglutição e articulação da fala (Omura 2014). Tradicionalmente, o tratamento para CEB inclui uma estratégia multidirecional que pode conter cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia, e envolve profissionais de odontologia, oncologistas, internistas e assistentes sociais, entre outros (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020).

Para os CEL, a cirurgia é o tratamento de escolha para lesões em estágios iniciais (Rena, Lia et al. 2014, Lang, Akbaba et al. 2021). O tratamento cirúrgico requer uma ressecção de espessura total da pele, músculo e mucosa subjacente para permitir uma margem cirúrgica segura (INCA 2021). A remoção inadequada do tumor com permanência de células tumorais

resulta em riscos aumentados de recorrências locais e regionais, além da diminuição das taxas de sobrevivência a longo prazo, no entanto, aumentar as margens de ressecção pode resultar em aumento das morbidades estéticas e funcionais. Por ser um tratamento mutilador, com frequência é necessária cirurgia reconstrutiva para restaurar a função oral e a aparência estética após a ressecção do tumor primário (Omura 2014).

Em casos de doença avançada, margem de ressecção positiva ou disseminação extracapsular dos linfonodos envolvidos, a abordagem cirúrgica combinada com a radioterapia ou quimioterapia pós-operatória é utilizada para a diminuição do risco de recorrência local (Bhandari, Wang et al. 2015, Lang, Akbaba et al. 2021). A excisão de linfonodo regional é realizada quando há suspeita de metástase regional ou de forma rotineira para lesões em estágios III e IV (Vieira, Minicucci et al. 2012). As complicações agudas provocadas pela radioterapia em CEL incluem dermatite, mucosite oral, disfagia, xerostomia, edema e perda do paladar; nutrição de suporte via tubo gástrico percutâneo pode ser necessário em alguns casos durante o tratamento. As complicações tardias, por sua vez, compreendem dermatite, xerostomia e trismo (Lang, Akbaba et al. 2021).

As complicações orais agudas e crônicas concomitantes aos cânceres bucais como perda da função oral, desfiguração, baixa qualidade de vida e traumas psicossociais são frequentes durante e após o tratamento. Dado o papel complexo que os lábios desempenham em nosso senso de ser humano, bem como no funcionamento da cavidade oral, qualquer efeito adverso relacionado ao tratamento desempenha um papel crucial na qualidade de vida, ressaltando a importância de examinar os efeitos colaterais agudos e de longo prazo (Lang, Akbaba et al. 2021).

O CEL tem um prognóstico favorável em termos de sobrevida e é um dos tumores mais curáveis da cavidade oral, no entanto, a sua ocorrência está atrelada à diversas sequelas, a depender do diagnóstico e tratamento precoce (Lang, Akbaba et al. 2021). Assim, diante da complexidade do câncer e das suas implicações, é sempre importante entender sua patogênese visando possibilidades de terapias mais eficazes e específicas.

3.3 CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS

O processo de carcinogênese oral requer várias etapas para a transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica. Dois modelos distintos tentam explicar o desenvolvimento e manutenção do crescimento tumoral e da sua heterogeneidade: o modelo

estocástico (evolução clonal) e o modelo de CTCs (González-Moles, Scully et al. 2013, Major, Pitty et al. 2013).

No **modelo estocástico** a transformação maligna surge a partir de mutações aleatórias que podem afetar qualquer célula (González-Moles, Scully et al. 2013, Major, Pitty et al. 2013). A evolução subsequente do tumor resulta da progressão clonal da progênie celular mutante que adquire uma vantagem proliferativa com conseqüente instabilidade genômica, levando ao acúmulo de eventos epigenéticos e genéticos e a seleção de subclones progressivamente mais agressivos (González-Moles, Scully et al. 2013, Simple, Suresh et al. 2015). Neste modelo de carcinogênese, o início do desenvolvimento do tumor é explicado por duas teorias:

- A teoria da **“origem monoclonal”** defende que a lesão se origina a partir de uma única célula que sofreu transformação maligna e a sua progênie é a responsável pela expansão do tumor. O desenvolvimento de diferentes características fenotípicas e proliferativas pelos subclones seria responsável pela heterogeneidade tumoral e é conseqüência do acúmulo de alterações epigenéticas e genéticas (González-Moles, Scully et al. 2013, Simple, Suresh et al. 2015);

- A teoria da **"origem policlonal"** propõe que células de diferentes locais da mucosa passam por uma transformação gradual por meio de alterações moleculares independentes mediadas por carcinógenos. Assim, mutações ocorrem em múltiplos locais do epitélio, levando ao surgimento de carcinomas multifocais ou lesões de origem independente. Esses tumores que surgem em campos adjacentes são, portanto, geneticamente diferentes, e podem coalescer em uma só lesão (Simple, Suresh et al. 2015).

No entanto, a teoria estocástica apresenta algumas inconsistências, por exemplo: como as células somáticas diferenciadas têm um tempo de vida limitado, seria teoricamente impossível para qualquer célula adquirir todas as mutações necessárias para a transformação maligna; ainda, tem sido sugerido que o câncer pode não ser simplesmente causado pelo acúmulo de mutações ao longo do tempo (Wang, Shigdar et al. 2015).

Uma explicação razoável que sustenta o modelo estocástico é que provavelmente a mutação inicial confere à célula alta capacidade de proliferação, proporcionando tempo de vida longo o suficiente para adquirir as demais mutações até a transformação maligna. Seguindo essa lógica, espera-se que todas as células cancerígenas em um tumor sejam semelhantes e, em princípio, cada célula tumoral viável seria igualmente capaz de formar um novo tumor. No entanto, já foi demonstrado que, normalmente, mais de 10.000 células cancerosas são necessárias para iniciar tumores de forma reprodutível em camundongos imunocomprometidos (Wang, Shigdar et al. 2015).

O **modelo de CTCs**, por sua vez, é baseado em evidências experimentais que demonstram diferentes funções entre as células cancerosas, semelhante aos tecidos normais, com algumas células indiferenciadas - as CTCs - no topo da hierarquia. As CTCs possuem capacidade de se autorrenovar indefinidamente e apresentam divisão assimétrica, que, além da autorrenovação, é responsável por dar origem a células-filhas diferenciadas que compõem a maior parte do tumor (González-Moles, Scully et al. 2013, Simple, Suresh et al. 2015, Wang, Shigdar et al. 2015). As CTCs são específicas do tecido e atualmente este modelo levanta a questão de quais são as células iniciadas pelo processo de carcinogênese. Dentre as possibilidades descritas na literatura, duas se destacam:

- Considerando que na mucosa oral as células epiteliais diferenciadas têm uma alta taxa de renovação (cerca de 14 dias), é provável que as células-tronco normais (CTNs), residentes de longo prazo do epitélio, sejam as células com maior chance de acumular as alterações genéticas necessárias para transformação maligna (González-Moles, Scully et al. 2013, Simple, Suresh et al. 2015). Uma outra razão para considerar as CTNs como a origem das CTCs é que ambas possuem capacidade de autorrenovação, e a desregulação deste processo é um evento precoce e importante na carcinogênese; desta forma, as CTCs se apropriariam dos mecanismos celulares de autorrenovação das CTNs (González-Moles, Scully et al. 2013).

- As CTCs podem ter se originado a partir de células tumorais maduras que sofreram dediferenciação em uma célula-tronco por meio de modificações nas vias de sinalização e mecanismos regulatórios. Outra possibilidade é a dediferenciação de células epiteliais maduras resultante de eventos oncogênicos, levando à recuperação da capacidade de autorrenovação e perda da capacidade de diferenciação terminal. Em seguida, estas células podem adquirir mutações adicionais, levando-as à transformação maligna (González-Moles, Scully et al. 2013, Simple, Suresh et al. 2015). Desta forma, o termo células-tronco cancerígenas refere-se às propriedades funcionais das células e não à sua origem (Major, Pitty et al. 2013).

Ainda hoje ambos os modelos, estocástico e de CTCs, compõem teorias que estão sendo exploradas. Sabe-se que o CEB consiste de uma população heterogênea de células composta por três populações distintas: as células tumorais altamente diferenciadas, as células amplificadoras transitórias com capacidade de proliferação e uma pequena subpopulação de células com capacidade elevada de autorrenovação e plasticidade, denominadas CTCs (de Vicente, Donate-Pérez del Molino et al. 2019). Assim como as CTNs são mantidas em microambientes especializados, chamados nichos de células-tronco, acredita-se que as CTCs residam em regiões anatomicamente distintas dentro do tumor, estabelecendo nichos de CTCs (Oshimori 2020).

Já está bem estabelecido que o microambiente tumoral contribui para a progressão tumoral. Nesta perspectiva, os nichos de CTCs são propostos como microambientes específicos que regulam, através de sinalizações celulares provenientes do próprio nicho, o estado indiferenciado, a capacidade de autorrenovação e de sobrevivência das CTCs, e as propriedades malignas de suas progênes. Vasos sanguíneos, células do sistema imunológico, fibroblastos e outras células são também regulados e participam deste nicho. A composição celular, os fatores de sinalização e as proteínas da matriz extracelular tornam o nicho de CTCs molecularmente distinto (Wang, Shigdar et al. 2015, Oshimori 2020).

As CTCs possuem três características principais: potente capacidade de iniciação tumoral, regenerando o tumor do qual foi derivado a partir de um número limitado de células; capacidade de autorrenovação *in vivo*, gerando um tumor quando implantadas em um organismo receptor; capacidade de diferenciação celular, resultando em um tumor composto por múltiplas progênes maduras (Habu, Imanishi et al. 2015). Em suma, as CTCs possuem alta capacidade de tumorigenicidade, autorrenovação e diferenciação celular (Simple, Suresh et al. 2015).

Por meio de um processo de diferenciação aberrante, as CTCs dão origem a populações de células tumorais fenotipicamente diferentes. Assim, os tumores são histologicamente heterogêneos, com áreas que podem apresentar diferentes graus de diferenciação; são também geneticamente heterogêneos, com áreas que apresentam diferentes expressões gênicas e geram perfis heterogêneos de expressão proteica; e, finalmente, as células tumorais são funcionalmente heterogêneas em termos de sua capacidade de gerar novos tumores (González-Moles, Scully et al. 2013, Major, Pitty et al. 2013). Esta ampla heterogeneidade intratumoral pode ser uma das causas de resistência à terapia e um fator limitante na sobrevivência do paciente (Oshimori 2020).

Além das características já descritas, as CTCs desempenham um papel crítico na interação com a matriz extracelular, na transição epitélio-mesenquimal (TEM), migração celular (Simple, Suresh et al. 2015, Tahmasebi, Alikhani et al. 2020), angiogênese (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020) e possuem capacidades aprimoradas de resistência ao estresse (incluindo danos ao DNA, respostas à antioxidantes e à hipóxia e sinalização molecular relacionada com resistência à drogas), evasão imune e metástase. No entanto, o exato papel patogênico destas células ainda é desconhecido, e por isso é necessário compreender os mecanismos regulatórios e as vulnerabilidades das CTCs para o desenvolvimento de um tratamento direcionado à estas células (Oshimori 2020), tendo em vista que as atuais terapias para o CEB são geralmente destinadas à massa tumoral como um todo (González-Moles, Scully et al. 2013).

Independentemente da origem das CTCs, as evidências confirmam que, na maioria dos tumores sólidos, incluindo os tumores da cavidade oral, estas células são as responsáveis pela iniciação do tumor, bem como pela sua diferenciação, manutenção, crescimento, disseminação (Simple, Suresh et al. 2015, Yu and Cirillo 2020), contribuindo com comportamentos agressivos da lesão, como resistência à quimioterapia e radioterapia (Patel, Shah et al. 2014, Habu, Imanishi et al. 2015, Tahmasebi, Alikhani et al. 2020), metástase e recidiva (Habu, Imanishi et al. 2015, Tahmasebi, Alikhani et al. 2020).

Os marcadores de CTCs não são universais para todos os tipos de cânceres, portanto presume-se que eles sejam específicos do tipo de tumor e do microambiente de cada tipo de CTC. Bonnet e Dick, em 1997, foram os primeiros a documentar que apenas um pequeno grupo de células tumorais na leucemia mieloide aguda humana, com fenótipo CD34+/CD38-, eram capazes de gerar a doença quando transplantadas em camundongos, e concluíram que as células da leucemia mieloide aguda humana possuem organização hierárquica e são provenientes de células hematopoiéticas primitivas (Bonnet and Dick 1997). Al-Hajj et al. foram os primeiros a revelar a presença de CTCs em tumores sólidos (câncer de mama), demonstrando que apenas as células com expressão CD44+/CD24- eram capazes de formar um novo tumor (Al-Hajj, Wicha et al. 2003). Desde então, CTCs foram identificadas e isoladas em vários tumores sólidos, incluindo tumores de cérebro, próstata, pulmão, cólon, pâncreas, fígado, pele e de cabeça e pescoço (Patel, Shah et al. 2014).

Diversos estudos tentaram identificar marcadores de CTCs com finalidade diagnóstica, prognóstica e terapêutica (Yu and Cirillo 2020). No entanto, muitos dos marcadores específicos de CTCs conhecidos foram também identificados em tecidos de DOPM, em diferentes tumores sólidos, em áreas histologicamente normais adjacentes ao tumor e em tecidos normais (Simple, Suresh et al. 2015, Wang, Shigdar et al. 2015). Em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, populações de CTCs foram isoladas usando CD24, CD44, CD133, ALDH1, CD271, Sox2, Nanog, OCT4, Nestin, entre outros (Patel, Shah et al. 2014, Habu, Imanishi et al. 2015). Tais resultados sugerem que mesmo um único tipo de tumor pode apresentar diferentes marcadores (Habu, Imanishi et al. 2015).

Apesar dos avanços realizados na identificação dos mecanismos moleculares da tumorigênese, ainda existe um longo caminho pela frente para que os marcadores de CTCs sejam utilizados de forma prática e rotineira no manejo de cânceres orais (Tahmasebi 2020). Neste sentido, é necessário considerar abordagens para o CEB direcionadas contra as CTCs, exigindo o desenvolvimento de estratégias para identificar e elucidar as vias moleculares das CTCs, selecionando marcadores previsíveis e confiáveis com valor prognóstico e terapêutico

(González-Moles, Scully et al. 2013, Patel, Shah et al. 2014, Yu and Cirillo 2020). Assim, a identificação de biomarcadores associados à CTCs é fundamental (Yu and Cirillo 2020).

3.4 OCT4 E SOX2

OCT4 (*do inglês*, octamer-binding transcription factor 4) é um fator de transcrição membro da família de fatores de transcrição regulados pelos genes Pit-Oct-Unc (Huang, Xu et al. 2014, Wasik, Grabarek et al. 2014, Tahmasebi, Alikhani et al. 2020), conhecido pela sua importante contribuição na manutenção do estado pluripotente e indiferenciado de células-tronco embrionárias (Swain, Thakur et al. 2020, Yu and Cirillo 2020). O OCT4 é expresso pela primeira vez durante a embriogênese no estágio de desenvolvimento de quatro células e continua a ser expresso na massa celular interna do blastocisto, células germinativas e células epiblasticas. Em caso de redução da expressão de OCT4 pela metade, ocorre indução de diferenciação das células-tronco embrionárias (Swain, Thakur et al. 2020).

Por sua vez, Sox2 (*do inglês*, *sex-determining region Y-box 2*) (Ghazi, Aali et al. 2020) é uma proteína pertencente à família dos fatores de transcrição do grupo de alta mobilidade, fundamental para o desenvolvimento inicial, manutenção do estado indiferenciado e autorrenovação de células-tronco embrionárias (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020) e de células progenitoras neurais (Yu and Cirillo 2020), interagindo com outros fatores de transcrição e moléculas críticas de sinalização celular (Patel, Shah et al. 2014). Sox2 compartilha sítios de ligação de DNA com OCT4, promovendo um efeito sinérgico pela formação de um heterodímero na regulação de seus genes-alvo e, juntos, contribuem para a preservação da estabilidade e capacidade de autorrenovação de células-tronco embrionárias e adultas (Huang, Xu et al. 2014, Wasik, Grabarek et al. 2014, Swain, Thakur et al. 2020). Ainda, OCT4 e Sox2, juntamente com os fatores de transcrição c-Myc e Klf4, compõe os chamados “fatores de Yamanaka”, e estão implicados na formação de células-tronco pluripotentes induzidas (Wasik, Grabarek et al. 2014). Devido à íntima relação entre OCT4 e Sox2, suas características serão descritas em conjunto.

As células cancerosas e as CTNs compartilham certas características, como a capacidade de autorrenovação e a expressão de certos fatores de células-tronco, incluindo os fatores de Yamanaka. Muitas das vias que estão alteradas nas células cancerosas regulam as funções das células-tronco embrionárias e adultas. Assim, os fatores de reprogramação (fatores de Yamanaka) são também proto-oncogenes e podem afetar diretamente e indiretamente a

proliferação celular, estando associados a um alto nível de instabilidade genômica (Wasik, Grabarek et al. 2014).

Neste sentido, OCT4 é também reconhecido por ter um papel significativo na carcinogênese participando da reprogramação celular (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020) e, em tumores de cabeça e pescoço, o OCT4 foi relacionado com iniciação (Wasik, Grabarek et al. 2014) e transformação tumoral, progressão, invasividade (Major, Pitty et al. 2013, Wasik, Grabarek et al. 2014), metástase (Wasik, Grabarek et al. 2014, Yu and Cirillo 2020) e resistência ao tratamento (Patel, Shah et al. 2014), evidenciando um mau prognóstico, especialmente quando co-expresso com outros marcadores de CTCs (Major, Pitty et al. 2013, Yu and Cirillo 2020).

Por sua vez, há evidências de que Sox2 contribua para a manutenção do estado indiferenciado de CTCs (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020, Yu and Cirillo 2020), proliferação, invasão e migração celular e resistência contra apoptose (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020). A superexpressão de Sox2 foi observada em tumores de linhagem escamosa, como carcinomas de células escamosas do pulmão e esôfago, mas não em adenocarcinoma de pulmão ou esôfago, o que sugere seu uso como um marcador específico de linhagem para células-tronco escamosas (Major, Pitty et al. 2013, Patel, Shah et al. 2014).

Os estudos publicados até o momento avaliando a expressão de Sox2 e sua relevância clínica e prognóstica no CEB levaram a resultados contraditórios (de Vicente, Donate-Pérez del Molino et al. 2019), no entanto há diversos trabalhos apontando que a expressão aumentada de Sox2 está relacionada à iniciação, transformação e progressão do tumor, recorrência, metástase, resistência à quimio e radioterapia e mau prognóstico (Tahmasebi, Alikhani et al. 2020), porém sem ainda compreender bem os seus mecanismos (de Vicente, Donate-Pérez del Molino et al. 2019).

Cai et al. (2016) avaliaram a capacidade de tumorigênese de células imortalizadas provenientes de epitélio de mucosa oral e reprogramadas para expressão de OCT4+, Sox2+ e OCT4+/Sox2+, e verificaram que, após enxertadas em animais, apenas estas últimas foram capazes de gerar um tumor com capacidade de invasão, visualizada no exame histopatológico. Também foi avaliada a capacidade de tumorigênese de células provenientes de linhagem de CEB e verificou-se que a eliminação da expressão de OCT4+/Sox2+ ou de Sox2 isoladamente promoveu igualmente a inibição tumoral *in vivo* e a formação de carcinoma bem diferenciado; em contraste, a eliminação da expressão de OCT4 isoladamente resultou no aumento do tamanho do tumor *in vivo* e na formação de carcinoma de pobremente diferenciado. A partir disto, concluiu-se que a inibição de Sox2, e não de OCT4, deve ser um alvo terapêutico para o

CEB, e que OCT4 pode ter duplo caráter (oncogene ou supressor de tumor) no desenvolvimento de CEB (Cai, He et al. 2016).

Da mesma forma, o estudo de Liang et al. (2019) revelou que a supressão de Sox2 suprimiu a carcinogênese e a recorrência de CEB. Ademais, a superexpressão de Sox2 foi associada a CEB avançados e metastáticos e à resistência ao tratamento quimioterápico (Liang, Deng et al. 2019). O estudo de Huang et al. (2014) revelou a superexpressão de Sox2 e OCT4, com correlação significativa, em carcinoma epidermoide de língua e demonstrou que a superexpressão de Sox2 é um fator prognóstico independente da sobrevida global, associado à baixa sobrevivência (Huang, Xu et al. 2014).

Ghazi et al. (2020) revelaram, após análise por qRT-PCR, que a expressão de OCT4 e Sox2 foi significativamente maior em CEB comparado à displasia epitelial oral, porém sem correlação significativa e que ambas as proteínas tiveram expressão significativamente maior em carcinoma pouco diferenciado comparado aos carcinomas moderadamente e bem diferenciados, com correlação significativa. Contudo, não houve diferença significativa entre o estágio clínico do tumor e a expressão de OCT4 e Sox2. Com isso, inferiu-se que o aumento da expressão de OCT4 e Sox2 da mucosa displásica para o CEB está implicado no processo de carcinogênese da mucosa oral (Ghazi, Aali et al. 2020).

De forma semelhante, Qiao et al. (2014) analisaram, por imuno-histoquímica, a expressão de OCT4 e Sox2 em mucosa oral normal e mucosa oral em transformação maligna após aplicação de carcinógeno por 6 semanas. As proteínas foram detectadas isoladamente em ambos os tecidos, porém a sua co-expressão foi verificada apenas na mucosa em transformação maligna. Assim, os autores sugeriram que este perfil de expressão esteja implicado na transformação maligna das células epiteliais e seja utilizado como biomarcador de CTCs. Além disso, após avaliar a expressão destes marcadores em tecidos humanos de DOPM, CEB no sítio primário e em metástase linfonodal, os autores concluíram que a expressão de Sox2 possui correlação significativa com metástase linfonodal, ao contrário da expressão de OCT4 (Qiao, He et al. 2014).

Em conformidade, o trabalho de Luiz et al. (2018) revelou que a expressão de Sox2, avaliada por imuno-histoquímica, é significativamente maior em casos de leucoplasia oral comparado ao tecido de mucosa oral saudável. Neste trabalho não foi avaliado a expressão de Sox2 em CEB e a partir dos resultados encontrados os autores sugeriram a contribuição da expressão de Sox2 na patogênese das lesões leucoplásicas (Luiz, Modolo et al. 2018).

De Vicente et al. (2019) mostraram, após avaliação imuno-histoquímica de leucoplasias intraorais, que a expressão de Sox2 aumenta significativamente com o grau de

displasia e prevê significativamente o risco de câncer oral. No entanto, a expressão de Sox2 em CEB foi detectada principalmente em tumores em estágios iniciais e com ausência de metástase linfonodal, sendo associada à uma melhor sobrevida, embora sem significância estatística. Contrariamente aos estudos anteriores, no estudo de De Vicente et. al. (2019) não houve correlação significativa entre a expressão de Sox2 e metástases em linfonodos cervicais, estágio da doença, grau histológico, recorrência tumoral e desenvolvimento de um segundo carcinoma primário. Os autores apontam que a expressão de Sox2 surge como um importante determinante na patogênese do CEB, contribuindo para o início do tumor e assim poderia ser utilizado como um biomarcador para avaliação de risco de câncer oral (de Vicente, Donate-Pérez del Molino et al. 2019). De forma semelhante, o trabalho de Pradhan, Guddattu e Solomon (2019) demonstrou que pacientes com CEB apresentando alta expressão de Sox2 tiveram períodos mais longos de sobrevida livre de doença (Pradhan, Guddattu et al. 2019).

Por sua vez, Verma e Chandrashekar (2019) avaliaram a expressão de Sox2 em displasias orais e revelaram que embora tenha havido associação significativa da expressão de Sox2 com o grau de displasia, a associação de sua expressão com a transformação em CEB não foi estatisticamente significativa (Verma, Chandrashekar et al. 2019).

Contrariamente, Naini et al. (2019) identificaram semelhante expressão de OCT4 e NANOG em tecido neoplásico e tecido não-neoplásico adjacente ao CEB, no entanto a expressão de Sox2 foi significativamente maior no tecido não-neoplásico adjacente ao CEB. Além disso, não houve associação entre os marcadores estudados com metástase linfonodal, ou com o estágio do tumor e grau histopatológico. Os resultados encontrados para Sox2 podem indicar alterações moleculares primárias semelhantes aos tecidos pré-neoplásicos, demonstrando seu possível envolvimento na carcinogênese de tumores epidermóides, ou ainda pode indicar a presença de células epiteliais precursoras normais com expressão de Sox2 em maior quantidade no tecido adjacente ao tumor comparado ao tecido tumoral (Naini, Shakib et al. 2019).

Neste sentido, o ensaio de Fu et al. (2016) revelou que a expressão de OCT4 foi significativamente maior em tecidos normais adjacentes ao tumor e em tecidos normais comparados à tecidos neoplásicos, e a expressão de Sox2 foi significativamente maior em tecidos normais adjacentes ao tumor comparado à tecidos normais e neoplásicos. A expressão aumentada de OCT4 e Sox2 teve associação significativa com o estágio patológico inicial da doença, pequeno tamanho de tumor, ausência de metástases linfonodal e melhor prognóstico para pacientes com CEB (Fu, Hsieh et al. 2016). Em conformidade, Attramadal et al. (2015) revelaram que a alta expressão nuclear de Sox2 em CEB está associada a um período livre de

doença consideravelmente mais longo do que os carcinomas com baixa expressão de Sox2 após radioterapia pós-operatória (Attramadal, Halstensen et al. 2015).

Ainda hoje são escassos os ensaios que avaliaram a expressão de OCT4 e Sox2 em CEB e os resultados apresentados são discrepantes. Além disso, não há na literatura estudos acerca da expressão destes marcadores em lesões malignas e potencialmente malignizáveis de lábio. Tais lesões diferem das lesões intraorais porque são causadas principalmente pela radiação UV (Dancyger, Heard et al. 2018) e, portanto, o papel das CTCs e seus marcadores pode diferir das lesões intraorais, sendo necessário a investigação nestas lesões.

3.5 HNK1

HNK1 (*do inglês*, human natural killer-1) é um epítipo de carboidrato (Seiki, Oka et al. 1999) formado por um ácido glucurônico sulfatado ligado à N-acetilactosamina (Morita, Kakuda et al. 2009), biossintetizado pelas enzimas glucuroniltransferases (GlcAT-P, GlcAT-S e GlcAT-D) e sulfotransferase (HNK1ST) (Terayama, Oka et al. 1997, Seiki, Oka et al. 1999, Shimoda, Tajima et al. 1999).

Também conhecido como CD57 ou Leu-7, o HNK1 foi evidenciado primeiramente em células humanas por um anticorpo monoclonal criado contra células *natural killer* (NK) (Schachner, Martini et al. 1995, Suzuki-Anekoji, Suzuki et al. 2011, Castillo, Kleene et al. 2021) e está presente em células NK em diferenciação terminal, em células T ativadas, incluindo células T CD4+/CD57+ e CD8+/CD57+, que não têm capacidade proliferativa, mas são capazes de secretar citocinas (Casado, Delgado et al. 2008, de Sousa Lopes, da Silva Barros et al. 2017, Elahi and Rakhshan 2020). Ainda, HNK1 é expresso em um grande número de moléculas de adesão celular e moléculas de matriz extracelular (Seiki, Oka et al. 1999, Morita, Kakuda et al. 2009).

Os carboidratos conjugados às glicoproteínas e glicolipídios de superfície celular modulam uma variedade de atividades, incluindo reconhecimento celular, adesão célula-célula e célula-matriz extracelular (Terayama, Oka et al. 1997), e por isso estão envolvidos em uma ampla gama de funções na embriogênese, inflamação, resposta imune e carcinogênese (Shih, Schnaar et al. 1997). O HNK1 é expresso em glicolipídeos, glicoproteínas N-glicanos e O-glicanos, proteoglicanos, fibronectina do sistema nervoso, em glicoproteínas de adesão da superfície celular, como molécula de adesão celular neural (N-CAM), glicoproteína associada

à mielina e contactina (Shih, Schnaar et al. 1997, Casado, Delgado et al. 2008, Suzuki-Anekoji, Suzuki et al. 2011).

Nos primórdios do desenvolvimento embrionário a expressão de HNK1 tem um importante papel no processo de implantação do blastocisto e desenvolvimento da placenta (Shih, Schnaar et al. 1997). Em seguida, o HNK1 é expresso em células da crista neural (CCN) quando estas emergem do tubo neural e durante a migração celular. As CCN são de origem ectodérmica e constituem uma população celular transitória que migra para todo o corpo. Na região craniofacial estas células se dispersam no mesênquima e dão origem a tecidos mesenquimais como osso, cartilagem e tecido conjuntivo, além dos derivados da crista neural encontrados na região do tronco (Minarcik, Golden et al. 2003). Nesta fase, HNK1 possui um singular padrão de expressão têmporo-espacial no sistema nervoso central e periférico (Schachner, Martini et al. 1995), estando presente em células migratórias da crista neural, neurônios cerebelares, neurônios motores mielinizados, gânglios neurais e células de Schwann (Shimoda, Tajima et al. 1999, Minarcik, Golden et al. 2003, Suzuki-Anekoji, Suzuki et al. 2011).

Durante a odontogênese e osteogênese dos maxilares, HNK1 está presente em células indiferenciadas, e em estágios avançados de desenvolvimento está presente em osteoblastos, odontoblastos, células epiteliais, ameloblastos de germes dentários (Tomazelli, Modolo et al. 2015), e em células osteogênicas, osteoblastos e osteócitos durante a regeneração óssea após injúrias (Stuepp, Modolo et al. 2020). Neste sentido, diversos estudos apontam que HNK1 regula as interações de moléculas de adesão, controlando suas funções, e desempenha um papel crítico na interação célula-célula, célula-matriz extracelular e na migração celular (Casado, Delgado et al. 2008, Morita, Kakuda et al. 2009, Suzuki-Anekoji, Suzuki et al. 2011).

A expressão de HNK1 já foi também evidenciada em tecidos neoplásicos humanos, como em carcinomas de pequenas células do pulmão (Bunn, Linnoila et al. 1985), coriocarcinomas (Shih, Schnaar et al. 1997), tumores neuroectodérmicos (Caillaud, Benjelloun et al. 1984) e tumores ginecológicos (carcinoma de células pequenas, adenocarcinomas, carcinoma endometriode) (Ueda, Yamasaki et al. 1986).

Em melanomas cutâneos, a expressão de HNK1 foi identificada em tumores primários e em células metastáticas distantes do tumor primário, porém a expressão foi ausente nas células neoplásicas de metástases em linfonodos e em lesões pigmentadas benignas. Assim, foi sugerido o uso da expressão de HNK1 como um marcador de mau prognóstico (Thies, Schachner et al. 2004). Ademais, em culturas celulares de melanoma altamente invasivos verificou-se que o bloqueio de HNK1 reduziu a adesão das células à matriz extracelular,

especialmente à laminina e ao colágeno IV e, conseqüentemente, reduziu a capacidade migratória e invasiva das células neoplásicas (Casado, Delgado et al. 2008).

Em contraste, a expressão de HNK1 em tumores astrocíticos de pacientes humanos foi inversamente correlacionada com a agressividade da doença e a sua superexpressão foi positivamente associada ao aumento da sobrevida. Quando células de glioma HNK1 positivas foram injetadas em cérebro de rato, os tumores resultantes foram 60% menores e as células proliferaram mais lentamente comparado aos tumores gerados por células HNK1 negativo. Deste modo, os autores apontaram HNK1 como um supressor de tumor (Suzuki-Anekoji, Suzuki et al. 2011).

Em carcinoma de próstata, tumores bem diferenciados apresentaram superexpressão significativa de HNK1 quando comparados a tumores pobremente diferenciados. Além disso, tempos de sobrevida mais longos e maiores intervalos livres de progressão da doença foram observados em pacientes com superexpressão de HNK1. A partir disso, foi sugerido que a expressão de HNK1 em carcinoma de próstata pode ser um fator prognóstico útil (Liu, Yoshiki et al. 1993). Em conformidade, Wangerin et al. (2014) demonstraram que 87% dos carcinomas de próstata avaliados apresentaram expressão moderada ou forte de HNK1 (CD57), porém não houve diferença significativa quando comparado ao tecido prostático benigno. Além disso, verificou-se que com o crescimento do tumor (estágio clínico) ou evolução de um carcinoma bem diferenciado para um carcinoma pobremente diferenciado a expressão de HNK1 foi gradualmente perdida (Wangerin, Kristiansen et al. 2014).

Os anticorpos contra HNK1 são rotineiramente usados para detectar células NK ou células de origem neural/neuroendócrina. No entanto, existem apenas poucos relatos, com um pequeno número de pacientes cada, sobre a frequência e as características da expressão deste marcador em câncer (Wangerin, Kristiansen et al. 2014). À exemplo disso, em CEB, a expressão de HNK1 foi avaliada apenas em células inflamatórias compondo o microambiente tumoral. Nesta perspectiva, Elahi et al. (2020) reportaram associação positiva entre a sobrevida e a expressão diminuída de HNK1 (CD57), CD16 e MED15 em células imunes, avaliados por qRT-PCR em tecido tumoral de CEB *versus* tecido normal adjacente (Elahi and Rakhshan 2020). Por sua vez, de Souza Lopes et al. (2017) e Zancope et al (2010) revelaram não haver associações significativas entre células imunes HNK1+ e fatores clínico-patológicos, como a graduação histológica e tamanho do tumor, avaliados em CEB por imuno-histoquímica (Zancope, Costa et al. 2010, de Sousa Lopes, da Silva Barros et al. 2017).

Apesar do importante papel de HNK1 na diferenciação e migração celular, são escassos os estudos que avaliam a sua participação na carcinogênese, e não há na literatura

trabalhos que discorram sobre a sua distribuição na QA e no CEB. Além disso, uma vez que o principal fator de risco da QA e CEL difere das demais lesões orais potencialmente malignizáveis e malignas, ressalta-se a importância de investigar particularmente os marcadores celulares nestas lesões.

4 METODOLOGIA EXPANDIDA

4.1 DELINEAMENTO

Este é um estudo retrospectivo observacional transversal descritivo e exploratório.

4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta por 30 casos de DOPM do tipo queilite actínica apresentando displasia epitelial e 30 casos de CEL. Múltiplas amostras do mesmo paciente ou amostras de pacientes que foram submetidos previamente à quimioterapia ou radioterapia não foram selecionadas. Como grupo controle foram utilizados 10 casos de epitélio não neoplásico (ENN) provenientes de mucoceles de lábio com revestimento epitelial de mucosa, que apresentassem o mínimo de infiltrado inflamatório em lâmina própria e em que os pacientes não apresentavam alterações imunológicas ou tratamento antineoplásico prévio, devido à inviabilidade de obtenção de fragmentos de lábio saudável. Estas amostras teciduais foram selecionadas por conveniência no arquivo de casos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC).

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e analisados simultaneamente por dois examinadores que, por consenso, determinaram o diagnóstico. Para os casos de QA determinou-se o grau de displasia epitelial pela classificação binária de Kujan et al. (2007) (Kujan, Khattab et al. 2007), e para os casos de CEL determinou-se o grau de diferenciação histopatológica, segundo os critérios estabelecidos pela OMS (Takata 2017). Foram excluídos da amostra os casos em que houve discordância quanto ao diagnóstico ou classificação, ou que a realização da reação imuno-histoquímica foi inexecutável, pela necessidade de preservação de material em arquivo.

4.4 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os procedimentos para realização da técnica imuno-histoquímica foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Os espécimes foram fixados em formol a 10% em temperatura ambiente e incluídos em parafina, conforme protocolo do LPB-UFSC. Para cada antígeno estudado foram obtidos cortes de 3µm de espessura estendidos em lâminas previamente tratadas com solução de 3-aminopropyltriethoxylene (Zymed Laboratories, Inc. San Francisco, CA, USA), levadas à estufa por 12 horas à 60°C. As amostras foram submetidas à reação de imuno-histoquímica utilizando o método de polímero HRP para avaliação das proteínas associadas as células-tronco OCT4, Sox2 e HNK1, utilizando-se anticorpos primários específicos para esses antígenos. Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Quadro 2). O controle negativo de todas as reações foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

Para a desparafinização dos cortes as lâminas foram mantidas em estufa por 30 minutos a 60°C, seguido de 30 minutos em xilol a 60°C e 20 minutos em xilol a temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a reidratação em uma sequência decrescente de etanol constituída por cinco passagens de cinco minutos cada, começando por 3 banhos em etanol absoluto, seguida pelo etanol a 95% e etanol a 85%. Posteriormente, foram realizados dois banhos de 5 minutos em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em H₂O₂ a 6% em metanol na proporção de 1:3, em dois banhos de 20 minutos, seguido de um banho de 5 minutos em tampão fosfato (PBS) e uma lavagem de 5 minutos em água destilada. Para a recuperação antigênica foi utilizado o tampão citrato 0,01M, pH 6,0, pré-aquecido em banho-maria, por 40 minutos em temperatura constante de 96°C. Após o resfriamento por 30 minutos, foram realizados dois banhos de 5 minutos em PBS.

Para as reações utilizando os anticorpos anti-Sox2 e anti-HNK1, o bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado em solução de leite desnatado a 5% em PBS durante 60 minutos, em temperatura ambiente, seguidos por mais dois banhos de 5 minutos em PBS. Já para o anticorpo anti-OCT4 o bloqueio de ligações inespecíficas ocorreu por meio da incubação com soro fetal bovino (Sigma-USA), à temperatura ambiente, por 40 minutos, seguida de lavagem com água destilada e duas incubações de cinco minutos cada em PBS.

Em seguida, cada espécime foi delimitado com caneta hidrofóbica (Z-path, Bancoque, Tailândia) e então incubados com os anticorpos primários a 4°C, *overnight*.

Quadro 2 – Anticorpos utilizados, clone, diluição, controle positivo e fabricante.

Anticorpo	Clone	Diluição	Controle positivo	Fabricante
Anti-OCT4	Policlonal (TA354593)	1:100	Carcinoma epidermoide oral	Origene, EUA
Anti-Sox2	Monoclonal	1:150	Tireoide	Cell Signaling, EUA
Anti-HNK1	Monoclonal	Pronto para uso	Mandíbula de rato neonato	Developmental Studies Hybridoma Bank - Universidade de Iowa, Iowa, EUA

Após o tempo de incubação do anticorpo primário, os cortes foram submetidos à dois banhos de 5 min em PBS, então incubados com o anticorpo secundário não diluído do Kit EnVision (DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) por 1 hora. A revelação da reação ocorreu com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB+Substrate Chromogen System®, DAKO North America Inc., Carpinteria, EUA) aplicado em cada corte por dois minutos, seguido de banho em água destilada. Todos os espécimes receberam contra-coloração com Hematoxilina de Harris pelo tempo de dois minutos e meio. A remoção de pigmento formólico foi realizada através da rápida imersão das lâminas em solução aquosa de hidróxido de amônia a 1% e lavagem durante dois minutos em água corrente. Em seguida, realizou-se a desidratação em sequência crescente de etanol (85%, 95% e etanol absoluto I, II e III), diafanização com xilol por 40 min e montagem das lamínulas com Entellan (Merck-Sigma-Aldrich, Alemanha).

4.5 AVALIAÇÃO DA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram realizadas fotomicrografias com parâmetros de captura padronizados em 5 campos equidistantes capturados em magnificação de 400X sob microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Nos cortes de ENN e QA as capturas foram realizadas a partir da interface epitélio/conjuntivo. Nos cortes de CEL foi realizada uma captura em cada quadrante e uma captura no centro do fragmento.

Para a avaliação da imunopositividade, as fotomicrografias tiveram sua identificação mascarada. Foi avaliada a imunorreatividade nuclear e citoplasmática para OCT4, Sox2 e HNK1 nas células epiteliais dos ENNs e das QAs, e células neoplásicas dos CEL. A imunopositividade dos anticorpos em cada amostra foi determinada pela presença do

cromógeno nos núcleos ou nos citoplasmas das células e analisada como porcentagem de núcleos ou citoplasmas positivos em relação ao total de células contadas.

A avaliação da imunorreatividade foi realizada por um único examinador previamente submetido a uma calibração, na qual examinou 30 campos em 4 momentos, com intervalo de 1 semana, obtendo-se o coeficiente de correlação intraclassas de, no mínimo, 0,7. A avaliação da imunoeexpressão dos marcadores nos núcleos e citoplasmas foi realizada com Software ImageJ versão 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, EUA), e os valores registrados em uma planilha previamente elaborada no Microsoft Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, EUA).

Desta forma, foi determinada a porcentagem de células com núcleo ou citoplasma positivos para cada proteína estudada, e estes valores foram submetidos a análise estatística para comparação entre os grupos.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado para avaliar a distribuição dos dados que, por não apresentarem uma distribuição gaussiana, levou à utilização de testes não-paramétricos. Para comparação da porcentagem de imunopositividade de cada proteína entre os grupos e para a comparação da imunopositividade entre os graus de displasia epitelial nas QA e entre os graus de diferenciação histopatológica nos CEL, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. O coeficiente de correlação de Spearman foi realizado para analisar a correlação entre as proteínas em cada grupo estudado.

Os dados foram apresentados em mediana e distância interquartil para cada grupo, e foi adotado o nível de significância de 0,05 para os testes estatísticos aplicados.

5. ARTIGO

*Artigo formatado nas normas da revista *Histopathology*

Título: Expressão de marcadores de células-tronco OCT4, Sox2 e HNK1 em queilite actínica e carcinoma de células escamosas de lábio.

Autores: Rúbia Teodoro Stuepp^a, Andressa Fernanda Paza Miguel^a, Sarah Freygang Mendes Pilati^a, Filipe Modolo^b

^aPrograma de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

^bDepartamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Título resumido: Expressão de OCT4, Sox2 e HNK1 em câncer de lábio e queilite actínica

Autor de Correspondência

Rúbia Teodoro Stuepp

Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Departamento de Patologia – Trindade

Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

CEP: 88040-900

E-mail: rubia_ts@hotmail.com

Telefone: +55 48 999949209

Declaração de conflito de interesse: os autores declaram não ter conflito de interesse.

RESUMO

Contexto: As proteínas das células-tronco cancerígenas (CTCs) foram descritas em doenças orais potencialmente malignas (DOPM) e no câncer oral e foram associadas à iniciação, manutenção, migração celular e comportamento agressivo do tumor. **Objetivos:** o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de OCT4, Sox2 e HNK1 em carcinoma epidermoide de lábio (CEL), queilite actínica (QA) e epitélio não neoplásico (ENN). **Materiais e Métodos:** trinta casos de CEL, trinta casos de QA e dez casos de ENN foram submetidos ao estudo imunohistoquímico. **Resultados:** verificou-se a superexpressão nuclear e citoplasmática de OCT4 em CEL comparado ao ENN e QA, sem diferença significativa. A expressão de Sox2 foi exclusivamente nuclear e significativamente maior em ENN quando comparado ao CEL ($p=0,000$) e em QA comparado ao CEL ($p=0,000$). A expressão nuclear de HNK1 foi significativamente maior no CEL do que em ENN ($p = 0,036$), e a expressão citoplasmática foi maior no CEL do que em ENN ($p = 0,000$) e no CEL comparado à QA ($p = 0,000$). **Conclusão:** conclui-se que OCT4, Sox2 e HNK1 podem estar envolvidos nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial, que parece estar relacionada com a perda de Sox2 e aumento da expressão de OCT4 e HNK1.

Palavras-chave: Proteína OCT4 humana; Proteína Sox2 humana; Antígeno HNK-1; Células-tronco cancerosas; Câncer Bucal; Câncer labial.

INTRODUÇÃO

A queilite actínica (QA) é uma doença oral potencialmente maligna (DOPM) resultante da exposição excessiva à radiação solar ultravioleta (UV)¹ que acomete o lábio inferior (95% dos casos)² de homens de pele branca.³ A transformação maligna da QA é estimada entre 10-30%.⁴

Em 2020, a GLOBOCAN estimou 377.713 novos casos de câncer de lábio e cavidade oral e 177.757 mortes em todo o mundo.⁵ O câncer de lábio (CEL) é responsável por cerca de 25% de todos os cânceres de cavidade oral^{6, 7} e, por ser causado principalmente pela radiação UV,⁸ o perfil dos marcadores de células-tronco cancerígenas (CTCs) pode diferir das lesões intraorais.

O CEL em estágio inicial apresenta 90-100% de sobrevida após cinco anos, entretanto, a sobrevida cai para 25-70% quando há metástases no diagnóstico.² O componente celular do carcinoma epidermoide bucal (CEB) é heterogêneo e compreende uma pequena subpopulação de CTCs.⁹ Acredita-se que as CTCs desempenham um papel fundamental na iniciação, manutenção e migração celular do tumor e contribuem com comportamentos tumorais agressivos, como quimiorresistência, fuga da apoptose e metástase.^{9, 10}

Marcadores relacionados à CTCs como NANOG, NESTIN, β -tubulina, OCT4 e Sox2 já foram estudados em CEB, DOPM e em mucosa adjacente ao tumor.¹¹⁻¹³ OCT4 e Sox2 são fatores de transcrição envolvidos na manutenção da pluripotência e estado indiferenciado de células-tronco embrionárias.^{13, 14} HNK1 é um epítipo de carboidrato expresso em várias moléculas de adesão celular envolvidas em interações célula-célula e/ou célula-substrato^{15, 16} e sua expressão já foi detectada em melanoma maligno cutâneo,^{17, 18} tumor astrocítico,¹⁶ e câncer de próstata.¹⁹

Ainda hoje existem poucos estudos que avaliaram a expressão de OCT4, Sox2 e HNK1 em CEB e os resultados são discrepantes. Além disso, não há estudos sobre a expressão desses marcadores em CEL e QA. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a expressão de OCT4, Sox2 e HNK1 em CEL e QA em comparação com tecido não neoplásico do lábio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo número 3.826.160) e foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque.

Seleção das Amostras

As amostras foram selecionadas do arquivo de casos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (Florianópolis, Brasil) e foram compostas por 30 casos de CEL, 30 casos de QA e 10 casos de mucocelos labiais. Por impossibilidade ética de realizar biópsia de lábios sem qualquer alteração clínica, as mucocelos labiais foram utilizadas como grupo controle proporcionando o epitélio não-neoplásico (ENN). Foram excluídos os casos de mucocele com inflamação significativa, que poderia ser responsável por alterações epiteliais. Os espécimes foram obtidos de diferentes pacientes e nenhum deles teve tratamento pré-operatório, como radioterapia ou quimioterapia.

Previamente ao estudo imuno-histoquímico todos os casos foram analisados, por meio de lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E), por dois observadores experientes (RT Stuepp e F Modolo) para confirmar por consenso o diagnóstico de displasia epitelial nos casos de QA e a diferenciação histológica dos casos CEL de acordo com a classificação do sistema binário²⁰ e classificação da OMS²¹, respectivamente.

Imuno-histoquímica

Cortes de 3µm das amostras foram submetidas à técnica imuno-histoquímica pelo método do polímero HRP, segundo Miguel et. al 2021²². Resumidamente, após o bloqueio da atividade da peroxidase endógena, recuperação de antígeno e bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas, as amostras foram incubadas por 18h a 4°C com os anticorpos primários (Tabela 1) seguido pela incubação por 1h com um anticorpo secundário não diluído (kit EnVision; Dako, Corp., Carpinteria, CA). Foram incluídos controles positivos para todos os anticorpos (Tabela 1) e o controle negativo de cada reação foi realizado pela omissão do anticorpo primário. A detecção foi realizada com diaminobenzidina DAKO Liquid plus (DAB, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e, em seguida, foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris. Após desidratação e diafanização, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha).

Tabela 1: Anticorpos primários e controles positivos

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Controle Positivo
OCT4	Coelho policlonal	Origene, Rockville, MD, EUA	1:100	Carcinoma epidermoide bucal
Sox2	Coelho monoclonal	Cell Signaling, Danvers, MA, EUA	1:150	Tireoide
HNK1	Rato monoclonal	Obtido do Developmental Studies Hybridoma Bank - Iowa, IA, EUA	Pronto para uso	Mandíbula de rato neonato

Avaliação da reação imuno-histoquímica

As reações foram avaliadas por um único investigador previamente calibrado (RT Stuepp), com coeficiente de correlação intraclasse de 0,857 (calibração realizada em 4 momentos, com intervalos de 1 semana, na qual foram examinados 30 campos). Para cada amostra, as células foram contadas com ImageJ versão 1.410 (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA) em cinco campos equidistantes com uma ampliação de 400X, capturadas com microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha). A imunoposição foi considerada positiva na presença de coloração marrom no citoplasma e/ou núcleo de células epiteliais.

Núcleos positivos de células epiteliais, citoplasma positivo de células epiteliais e número total de células epiteliais foram contados nos campos fotografados para cada anticorpo. A imunopositividade para cada amostra foi expressa em porcentagem de células com núcleo positivo ou células com citoplasma positivo sobre o total de células contadas.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software SPSS® 11 (SPSS Inc., Headquarters, USA). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk revelou distribuições não normais, portanto testes estatísticos não paramétricos foram aplicados. A imuno-positividade citoplasmática e nuclear para cada proteína foi comparada entre os diferentes grupos e associada à classificação histopatológica pelo teste de Kruskal-Wallis. A análise de correlação de Pearson foi usada para analisar a correlação entre OCT4, Sox2 e HNK1 em cada grupo. As correlações foram classificadas em: (I) fracas: 0,00–0,30; (II) moderado: 0,30–0,60; (III) forte: 0,60–0,90; e (IV)

muito forte: 0,90-1,0.²³ Para todos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

A classificação da QA de acordo com o sistema binário²⁰ resultou em 14 lesões de baixo risco (BR) e 16 de alto risco (AR). A avaliação da diferenciação histológica do CEL de acordo com a classificação da OMS²¹ resultou em 10 CEL bem diferenciados (BD), 10 moderadamente diferenciados (MD) e 10 pobremente diferenciados (PD). Os resultados foram analisados de acordo com o diagnóstico (QA, CEL e ENN) e subclassificações (subgrupos QA BR ou AR e CEL BD, MD ou PD).

Os resultados referentes ao estudo imuno-histoquímico são apresentados nas tabelas 2-4. Resumidamente, a imunoposição de OCT4 esteve presente na maioria dos núcleos e citoplasmas das células epiteliais, Sox2 esteve presente exclusivamente nos núcleos das células epiteliais e HNK1 esteve presente em núcleos e citoplasma das células epiteliais. Para todas as proteínas estudadas a imunoposição foi observada de forma difusa nas células epiteliais do ENN, QA e CEL (Figura 1 A-I).

Apesar de não haver significância estatística, OCT4 teve expressão aumentada nos núcleos e citoplasmas das células epiteliais de CEL comparado ao ENN e QA (Tabela 2). Não houve diferença estatística significativa na marcação nuclear de OCT4 entre os subgrupos avaliados, no entanto observou-se diferença significativa na expressão citoplasmática entre CEL PD e ENN ($p = 0,034$) (Tabela 3 mostra os resultados globais entre os subgrupos).

A imunoposição de Sox 2 diminuiu significativamente de ENN para CEL ($p=0,000$) e de QA para CEL ($p=0,000$), e a análise entre subgrupos revelou diferença significativa entre ENN e CEL BD ($p=0,002$); ENN e CEL MD ($p=0,000$); ENN e CEL PD ($p=0,02$); e QA AR e CEL MD ($p=0,01$).

Finalmente, a imunoposição de HNK1 aumentou gradativamente de ENN para QA e de QA para CEL, com diferença significativa na expressão nuclear entre ENN e CEL ($p=0,036$) e na expressão citoplasmática entre ENN e CEL ($p=0,000$), e entre QA e CEL ($p = 0,000$). Em relação à expressão nuclear de HNK1 nos subgrupos, houve diferença significativa entre ENN e CEL PD ($p=0,001$); QA BR e CEL PD ($p=0,005$); QA AR e CEL PD ($p=0,009$); e CEL BD e CEL PD ($p=0,026$). Para expressão citoplasmática houve significância entre ENN e CEL MD ($p=0,017$); ENN e CEL PD ($p=0,001$); QA BR e CEL MD ($p=0,005$); QA BR e CEL PD ($p=0,000$); e QA AR e CEL PD ($P=0,025$).

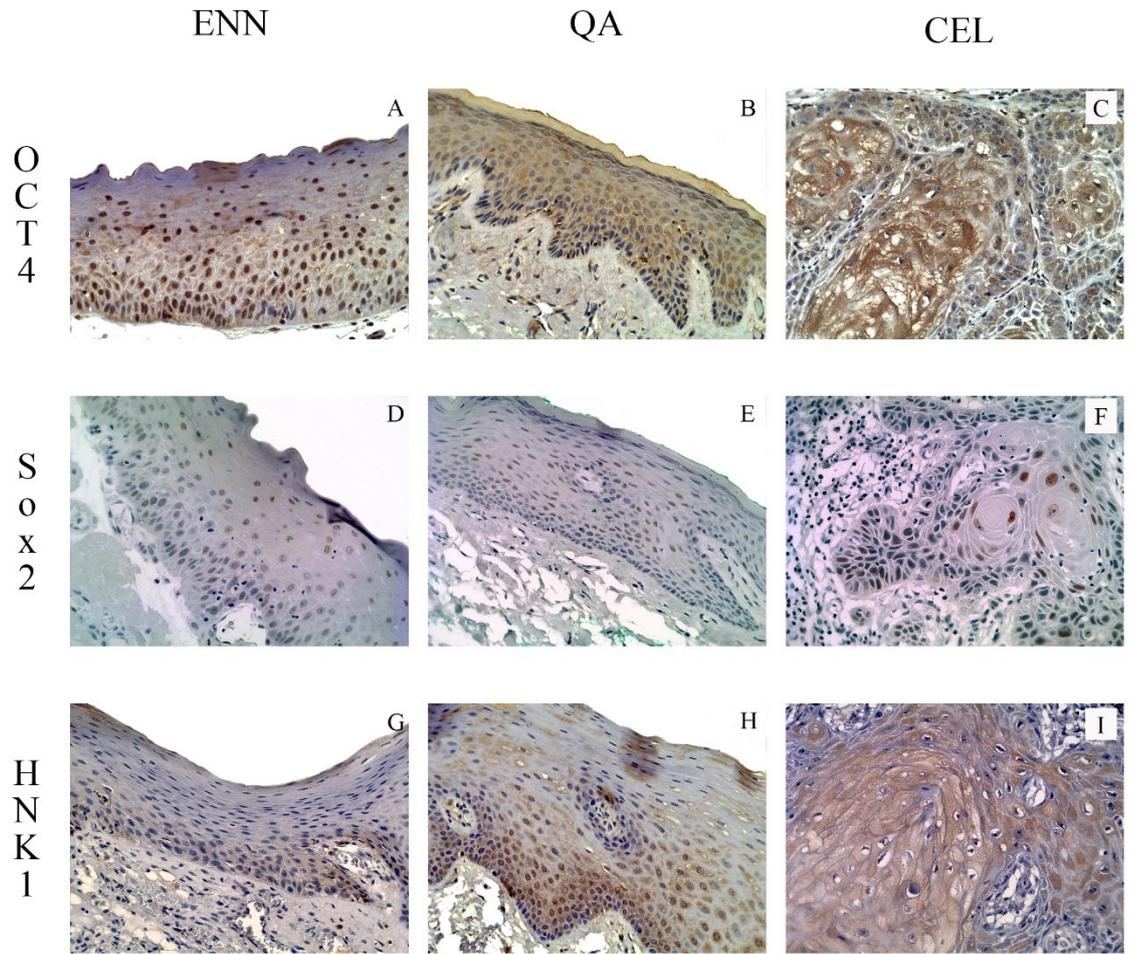


Figura 1. Expressão imuno-histoquímica de OCT4, Sox2 e HNK1. ENN: epitélio não neoplásico; QA: queilite actínica; CEL: carcinoma epidermoide de lábio (CEL). Aumento de 400x.

Tabela 2 – Expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo.

Marcador		ENN (n=10)	QA (n=30)	CEL (n=30)	P
		Med (IIQ)	Med (IIQ)	Med (IIQ)	
OCT4	N	58,44 (35,13) ^{A, B}	64,58 (45,10) ^{A, C}	85,50 (29,62) ^{B, C}	^A 1,000 ^B 0,190 ^C 0,068 * 0,040
	C	19,48 (66,53) ^{A, B}	41,04 (50,16) ^{A, C}	59,04 (49,16) ^{B, C}	^A 0,747 ^B 0,054 ^C 0,260 * 0,039
Sox2	N	66,72 (46,04) ^{A, B}	30,12 (46,35) ^{A, C}	0,17 (26,10) ^{B, C}	^A 0,162 ^B 0,000 ^C 0,000 * 0,000
	C	-	-	-	-
HNK1	N	0,00 (17,23) ^{A, B}	4,75 (34,59) ^{A, C}	28,37 (63,60) ^{B, C}	^A 0,904 ^B 0,036 ^C 0,110 * 0,019
	C	14,10 (23,99) ^{A, B}	18,42 (43,97) ^{A, C}	81,72 (36,27) ^{B, C}	^A 1,000 ^B 0,000 ^C 0,000 * 0,000

ENN: epitélio não-neoplásico; QA: queilite actínica; CEL: carcinoma epidermoide de lábio; N: núcleo; C: citoplasma; Med: mediana; IIQ: intervalo interquartil; *: valor de “p” entre os três grupos. Teste estatístico: Kruskal -Wallis.

Tabela 3 – Expressão imuno-histoquímica dos marcadores entre os subgrupos.

Marcador		ENN (n=10)	QA		CEL			*P
			BR (n=14)	AR (n=16)	BD (n=10)	MD (n=10)	PD (n=10)	
OCT4	N M (IIQ)	58,44 (35,13)	53,96 (42,46)	65,65 (31,90)	74,25 (48,45)	81,05 (28,63)	90,24 (19,22)	0,051
	C M (IIQ)	19,48 (66,53) ^A	43,56 (55,88) ^{AB}	39,14 (46,04) ^{AB}	55,05 (59,09) ^{AB}	46,26 (49,14) ^{AB}	74,02 (26,58) ^B	0,034
Sox2	N M (IIQ)	66,72 (46,04) ^A	24,40 (37,11) ^{ABC}	42,90 (52,18) ^{AC}	0,09 (34,14) ^{BC}	0 (3,73) ^B	7,44 (35,80) ^{BC}	0,000
	C M (IIQ)	-	-	-	-	-	-	-
HNK1	N M (IIQ)	0 (17,23) ^A	7,98 (32,02) ^A	4,75 (45,18) ^A	0,75 (52,33) ^A	13,74 (24,40) ^{AB}	65,77 (36,84) ^B	0,001
	C M (IIQ)	14,10 (23,99) ^C	11,28 (37,90) ^C	29,57 (54,60) ^{AC}	57,45 (56,50) ^{ABC}	66,94 (29,41) ^{AB}	89,75 (8,42) ^B	0,000

ENN: epitélio não-neoplásico; QA: queilite actínica; CEL: carcinoma epidermoide de lábio; BR: baixo risco; AR: alto risco; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; PD: pobremente diferenciado; N: núcleo; C: citoplasma; Med: mediana; IIQ: intervalo interquartil; *: valor de “p” entre todos os subgrupos. Teste estatístico: Kruskal -Wallis.

Por fim, houve correlação positiva moderada e significativa na expressão citoplasmática de OCT4 e HNK1 em QA ($p=0,012$; $R=0,452$) e CEL ($p=0,022$; $R=0,415$) e na expressão nuclear de Sox2 e HNK1 em CEL ($p=0,005$; $R=0,495$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Avaliação da correlação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores em cada grupo.

Grupo	Variável	OCT4	Sox2
ENN	N	Sox2	R= 0,6 P= 0,067
		HNK1	R= 0,075 P= 0,837
	C	Sox2	-
		HNK1	R= 0,267 P= 0,455
QA	N	Sox2	R= 0,158 P= 0,404
		HNK1	R= 0,339 P= 0,067
	C	Sox2	-
		HNK1	R= 0,452 P= 0,012
CEL	N	Sox2	R= -0,03 P= 0,875
		HNK1	R= 0,161 P= 0,397
	C	Sox2	-
		HNK1	R= 0,415 P= 0,022

ENN: epitélio não-neoplásico; QA: queilite actínica; CEL: carcinoma epidermoide de lábio; N: núcleo; C: citoplasma; R = coeficiente de correlação de Spearman; P: valor de “p”.

DISCUSSÃO

A evolução de uma lesão displásica ou não displásica para câncer é um evento incerto e a literatura sobre este tema é conflitante. Assim, a identificação de CTCs pode ser um indicador prognóstico confiável em DOPMs, bem como em câncer bucal quanto ao curso clínico e como alvo terapêutico.²⁴ Em nosso estudo apresentamos a expressão de dois marcadores de CTCs bem conhecidos, OCT4 e Sox2, e introduzimos o HNK1 como um possível novo marcador na avaliação histopatológica de QA com displasia epitelial e CEL.

Neste trabalho, enquanto a imunexpressão de Sox2 foi exclusivamente nuclear, a imunexpressão de OCT4 esteve presente no citoplasma e núcleo de células epiteliais. Tanto OCT4 quanto Sox2 são fatores de transcrição e, portanto, sua atividade é nuclear.²⁵ Apesar disso, avaliamos a expressão citoplasmática de OCT4, uma vez que a síntese proteica ocorre no

citoplasma celular²⁶ e, desta forma, a superexpressão citoplasmática pode estar relacionada com sua hiperatividade nuclear.

Em nosso estudo não houve diferença significativa na imunexpressão de OCT4 entre os grupos (ENN, QA e CEL, entretanto, a imunexpressão de OCT4 aumentou significativamente de ENN para CEL PD ($p=0,034$), sugerindo sua participação na carcinogênese oral.

Tegginamani et al. (2020) relataram a ausência de expressão de OCT4 em leucoplasia oral²⁴. Além disso, Fu et al. (2016) relataram uma expressão significativamente maior de OCT4 em tecido normal adjacente ao tumor do que em tecido tumoral e verificaram que a maior expressão de OCT4 está associada a doenças em estágio patológico inicial, tamanho pequeno do tumor e ausência de metástase linfonodal.²⁷

Uma das limitações desta pesquisa foi a impossibilidade de analisar a correlação dos marcadores investigados com fatores clínico-patológicos e determinar seu valor prognóstico devido à falta de dados em prontuários e perda de seguimento dos pacientes. Neste sentido, Habu et al. (2015) relataram que a expressão de OCT4 prediz independentemente o alto risco de metástase cervical tardia no carcinoma epidermoide de língua.

Com relação à imunexpressão de Sox2, nosso estudo revelou diminuição significativa do ENN para QA e CEL. A análise entre os subgrupos também revelou que a imunexpressão de Sox2 diminui significativamente de ENN para CEL BD/ CEL MD/ CEL PD e entre QA AR e CEL MD. Além disso, não houve correlação significativa entre a imunexpressão de Sox2 e OCT4.

Em concordância com os nossos achados, Fu et al. (2016) relataram a superexpressão de Sox2 em tecido normal adjacente ao tumor comparado ao tecido normal e neoplásico e verificaram que a superexpressão de Sox2 está significativamente associada a doença em estágio patológico inicial, tamanho pequeno do tumor, ausência de metástases linfonodais e melhor prognóstico para pacientes com CEB.²⁷ Em nosso estudo verificamos maior expressão de Sox2 no ENN em relação ao CEL, e uma vez que não foi possível investigar a correlação de Sox2 com os fatores clínico-patológicos, sugerimos a realização de estudos acerca deste tema.

Em contraste com os nossos resultados, Huang et al. (2014) relataram que Sox2 e OCT4 estavam superexpressos e significativamente correlacionados no carcinoma epidermoide de língua, porém sem correlação significativa com a sobrevida global de 5 anos dos pacientes.²⁸ Nesse contexto, Qiao et al. (2014) encontraram a expressão isolada de OCT4 e Sox2 na mucosa oral normal, DOPM e CEB, mas a co-expressão (ambos os marcadores detectados positivamente no mesmo local de um caso sob um campo selecionado) destes marcadores

esteve presente apenas em DOPM e CEB, sugerindo que o perfil Oct4+Sox2+ pode contribuir para a transformação maligna da mucosa oral.²⁵ Esses achados estão em desacordo com nosso estudo em relação à expressão de Sox2, uma vez que observamos diminuição significativa da expressão em ENN para CEB.

Ghazi et al. (2020) demonstraram a expressão significativamente maior de OCT4 e Sox2 no CEB PD comparado ao CEB MD, porém, sem diferença significativa entre o estágio clínico do tumor e a expressão de OCT4 ou Sox2.²⁹ De Vicente et al. (2019) demonstraram que a expressão de Sox2 está significativamente associada ao risco de câncer bucal⁹ e Liang et al. (2019) revelaram que Sox2 está regulado positivamente em CEB avançado e tumores metastáticos, contribuindo para a resistência aos medicamentos. Além disso, a supressão de Sox2 com tratamento combinado superou efetivamente a quimiorresistência e diminuiu a recorrência de CEB, *in vitro* e *in vivo*.³⁰ Esses resultados são conflitantes com nossos achados, uma vez que observamos uma expressão significativamente maior de Sox2 no tecido normal comparado ao tecido neoplásico.

Também em divergência com nossos achados, Luiz et al. (2018) encontraram maior expressão de Sox2 em leucoplasia oral comparado ao tecido de mucosa oral saudável, sugerindo uma contribuição de Sox2 na patogênese das lesões leucoplásicas.²⁹

As diferenças metodológicas na avaliação da imunexpressão de Sox2, a diversidade de populações de pacientes e a heterogeneidade no perfil morfológico e genético dos tumores sólidos podem ser algumas das razões para as diferenças encontradas.^{9,14} Além disso, a QA e o CEL diferem das lesões intraorais por serem causadas principalmente pela radiação UV,⁸ e, portanto, o papel das CTCs e seus marcadores pode diferir das lesões intraorais. Até onde sabemos, este é o primeiro relato da imunexpressão de Sox2 e OCT4 em tecido normal, displásico e neoplásico do lábio, portanto, sugerimos novas investigações para ampliar o entendimento sobre o papel destes marcadores na carcinogênese labial.

Em relação à imunexpressão de HNK1, apesar de seu papel significativo na diferenciação e migração celular em tecidos craniofaciais, poucos estudos avaliaram sua participação na carcinogênese e, até onde sabemos, este é o primeiro relato da expressão de HNK1 em lesões neoplásicas e displásicas da cavidade oral.

Em nosso estudo, revelamos que a expressão de HNK1 foi significativamente maior em CEL comparado à QA e ENN, bem como em CEL PD comparado ao ENN. Também demonstramos a correlação significativa de HNK1 com OCT4 na expressão citoplasmática de QA e CEL, e com Sox2 na expressão nuclear de CEL.

HNK1, também conhecido como CD57 ou LEU7, está envolvido no reconhecimento, adesão e migração celular.^{32,33} Recentemente, a expressão de HNK1 foi relatada em células osteogênicas, osteoblastos e osteócitos durante a regeneração óssea após trauma induzido.³⁴ Em tecidos neoplásicos humanos, a expressão de HNK1 foi observada em carcinomas de pequenas células do pulmão,³⁵ coriocarcinomas,³⁶ tumores neuroectodérmicos³⁷ e tumores ginecológicos (carcinoma de pequenas células, adenocarcinomas, carcinoma endometriode),³⁸ mas sem compreender completamente seu papel na carcinogênese.

Em melanomas cutâneos, a expressão de HNK1 foi relatada como um marcador prognóstico independente de metástase à distância.¹⁷ Além disso, o bloqueio de HNK1 em culturas de células de melanoma altamente invasivo reduziu a adesão celular à matriz extracelular, especialmente laminina e colágeno IV, e conseqüentemente reduziu a taxa migratória e capacidade invasiva das células neoplásicas.¹⁸

Em contraste, a superexpressão de HNK1 em tumores astrocíticos humanos foi positivamente associada ao aumento da sobrevida, resultando em tumores 60% menores e menor proliferação celular quando comparados a tumores HNK1 negativos.¹⁶ Resultados semelhantes foram descritos no câncer de próstata epitelial: tumores bem diferenciados apresentaram maior expressão de HNK1 do que tumores pouco diferenciados e pacientes com superexpressão de HNK1 tiveram maiores taxas de sobrevida e intervalos livres de doença mais longos.³⁹ Além disso, com a progressão de carcinoma bem diferenciado para mal diferenciado, a expressão de HNK1 é gradualmente perdida, assim como em tumores clínicos avançados.¹⁹ Com isso em vista, recomendamos mais estudos para avaliar o papel do HNK1 no curso clínico do CEL.

A iniciação do câncer é resultado de alterações genéticas que ocorrem em vários estágios anteriormente às alterações histopatológicas.²⁹ Portanto, a classificação da gravidade da displasia epitelial pode ajudar no monitoramento das lesões, mas não pode ser o único critério para prever a transformação maligna.³¹ Além disso, uma vez que o câncer se desenvolve, conhecer o seu perfil molecular pode complementar as classificações tumorais atuais e melhorar o tratamento, impactando o curso clínico.⁴⁰ A partir dos nossos resultados concluímos que os marcadores estudados podem estar envolvidos nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial, que parece estar relacionada à perda de Sox2 e aumento da expressão de OCT4 e HNK1.

Informações de Financiamento: R.T.S e A. F. P. M receberam bolsa da CAPES / FAPESC (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina), Ministério da Educação, Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Warnakulasuriya S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. *J Oral surgery, oral medicine, oral pathology oral radiology* 2018;**125**;582-590.
2. Vieira RAMAR, Minicucci EM, Marques MEA, Marques SAJAbdd. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: Clinical, histopathological and immunogenetic aspects. 2012;**87**;105-114.
3. Mello F-W, Melo G, Modolo F, Rivero E-R-CJJoc, dentistry e. Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from brazil. 2019;**11**;e62.
4. Lai M, Pampena R, Cornacchia L, Pellacani G, Peris K, Longo CJJotAAoD. Treatments of actinic cheilitis: A systematic review of the literature. 2019.
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL *et al.* Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 2021;**71**;209-249.
6. de Oliveira Silva LV, de Arruda JAA, Abreu LG *et al.* Demographic and clinicopathologic features of actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: A brazilian multicentre study. 2020;**14**;899.
7. Lang K, Akbaba S, Held T *et al.* Retrospective analysis of outcome and toxicity after postoperative radiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the lip. 2021;0300891621996805.
8. Dancyger A, Heard V, Huang B *et al.* Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. 2018;**9**;e12343.
9. de Vicente JC, Donate-Pérez del Molino P, Rodrigo JP *et al.* Sox2 expression is an independent predictor of oral cancer progression. 2019;**8**;1744.
10. Habu N, Imanishi Y, Kameyama K *et al.* Expression of oct3/4 and nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage i/ii oral tongue squamous cell carcinoma. 2015;**15**;730.
11. Scotti FM, Mitt VC, Vieira DS, Biz MT, Castro RG, Modolo FJOd. Expression of stem cell markers nanog and nestin in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. 2018;**24**;1209-1216.
12. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MAJOo. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. 2015;**51**;643-651.
13. Naini FB, Shakib PA, Abdollahi A, Hodjat M, Mohammadpour H, Khoozestani NKJAPjocpA. Relative expression of oct4, sox2 and nanog in oral squamous cell carcinoma versus adjacent non-tumor tissue. 2019;**20**;1649.

14. Yu SS, Cirillo NJJocp. The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors. 2020;**235**;65-73.
15. Seiki T, Oka S, Terayama K, Imiya K, Kawasaki TJB, communications br. Molecular cloning and expression of a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the hnk-1 carbohydrate epitope. 1999;**255**;182-187.
16. Suzuki-Anekoji M, Suzuki M, Kobayashi T *et al.* Hnk-1 glycan functions as a tumor suppressor for astrocytic tumor. 2011;**286**;32824-32833.
17. Thies A, Schachner M, Berger J *et al.* The developmentally regulated neural crest-associated glycotope hnk-1 predicts metastasis in cutaneous malignant melanoma. 2004;**203**;933-939.
18. Casado JG, Delgado E, Patsavoudi E *et al.* Functional implications of hnk-1 expression on invasive behaviour of melanoma cells. 2008;**29**;304-310.
19. Wangerin H, Kristiansen G, Schlomm T *et al.* Cd57 expression in incidental, clinically manifest, and metastatic carcinoma of the prostate. 2014;**2014**.
20. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan PJOo. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variation. 2007;**43**;224-231.
21. Takata TS, P. J. Tumors of the oral cavity and mobile tongue. *Classification of head and neck tumours*. Lyon: IARC, 2017.
22. Miguel AF, Embaló B, Alves Dias HB, Rivero ERJAI, Morphology M. Immunohistochemical expression of mmp-9, timp-1, and vimentin and its correlation with inflammatory reaction and clinical parameters in oral epithelial dysplasia. 2021;**29**;382-389.
23. Cicchetti DVJPa. Guidelines, criteria, and rules of thumb for evaluating normed and standardized assessment instruments in psychology. 1994;**6**;284.
24. Tegginamani AS, Shivakumar VH, Kallarakkal TG *et al.* Analysis of octamer-binding transcription factor-4 expression in oral leukoplakia. 2020;**24**;400.
25. Qiao B, He B, Cai J, Yang WJIjoc, pathology e. The expression profile of oct4 and sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa. 2014;**7**;28.
26. Brar GA, Weissman JSJNrMcb. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. 2015;**16**;651-664.
27. Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT *et al.* Association of oct 4, sox 2, and nanog expression with oral squamous cell carcinoma progression. 2016;**45**;89-95.
28. Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WFJJoOP, Medicine. Correlation of aldh 1, cd 44, oct 4 and sox 2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. 2014;**43**;492-498.

29. Ghazi N, Aali N, Shahrokhi V-R, Mohajertehran F, Saghravani NJRoB, Biology M. Relative expression of sox2 and oct4 in oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. 2020;**9**;171.
30. Liang X, Deng M, Zhang C *et al.* Combined class i histone deacetylase and mtorc1/c2 inhibition suppresses the initiation and recurrence of oral squamous cell carcinomas by repressing sox2. 2019;**454**;108-119.
31. Luiz ST, Modolo F, Mozzer I *et al.* Immunoexpression of sox-2 in oral leukoplakia. 2018;**24**;1449-1457.
32. Castillo G, Kleene R, Schachner M, Loers G, Torda AEJijoms. Proteins binding to the carbohydrate hnk-1: Common origins? 2021;**22**;8116.
33. Morita I, Kakuda S, Takeuchi Y *et al.* Hnk-1 glyco-epitope regulates the stability of the glutamate receptor subunit glur2 on the neuronal cell surface. 2009;**284**;30209-30217.
34. Stuepp R, Modolo F, Trentin A, Garcez R, Biz MJB, Histochemistry. Hnk1 and sox10 are present during repair of mandibular bone defects. 2020;**95**;619-625.
35. Bunn PJ, Linnoila I, Minna JD, Carney D, Gazdar AFJB. Small cell lung cancer, endocrine cells of the fetal bronchus, and other neuroendocrine cells express the leu-7 antigenic determinant present on natural killer cells. 1985;**65**;764-768.
36. Shih I-M, Schnaar RL, Gearhart J, Kurmana RJP. Distribution of cells bearing the hnk-1 epitope in the human placenta. 1997;**18**;667-674.
37. Caillaud J-M, Benjelloun S, Bosq J, Braham K, Lipinski MJCr. Hnk-1-defined antigen detected in paraffin-embedded neuroectoderm tumors and those derived from cells of the amine precursor uptake and decarboxylation system. 1984;**44**;4432-4439.
38. Ueda G, Yamasaki M, Inoue M *et al.* Immunohistochemical demonstration of hnk-1-defined antigen in gynecologic tumors with argyrophilia. 1986;**5**;143-150.
39. Liu X-h, Yoshiki T, Kokuho M, Okada Y, Tomoyoshi T, Higuchi KJ泌. The prognostic value of the hnk-1 (leu-7) antigen in prostatic cancer--an immunohistochemical study. 1993;**39**;439-444.
40. de Sousa Lopes MLD, da Silva Barros CC, de Souto Medeiros MR *et al.* Evaluation of cd57+ cells in oral squamous cells carcinoma and their relationship with clinicopathological parameters. 2017;**2**;1-7.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de boca é o quinto tumor mais frequente entre brasileiros do sexo masculino (INCA 2021). Neste contexto, o CEL representa cerca de um quarto dos cânceres bucais (Vieira, Minicucci et al. 2012, Takata 2017, Lang, Akbaba et al. 2021) e a incidência reportada no Brasil é de 3,0 a 13,5/100.000 habitantes (de Oliveira Silva, de Arruda et al. 2020). Em países tropicais, como o Brasil, o CEL é uma doença comum devido à maior incidência e exposição à radiação UV, principal fator etiológico para esta condição. É importante destacar que cerca de 95% dos casos de CEL são precedidos pela QA, uma DOPM, cujo fator etiológico é também a radiação UV (Vieira, Minicucci et al. 2012).

A QA é uma doença crônica causada pelos efeitos acumulativos da radiação UV e, portanto, apresenta evolução lenta, sendo associada equivocadamente pela maioria dos pacientes e por muitos profissionais da saúde como uma condição normal do envelhecimento. Por conta disso, perde-se a oportunidade de intervir precocemente nestes pacientes, evitando a progressão da QA.

Nem todas as DOPM irão desencadear uma neoplasia, porém ainda hoje não há ferramentas concretas para predizer quais lesões irão ou não progredir para câncer, sendo a classificação do grau de displasia epitelial o principal indicador prognóstico. Assim, o conhecimento das alterações moleculares das DOPM, que estão instaladas ainda antes das alterações histopatológicas, tem potencial como indicador prognóstico mais preciso e confiável, auxiliando a objetivamente classificar os pacientes em grupos de preservação ou tratamento de acordo com o risco relativo para transformação maligna. Já na perspectiva do CEL, o conhecimento dos mecanismos moleculares das células neoplásicas tem potencial uso terapêutico, visando o desenvolvimento de terapias mais específicas e, portanto, mais eficazes e com efeitos adversos mais amenos.

Tendo em vista o exposto, foi objetivo deste trabalho investigar a expressão dos marcadores de células-tronco OCT4, Sox2 e HNK1 em alterações displásicas e neoplásicas do lábio. Uma vez que o principal fator etiológico da QA e CEL difere das lesões intraorais, julgamos necessário investigar os marcadores celulares particularmente nestas lesões. OCT4 e Sox2 já foram investigados em diversos tumores, incluindo CEB, bem como em DOPM, porém sua implicação na carcinogênese destas lesões permanece inconclusiva. Por sua vez, dentro dos nossos conhecimentos, até o presente momento não há investigações de HNK1 nas referidas doenças orais, sendo o nosso trabalho a primeira publicação nesta área.

Frente a impossibilidade, por questões éticas, de utilizar tecido de semimucosa labial normal, utilizou-se como parâmetro de normalidade de imunoexpressão epitélio de mucosa proveniente de biópsias de mucoceles de lábio inferior. Estas foram criteriosamente selecionadas, buscando lesões que apresentassem o mínimo de infiltrado inflamatório em lâmina própria para evitar que os fenômenos gerados pela inflamação interferissem nos resultados, ainda assim é possível que alguma variação nos resultados fosse percebida caso se tivesse utilizado tecido normal.

Em nosso trabalho, verificamos que expressão nuclear e citoplasmática de OCT4 aumentou gradativamente do ENN para QA e CEL, embora sem diferença significativa. A expressão de Sox2 ocorreu apenas nos núcleos celulares e diminuiu gradativamente do ENN para QA e CEL, com diferença significativa. Por sua vez, HNK1 teve expressão nuclear significativamente maior em CEL comparado ao ENN, e a expressão citoplasmática foi significativamente maior em CEL comparado ao ENN e em CEL comparado à QA. A partir disso, concluímos que OCT4, Sox2 e HNK1 podem estar envolvidos nas fases iniciais da fotocarcinogênese labial, que parece estar relacionada com a perda de Sox2 e aumento da expressão de OCT4 e HNK1.

A interpretação dos dados desta pesquisa é limitada pela própria técnica imuno-histoquímica, que não gera uma quantificação tão precisa quanto outras metodologias, como PCR ou Western Blot. Outra limitação do nosso trabalho foi a impossibilidade de correlacionar a expressão dos marcadores investigados com os dados clínicos e histopatológicos, devido à falta de dados nos prontuários e perda de seguimento dos pacientes. Porém, os resultados aqui reportados podem melhor embasar o desenvolvimento de futuras investigações, com metodologias mais específicas e que possam correlacionar os dados encontrados com os aspectos clínicos e histopatológicos.

Atualmente, não existe um tratamento ideal para a QA, e para o CEL o tratamento de escolha é a excisão cirúrgica com margem de segurança, o que está implicado a sequelas funcionais e estéticas, agudas e crônicas. Conhecendo as alterações moleculares destas condições, espera-se desenvolver planos terapêuticos mais eficazes e conservadores, impactando diretamente na qualidade de vida destes pacientes.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados dessa pesquisa verificou-se que:

- A expressão nuclear e citoplasmática de OCT4 aumentou gradativamente do ENN para QA e CEL, sem significância estatística; a expressão de Sox2, presente apenas nos núcleos celulares, diminuiu gradativamente do ENN para QA e CEL, com significância estatística; HNK1 teve expressão nuclear significativamente maior em CEL comparado ao ENN, e a expressão citoplasmática foi significativamente maior em CEL comparado ao ENN e em CEL comparado a QA.

- A análise da expressão das proteínas entre os grupos estudados (ENN, QA e CEL) sugere que a fotocarcinogênese labial esteja relacionada com a perda de expressão nuclear de Sox2 e aumento da expressão nuclear e citoplasmática de OCT4 e HNK1.

- A análise da expressão das proteínas entre os subgrupos revelou:

- Aumento significativo da expressão citoplasmática de OCT4 entre ENN e CEL pobremente diferenciado, sugerindo a contribuição deste marcador na fotocarcinogênese labial;

- Diminuição significativa da expressão nuclear de Sox2 entre ENN e CEL bem diferenciado, moderadamente e pobremente diferenciado, e entre QA de alto risco e CEL moderadamente diferenciado, sugerindo a perda de regulação de Sox2 com a progressão das lesões.

- Aumento significativo da expressão nuclear de HNK1 em CEL pobremente diferenciado quando comparado com ENN, QA de baixo risco, QA de alto risco e CEL bem diferenciado. Aumento significativo da expressão citoplasmática de HNK1 do ENN para CEL moderadamente e pobremente diferenciado; de QA de baixo risco para CEL moderadamente e pobremente diferenciado; e de QA de alto risco para CEL pobremente diferenciado. Estes resultados sugerem a contribuição deste marcador na fotocarcinogênese labial.

- Houve correlação positiva, moderada e estatisticamente significativa entre a expressão citoplasmática de OCT4 e HNK1 em QA ($R= 0,452$ e $p= 0,01$) e CEL ($R= 0,415$ e $p= 0,022$), e na expressão nuclear de Sox2 e HNK1 em CEL ($R=0,495$ e $p = 0,005$).

REFERÊNCIAS

- Abyaneh, M.-A. Y., L. Falto-Aizpurua, R. D. Griffith and K. J. D. S. Nouri (2015). "Photodynamic therapy for actinic cheilitis: a systematic review." **41**(2): 189-198.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. J. P. o. t. N. A. o. S. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." **100**(7): 3983-3988.
- Attramadal, C. G., T. S. Halstensen, H. P. Dhakal, C. H. Ulekleiv, M. E. Boysen, J. M. Nesland, M. J. J. o. O. P. Bryne and Medicine (2015). "High nuclear SOX 2 expression is associated with radiotherapy response in small (T1/T2) oral squamous cell carcinoma." **44**(7): 515-522.
- Aupérin, A. J. C. o. i. o. (2020). "Epidemiology of head and neck cancers: an update." **32**(3): 178-186.
- Bhandari, K., D. c. Wang, S. c. Li, B. h. Jiang, Y. x. Guo, U. Koirala, X. y. J. H. Du and neck (2015). "Primary cN0 lip squamous cell carcinoma and elective neck dissection: Systematic review and meta-analysis." **37**(9): 1392-1400.
- Bonnet, D. and J. E. J. N. m. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." **3**(7): 730-737.
- Bosetti, C., G. Carioli, C. Santucci, P. Bertuccio, S. Gallus, W. Garavello, E. Negri and C. J. I. j. o. c. La Vecchia (2020). "Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality." **147**(4): 1040-1049.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre and A. J. C. a. c. j. f. c. Jemal (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." **68**(6): 394-424.
- Bunn, P. J., I. Linnoila, J. D. Minna, D. Carney and A. F. J. B. Gazdar (1985). "Small cell lung cancer, endocrine cells of the fetal bronchus, and other neuroendocrine cells express the Leu-7 antigenic determinant present on natural killer cells." **65**(3): 764-768.
- Cai, J., B. He, X. Li, M. Sun, A. K.-Y. Lam, B. Qiao and W. J. O. r. Qiu (2016). "Regulation of tumorigenesis in oral epithelial cells by defined reprogramming factors Oct4 and Sox2." **36**(2): 651-658.
- Caillaud, J.-M., S. Benjelloun, J. Bosq, K. Braham and M. J. C. r. Lipinski (1984). "HNK-1-defined antigen detected in paraffin-embedded neuroectoderm tumors and those derived from cells of the amine precursor uptake and decarboxylation system." **44**(10): 4432-4439.
- Casado, J. G., E. Delgado, E. Patsavoudi, E. Durán, B. Sanchez-Correa, S. Morgado, R. Solana and R. J. T. B. Tarazona (2008). "Functional implications of HNK-1 expression on invasive behaviour of melanoma cells." **29**(5): 304-310.
- Castillo, G., R. Kleene, M. Schachner, G. Loers and A. E. J. I. j. o. m. s. Torda (2021). "Proteins Binding to the Carbohydrate HNK-1: Common Origins?" **22**(15): 8116.

Dancyger, A., V. Heard, B. Huang, C. Suley, D. Tang, A. J. J. o. i. Ariyawardana and c. dentistry (2018). "Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies." **9**(4): e12343.

de Oliveira Silva, L. V., J. A. A. de Arruda, L. G. Abreu, R. C. Ferreira, L. P. da Silva, C. Pelissari, R. N. F. Silva, K. H. S. Nóbrega, B. A. B. de Andrade, M. J. J. H. Romañach and N. Pathology (2020). "Demographic and Clinicopathologic Features of Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma: a Brazilian Multicentre Study." **14**(4): 899.

de Sousa Lopes, M. L. D., C. C. da Silva Barros, M. R. de Souto Medeiros, M. C. da Costa Miguel, L. B. de Souza, P. M. Alves and É. J. D. J. J. o. O. D. da Silveira (2017). "Evaluation of CD57+ cells in oral squamous cells carcinoma and their relationship with clinicopathological parameters." **2**(1): 1-7.

de Vicente, J. C., P. Donate-Pérez del Molino, J. P. Rodrigo, E. Allonca, F. Hermida-Prado, R. Granda-Díaz, T. Rodríguez Santamarta and J. M. J. J. o. C. M. García-Pedrero (2019). "SOX2 Expression Is an Independent Predictor of Oral Cancer Progression." **8**(10): 1744.

Du, M., R. Nair, L. Jamieson, Z. Liu and P. J. J. o. d. r. Bi (2020). "Incidence trends of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers: global burden of disease 1990–2017." **99**(2): 143-151.

Elahi, M. and V. J. S. R. Rakhshan (2020). "MED15, transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), Fc γ RIII (CD16), and HNK-1 (CD57) are prognostic biomarkers of oral squamous cell carcinoma." **10**(1): 1-14.

Fu, T. Y., I. C. Hsieh, J. T. Cheng, M. H. Tsai, Y. Y. Hou, J. H. Lee, H. H. Liou, S. F. Huang, H. C. Chen, L. M. J. J. o. O. P. Yen and Medicine (2016). "Association of OCT 4, SOX 2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression." **45**(2): 89-95.

Ghazi, N., N. Aali, V.-R. Shahrokhi, F. Mohajertehran, N. J. R. o. B. Saghravanian and M. Biology (2020). "Relative expression of SOX2 and OCT4 in oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia." **9**(2): 171.

Gonzaga, A. K. G., R. P. Mafra, L. P. da Silva, R. de Almeida Freitas, L. B. de Souza and L. P. J. A. H. Pinto (2019). "Actinic cheilitis: Morphometric parameters and its relationship with the degree of epithelial dysplasia." 151452.

González-Moles, M., C. Scully, I. Ruiz-Ávila and J. J. O. o. Plaza-Campillo (2013). "The cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma." **49**(8): 738-746.

Habu, N., Y. Imanishi, K. Kameyama, M. Shimoda, Y. Tokumaru, K. Sakamoto, R. Fujii, S. Shigetomi, K. Otsuka and Y. J. B. c. Sato (2015). "Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma." **15**(1): 730.

Huang, C. F., X. R. Xu, T. F. Wu, Z. J. Sun, W. F. J. J. o. O. P. Zhang and Medicine (2014). "Correlation of ALDH 1, CD 44, OCT 4 and SOX 2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis." **43**(7): 492-498.

INCA. (2021). "Instituto Nacional do Câncer." 2019.

- Kujan, O., A. Khattab, R. J. Oliver, S. A. Roberts, N. Thakker and P. J. O. o. Sloan (2007). "Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation." **43**(3): 224-231.
- Lai, M., R. Pampena, L. Cornacchia, G. Pellacani, K. Peris and C. J. J. o. t. A. A. o. D. Longo (2019). "Treatments of actinic cheilitis: a systematic review of the literature."
- Lang, K., S. Akbaba, T. Held, R. El Shafie, B. Farnia, N. Bougatf, D. Bernhardt, C. Freudlsperger, P. K. Plinkert and S. J. T. J. Rieken (2021). "Retrospective analysis of outcome and toxicity after postoperative radiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of the lip." 0300891621996805.
- Liang, X., M. Deng, C. Zhang, F. Ping, H. Wang, Y. Wang, Z. Fan, X. Ren, X. Tao and T. J. C. I. Wu (2019). "Combined class I histone deacetylase and mTORC1/C2 inhibition suppresses the initiation and recurrence of oral squamous cell carcinomas by repressing SOX2." **454**: 108-119.
- Liu, X.-h., T. Yoshiki, M. Kokuho, Y. Okada, T. Tomoyoshi and K. J. 泌. Higuchi (1993). "The prognostic value of the HNK-1 (Leu-7) antigen in prostatic cancer--an immunohistochemical study." **39**(5): 439-444.
- Luiz, S. T., F. Modolo, I. Mozzer, E. C. dos Santos, S. Nagashima, A. P. Camargo Martins, M. L. V. de Azevedo, L. R. Azevedo Alanis, A. M. T. G. Hardy and R. S. J. O. d. de Moraes (2018). "Immunoexpression of SOX-2 in oral leukoplakia." **24**(8): 1449-1457.
- Major, A. G., L. P. Pitty and C. S. J. S. c. i. Farah (2013). "Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma." **2013**.
- Mariz, B. A. L. A., L. P. Kowalski, W. N. William Jr, G. de Castro Jr, A. L. F. Chaves, M. Santos, T. B. de Oliveira, A. L. D. Araújo, A. G. C. Normando and A. C. P. J. C. R. i. O. H. Ribeiro (2020). "Global prevalence of human papillomavirus-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma following the ASCO guidelines: A systematic review and meta-analysis." **156**: 103116.
- Mello, F.-W., G. Melo, F. Modolo, E.-R.-C. J. J. o. c. Rivero and e. dentistry (2019). "Actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma: Literature review and new data from Brazil." **11**(1): e62.
- Mello, F. W., G. Melo, J. J. Pasetto, C. A. B. Silva, S. Warnakulasuriya and E. R. C. J. C. o. i. Rivero (2019). "The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis." **23**(7): 2849-2859.
- Minarcik, J., J. J. O. Golden and c. research (2003). "AP-2 and HNK-1 define distinct populations of cranial neural crest cells." **6**(4): 210-219.
- Morita, I., S. Kakuda, Y. Takeuchi, S. Itoh, N. Kawasaki, Y. Kizuka, T. Kawasaki and S. J. J. o. B. C. Oka (2009). "HNK-1 glyco-epitope regulates the stability of the glutamate receptor subunit GluR2 on the neuronal cell surface." **284**(44): 30209-30217.

- Naini, F. B., P. A. Shakib, A. Abdollahi, M. Hodjat, H. Mohammadpour and N. K. J. A. P. j. o. c. p. A. Khoozestani (2019). "Relative expression of OCT4, SOX2 and NANOG in oral squamous cell carcinoma versus adjacent non-tumor tissue." **20(6)**: 1649.
- Omura, K. J. I. j. o. c. o. (2014). "Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma." **19(3)**: 423-430.
- Oshimori, N. J. C. S. (2020). "Cancer stem cells and their niche in the progression of squamous cell carcinoma." **111(11)**: 3985.
- Patel, S. S., K. A. Shah, M. J. Shah, K. C. Kothari and R. M. J. A. P. J. C. P. Rawal (2014). "Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas." **15(20)**: 8549-8556.
- Pilati, S., B. Bianco, D. Vieira and F. J. O. d. Modolo (2017). "Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems." **23(2)**: 219-224.
- Pradhan, S., V. Guddattu and M. C. J. J. o. A. O. S. Solomon (2019). "Association of the co-expression of SOX2 and Podoplanin in the progression of oral squamous cell carcinomas-an immunohistochemical study." **27**.
- Qiao, B., B. He, J. Cai, W. J. I. j. o. c. Yang and e. pathology (2014). "The expression profile of Oct4 and Sox2 in the carcinogenesis of oral mucosa." **7(1)**: 28.
- Reibel, J., et al. (2017). Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. Classification of Head and Neck Tumours. Lyon, IARC.
- Rena, W., Y. Lia, C. Liua, C. Qianga, L. Zhang, L. Gaoa, Z. Wangb and K. J. M. o. Zhia, patologia oral y cirugia bucal (2014). "Surgical management of Squamous Cell Carcinoma of the lower lip: An experience of 109 cases." **19(4)**: e398.
- Salgueiro, A. P., L. H. de Jesus, I. F. de Souza, P. V. Rados and F. J. C. o. i. Visioli (2019). "Treatment of actinic cheilitis: a systematic review." **23(5)**: 2041-2053.
- Schachner, M., R. Martini, H. Hall and G. Orberger (1995). Functions of the L2/HNK-1 carbohydrate in the nervous system. Progress in brain research, Elsevier. **105**: 183-188.
- Seiki, T., S. Oka, K. Terayama, K. Imiya, T. J. B. Kawasaki and b. r. communications (1999). "Molecular cloning and expression of a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope." **255(1)**: 182-187.
- Shield, K. D., J. Ferlay, A. Jemal, R. Sankaranarayanan, A. K. Chaturvedi, F. Bray and I. J. C. a. c. j. f. c. Soerjomataram (2017). "The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012." **67(1)**: 51-64.
- Shih, I-M., R. L. Schnaar, J. Gearhart and R. J. P. Kurmana (1997). "Distribution of cells bearing the HNK-1 epitope in the human placenta." **18(8)**: 667-674.

- Shimoda, Y., Y. Tajima, T. Nagase, K. Harii, N. Osumi and Y. J. J. o. B. C. Sanai (1999). "Cloning and expression of a novel galactoside β 1, 3-glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of HNK-1 epitope." **274**(24): 17115-17122.
- Simple, M., A. Suresh, D. Das and M. A. J. O. o. Kuriakose (2015). "Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma." **51**(7): 643-651.
- Stuepp, R., F. Modolo, A. Trentin, R. Garcez, M. J. B. Biz and Histochemistry (2020). "HNK1 and Sox10 are present during repair of mandibular bone defects." **95**(8): 619-625.
- Sung, H., J. Ferlay, R. L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal and F. J. C. a. c. j. f. c. Bray (2021). "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." **71**(3): 209-249.
- Suzuki-Anekoji, M., M. Suzuki, T. Kobayashi, Y. Sato, J. Nakayama, A. Suzuki, X. Bao, K. Angata and M. J. J. o. B. C. Fukuda (2011). "HNK-1 glycan functions as a tumor suppressor for astrocytic tumor." **286**(37): 32824-32833.
- Swain, N., M. Thakur, J. Pathak, B. J. J. o. O. Swain and M. P. JOMFP (2020). "SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis." **24**(2): 368.
- Tahmasebi, E., M. Alikhani, A. Yazdani, M. Yazdani, H. Tebyanian and A. J. L. s. Seifalian (2020). "The current markers of cancer stem cell in oral cancers." **249**: 117483.
- Takata, T. S., P. J. (2017). Tumors of the oral cavity and mobile tongue. Classification of Head and Neck Tumours. Lyon, IARC.
- Terayama, K., S. Oka, T. Seiki, Y. Miki, A. Nakamura, Y. Kozutsumi, K. Takio and T. J. P. o. t. N. A. o. S. Kawasaki (1997). "Cloning and functional expression of a novel glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1." **94**(12): 6093-6098.
- Thies, A., M. Schachner, J. Berger, I. Moll, H. J. Schulze, G. Brunner, U. J. T. J. o. P. A. J. o. t. P. S. o. G. B. Schumacher and Ireland (2004). "The developmentally regulated neural crest-associated glycotope HNK-1 predicts metastasis in cutaneous malignant melanoma." **203**(4): 933-939.
- Tomazelli, K. B., F. Modolo, A. G. Trentin, R. C. Garcez, M. T. J. T. Biz and Cell (2015). "Temporo-spatial analysis of Osterix, HNK1 and Sox10 during odontogenesis and maxillaries osteogenesis." **47**(5): 465-470.
- Trager, M. H., K. Farmer, C. Ulrich, N. Basset-Seguín, F. Herms, L. J. Geskin, J. D. Bouaziz, C. Lebbé, A. de Masson, M. J. J. o. t. E. A. o. D. Bagot and Venereology (2021). "Actinic cheilitis: a systematic review of treatment options." **35**(4): 815-823.
- Ueda, G., M. Yamasaki, M. Inoue, Y. Tanaka, Y. Inoue, Y. Abe and O. J. I. j. o. g. p. o. j. o. t. I. S. o. G. P. Tanizawa (1986). "Immunohistochemical demonstration of HNK-1-defined antigen in gynecologic tumors with argyrophilia." **5**(2): 143-150.

Unsal, A. A., A. B. Unsal, T. E. Henn, S. Baredes and J. A. J. T. L. Eloy (2018). "Cutaneous squamous cell carcinoma of the lip: a population-based analysis." **128**(1): 84-90.

Verma, V., C. J. J. o. i. Chandrashekar and c. dentistry (2019). "Evaluation of SOX2 and podoplanin expression in oral epithelial dysplasia and its correlation with malignant transformation." e12450.

Vieira, R. A. M. A. R., E. M. Minicucci, M. E. A. Marques and S. A. J. A. b. d. d. Marques (2012). "Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects." **87**(1): 105-114.

Wang, T., S. Shigdar, M. P. Gantier, Y. Hou, L. Wang, Y. Li, H. Al Shamaileh, W. Yin, S.-F. Zhou and X. J. O. Zhao (2015). "Cancer stem cell targeted therapy: progress amid controversies." **6**(42): 44191.

Wangerin, H., G. Kristiansen, T. Schlomm, C. Stephan, S. Gunia, A. Zimpfer, W. Weichert, G. Sauter and A. J. B. r. i. Erbersdobler (2014). "CD57 expression in incidental, clinically manifest, and metastatic carcinoma of the prostate." **2014**.

Warnakulasuriya, S. (2018). "Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders." *J Oral surgery, oral medicine, oral pathology oral radiology* **125**(6): 582-590.

Warnakulasuriya, S. J. O. o. (2009). "Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer." **45**(4-5): 309-316.

Wasik, A. M., J. Grabarek, A. Pantovic, A. Ciešlar-Pobuda, H. R. Asgari, C. Bundgaard-Nielsen, M. Rafat, I. M. Dixon, S. Ghavami, M. J. J. I. r. o. c. Łos and m. biology (2014). "Reprogramming and carcinogenesis—parallels and distinctions." **308**: 167-203.

Yu, S. S. and N. J. J. o. c. p. Cirillo (2020). "The molecular markers of cancer stem cells in head and neck tumors." **235**(1): 65-73.

Zancope, E., N. Costa, A. Junqueira-Kipnis, M. Valadares, T. Silva, C. Leles, E. Mendonça, A. J. J. o. o. p. Batista and medicine (2010). "Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma." **39**(2): 162-167.

ANEXO A – Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE HNK1, OCT3/4 E SOX2 EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO

Pesquisador: Filipe Modolo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27678719.6.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.908.800

Apresentação do Projeto:

Projeto de tese de Rubia Teodoro Stuepp, orientada pelo professor Filipe Modolo Siqueira do Programa de Pós-Graduação em Odontologia/CCS/UFSC. Estudo retrospectivo observacional transversal descritivo e exploratório, com 70 participantes.

Critérios de inclusão: 30 casos de Queilite Actínica, 30 casos de Carcinoma Epidermoide de Lábio e 10 casos de epitélio não neoplásico (ENN) provenientes de mucocelos de lábio. As amostras teciduais serão selecionadas por conveniência no arquivo de casos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. As amostras a serem incluídas no estudo pertencem ao Biobanco do Laboratório de Patologia Bucal/CCS/UFSC e tiveram TCLE autorizando futuras pesquisas já na doação da amostra. **Critérios de exclusão:** Serão excluídos da amostra os casos em que houver discordância quanto ao diagnóstico ou classificação, ou que a realização da reação imuno-histoquímica for inexecutável, pela necessidade de preservação de material em arquivo.

Intervenções: Os casos selecionados em banco serão analisados por dois investigadores para confirmar o diagnóstico inicial. Nos casos confirmados serão feitos novos corte histológicos para reação de imuno-histoquímica com os anticorpos anti-HNK1, anti-OCT3/4 e anti-SOX2.

Os dados clínicos dos pacientes serão coletados a partir das fichas de biópsias recebidas no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC, não haverá consulta a prontuários.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 3.908.800

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar a expressão imuno-histoquímica de HNK1, OCT3/4 e Sox2 em lesões potencialmente malignizáveis do tipo queilite actínica (QA) e no carcinoma epidermoide de lábio (CEL) diagnosticados na Universidade Federal de Santa Catarina.

Objetivos Secundários: - Classificar as QAs de acordo com seus graus de displasia epitelial utilizando a classificação da OMS e a classificação Binária (referências); - Classificar os CEL de acordo com seus graus de diferenciação de acordo com a classificação da OMS; - Determinar a imunoexpressão das proteínas HNK1, OCT3/4 e Sox2 em tecido não neoplásico, QA e CEL; - Comparar a expressão de cada uma das proteínas entre os grupos estudados; - Comparar a expressão de cada uma das proteínas com a diferenciação histopatológica nos CEL e com o grau de displasia epitelial nas QA; - Correlacionar os níveis de expressão das proteínas HNK1, OCT3/4 e Sox2 entre si.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: "A perda de sigilo dos dados será o maior risco desta pesquisa, no entanto todos os cuidados que serão tomados para evitá-lo".

Benefícios: Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura em casos de câncer de lábio e queilite actínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto assinada pelo pesquisador responsável e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia/CCS/UFSC.

A declaração de aceite institucional, conforme apresentada foi assinada pela coordenadora do Biobanco professora Dra. Elena Riet Correa Rivero.

Coleta de dados prevista para iniciar após aprovação do projeto no CEPESH/UFSC.

O TCLE já foi assinado pelo participante ao doar a amostra, fato que justifica a solicitação de dispensa de TCLE.

Recomendações:

Não há.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.908.800

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram sanadas as pendências ou inadequações ao projeto.

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1488905.pdf	14/02/2020 16:08:56		Aceito
Outros	Carta_resposta.docx	14/02/2020 16:08:11	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_3826160.pdf	14/02/2020 16:07:07	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
Outros	Parecer_Biobanco.pdf	14/02/2020 16:06:37	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biobanco.pdf	14/02/2020 16:05:58	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEPSH.docx	14/02/2020 16:05:36	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_510.pdf	14/02/2020 16:05:01	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_466.pdf	14/02/2020 16:04:48	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	14/02/2020 16:03:27	Rubia Teodoro Stuepp	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.908.800

FLORIANOPOLIS, 10 de Março de 2020

Assinado por:
Nelson Canzian da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br