

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

TAIANE BERGUEMAIER DE LIMA

AUTOFAGIA NA CARCINOGENESE BUCAL

PORTO ALEGRE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

TAIANE BERGUEMAIER DE LIMA

AUTOFAGIA NA CARCINOGENESE BUCAL

Linha de Pesquisa: Câncer bucal

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito á obtenção do título de mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

de Lima, Taiane Berguemaier
Autofagia na carcinogênese oral / Taiane
Berguemaier de Lima. -- 2016.
65 f.

Orientador: Fernanda Visioli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Câncer Bucal. 2. Leucoplasia. 3. Autofagia . 4.
LC3-II. 5. Carcinogênese. I. Visioli, Fernanda ,
orient. II. Título.

“ O tempo muito me ensinou:

Ensinou a amar a vida,

Não desistir de lutar,

Renascer na derrota,

Renunciar ás palavras e pensamentos negativos,

Acreditar nos valores humanos,

E a ser OTIMISTA.

Aprendi que mais vale tentar do que recuar....

Antes acreditar

do que duvidar,

que o que vale na vida,

Não é o ponto de partida

E sim a nossa caminhada”

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Muito difícil encontrar palavras para descrever os momentos e as pessoas que participaram da construção deste sonho juntamente comigo. Eles foram vividos e sentidos com todos os encantos que merecem, e nada mais do que justo, agradecer a todos aqueles que me ajudaram a concretizá-lo.

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, a **Santa Rita de Cássia** e aos **anjos de luz** por me guiarem e me protegerem durante essa trajetória, e por me guardarem tudo o que foi de melhor para mim.

Agradeço também:

Aos meus pais, **Vilmar** e **Mara**, por acreditarem no meu sonho e não medirem esforços para que ele se realizasse, por estarem comigo nos momentos de glória e dificuldade, sempre me motivando com sua fé e sabedoria. Não existem palavras para agradecer tudo o que vocês fazem por mim, vocês são meus exemplos de humanidade, amor e força. Sou eternamente grata, Amo vocês.

A minha irmã **Taciane**, minha companheira, amiga e confidente de vida, por estar sempre ao meu lado, me proporcionando força, ajuda e carinho ao longo dessa trajetória. Teu amor e amizade foram fundamentais para essa conquista, muito obrigada, a mana te ama.

Aos meus avós **Renato** e **Vilma**, pelo amor, carinho e por seus sábios conselhos durante todo esse percurso, os quais são sempre estimuladores e

valiosos na construção da minha vida. Muito obrigada.

A **Chica**, minha eterna dadá, que cuida de mim desde quando era bebê até os dias atuais, Muito obrigada por ter me estimulado a alcançar voo em direção aos meus desejos.

A minha orientadora **Fernanda Visioli**, não existem palavras para agradecer por toda confiança depositada em mim na realização deste trabalho, e por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas. Obrigada por ser muito mais que uma orientadora, por ser uma amiga, uma colega, por ser a minha mãe patológica, sempre fazendo o melhor por mim e querendo a minha felicidade, jamais vou esquecer teu carinho, tua paciência, teus ensinamentos e amor comigo, espero ser uma profissional competente e acima de tudo humana como tu és. Obrigada e Obrigada.

Ao meu amigo-irmão **Rodrigo Montezano**, por ter vivido comigo todos os anseios e conquistas dessa etapa, e mesmo assim sempre permanecer ao meu lado me proporcionando alegria e força. A nossa amizade é de grande valia em minha vida.

A **Rúbia**, minha irmã patológica, por viver, chorar e sorrir cada momento desta etapa como se fosse o seu. Obrigada por sempre me aconselhar e estar presente na minha vida. Nosso elo de amizade é para sempre e nunca vou esquecer tudo o que fizeste para me ver feliz.

A **Viviane Palmeira**, minha segunda mãe patológica, minha protetora e acima de tudo amiga. Não há palavras para agradecer todo teu carinho e paciência

comigo durante esses dois anos. Teu amor comigo foi fundamental para essa conquista, sou eternamente grata a ti e a tua família que sempre me recebeu com muita alegria.

Aos meus colegas e amigos do grupo de pesquisa “**Visiólicos**”, Isadora, Bianca, Bruna, Arthur, Eduardo, Júlia e Caru, aprender e discutir com vocês nos nossos encontros científicos semanais tornou tudo mais fácil e agradável. Levarei o carinho de cada um de vocês sempre comigo. Vocês são parte desta conquista.

As “**manoeletes**”, Liana, Vivian, Marina, Camila, Fernanda e Jú, muito obrigada pelo carinho intenso que vocês tem comigo e por sempre quererem me ajudar e me ensinar algo novo no universo patológico.

As “**pantinhas**”, Bruna, Natália Daroit, Natalia Koerich, Alessandra, por sempre serem prestativas e me auxiliarem com muito carinho no que eu precisava para a realização deste trabalho.

Á todos os demais **amigos e colegas da Patologia Bucal**, Luciano, Ana Claudia, Kelly, Isa Klein, Bibiana, Paloma, Léo, Alessandro, Grasi, Thaise, Felipe e Francisca. Obrigada por todo auxílio durante a realização deste sonho.

Aos demais amigos que conquistei ao longo dessa caminhada na faculdade, Júlia, Fernandinha, Lia, Luíse, Fernando, Paula, Carina, Fran, Sami, Aline o meu muito obrigada. Também agradeço em especial a minha amiga **Carol Klabunde**, por cada palavra de carinho que tens comigo e por tua alegria contagiar o meu dia-a-dia, tua amizade é essencial.

Aos professores da Patologia Bucal, Márcia Oliveira, Laura Hildebrand, Manoela Martins, Marco Martins, Vinicius Carrard, Marcelo Lammers, Anna Fossati, Lisiane, Pantelis Rados e em especial ao professor Manoel Sant'Ana por confiar em mim ao me conceder uma bolsa de mestrado. A todos muito obrigada pelo apoio na realização desse projeto e na minha formação. O que eu aprendi com vocês levarei eternamente comigo!

Aos professores do Centro Universitário Franciscano, os quais foram fundamentais na minha formação como Cirurgiã-Dentista, em especial às professoras **Leticia Bento** e **Bianca Zimmermann** por me incentivarem na realização desse mestrado. Muito obrigada por todas as apostas e votos de confiança.

As profs. **Kívia Linhares Ferrazzo**, **Márcia Payeras** e **Paula Bohrer**. Se hoje sigo essa carreira acadêmica é pela forte admiração que sinto por vocês e por tudo o que vocês me ensinaram.

As minhas **colegas e amigas de profissão e de faculdade**, Luana Fisher, Stefania Scapin, Bruna Bertulini, Elisa Dalasta, Aline Cassol e Claudinara Mentges por sempre me incentivarem nesse caminho e por estarem sempre torcendo por mim.

As minhas **amigas de infância** que tenho o privilégio de conviver até hoje, Camila Cruz, Daniela Leira e Marielli Sagrillo, obrigada por sempre estarem ao meu lado, tornando cada conquista mais doce.

Por fim e não menos importante á **Universidade Federal do Rio Grande do**

Sul, pelo ensino de qualidade e ao **CNPq** por financiarem este projeto, assim como meu curso de pós-graduação.

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------|----|
| RESUMO..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 14 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 15 |
| ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA..... | 16 |
| OBJETIVOS..... | 31 |
| REFERÊNCIAS..... | 32 |
| ARTIGO CIENTÍFICO..... | 39 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 63 |

RESUMO

Autofagia é o processo catabólico que ocorre nos lisossomos, e tem por finalidade degradar os componentes celulares e proteínas que já não são mais funcionantes e, assim manter seu equilíbrio homeostático para sobreviverem adequadamente em condições estressantes. Diante das funções biológicas da autofagia identificadas até hoje, a relação entre autofagia celular e neoplasias está provavelmente entre as mais estudadas, devido ao papel duplo que a autofagia exerce sobre o desenvolvimento do câncer, podendo atuar como um mecanismo supressor de tumor ou, podendo ser um mecanismo fundamental para a sobrevivência de células neoplásicas. No entanto, em lesões potencialmente malignas não se sabe sobre o comportamento do processo autofágico. Dessa forma, nosso estudo se propôs a estudar o comportamento da autofagia em neoplasias e em lesões potencialmente malignas bucais e correlacionar com os parâmetros clínicos e a evolução dessas lesões. Para tal finalidade foi utilizado a técnica de imunistoquímica para avaliar em amostras de mucosa normal, leucoplasias e carcinomas espinocelulares bucais, o percentual de células positivas para o marcador LC3-II. Foram avaliadas 7 amostras de mucosa bucal normal, 51 leucoplasias e 120 carcinomas espinocelulares. Para a análise de carcinomas espinocelulares foi construído um microarranjo tecidual com 2 cilindros de cada paciente. Observamos o aumento dos níveis de autofagia no carcinoma espinocelular bucal ($p < 0,001$) em relação aos outros grupos, porém sem associação com a evolução e sobrevida desses pacientes. Entre as leucoplasias, observamos maior percentual de células positivas na camada intermediária de leucoplasias

displásicas ($p=0,0319$) e na camada basal de lesões com pior evolução ($p=0,0133$). Concluimos que os níveis de autofagia aumentam durante o processo de carcinogênese bucal e estão correlacionados com o pior comportamento das leucoplasias.

Palavras-chave: Câncer bucal; Leucoplasia; Autofagia, LC3-II.

ABSTRACT

Autophagy is a catabolic process to digest the cell components and proteins that are no functional anymore. Autophagy maintains the homeostasis in order to cells survive in stressful conditions. In view of the biological functions of autophagy identified to date, the relationship between cellular autophagy and neoplasia is probably among the most studied, due to the dual role that autophagy exerts on the development of cancer. Cell autophagy can act as a tumor suppressor mechanism, or as a key mechanism for the survival of neoplastic cells. However, it is not known in potentially malignant lesions how the autophagic process is controlled. Therefore, the purpose of this study is to assess the autophagic process in oral cancer and potentially malignant oral lesions and to correlate with clinical parameters and the evolution of these lesions. For this purpose, the immunohistochemical technique was used to evaluate the percentage of cells positive for the LC3-II marker in the normal mucosa, leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples. Seven samples of normal buccal mucosa, 51 leukoplakia and 120 squamous cell carcinomas were evaluated. For the squamous cell carcinomas analysis, a tissue microarray with 2 cylinders of each patient was constructed. We observed increased levels of autophagy in oral squamous cell carcinoma ($p < 0.001$) in relation to the other groups, however no association with the prognosis and survival of these patients was detected. Among the leukoplakias, we observed a higher percentage of positive cells in the intermediate layer of dysplastic leukoplakias ($p = 0.0319$) and in the basal layer of lesions with worse prognosis ($p = 0.0133$). We conclude that autophagy levels increase during the process of oral carcinogenesis and are correlated with the worse behavior of leukoplakia

Key-words: Oral Cancer; Leukoplakia; Autophagy; LC3-II.

LISTA DE ABREVIATURAS

Bcl-2 – proteína 2 de linfoma de células B (*B-cell Lymphoma 2*)

Bec-1 – beclina-1 (*Beclin-1*)

EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

HIF-1 – fator induzido por hipóxia 1 (*Hypoxia-induced Factor 1*)

LC3 I/II – formas I e II da cadeia leve 3 das proteínas associadas a microtúbulos 1A e 2A (*Light Chain 3 of microtubule-associated protein 1A and 2A*)

mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin*)

PI3k (I a III) – fosfatidilinositol 3-cinase (classes I à III) (*Phosphoinositide Kinase-3 class I to III*)

Proteínas Atg – membros da família de proteínas relacionadas à autofagia (*Autophagy-related protein*)

3- MA - *3-Methyladenine autophagy inhibitor*

OMS – Organização Mundial da Saúde

TMA - *Tissue Microarray*

TNM – Sistema de estadiamento tumoral

LISTA DE FIGURAS

Antecedentes e Justificativa

Figura 1 – Evolução da severidade das alterações epiteliais e das alterações clínicas das lesões potencialmente malignas.....21

Figura 2 – Formação do autofagossomo.....24

Figura 3 – Via de sinalização da autofagia. São mostradas as principais proteínas envolvidas no processo autofágico.25

Artigo Científico

Figura 1 – Marcação imunohistoquímica de LC3-II nos grupos de lesões estudadas em comparação com a mucosa normal.....47

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1.1 CÂNCER BUCAL

O câncer é considerado atualmente um problema de saúde pública para o Brasil e para os demais países. Estima-se para a próxima década, que mais de 20 milhões de casos novos possam surgir até o ano de 2025. Somente para o Brasil estima-se a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer para o ano de 2016 e 2017 (INCA, 2016).

O câncer de cabeça e pescoço representa as neoplasias malignas das vias aerodigestivas superiores como cavidade bucal, laringe, faringe e seios paranasais (CASATI et al., 2012). O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é considerado o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo (YU et al., 2011; SIEGEL et al., 2011).

Na cavidade bucal o carcinoma espinocelular é o tumor maligno mais frequente, representando aproximadamente 90% das neoplasias malignas que acometem os diversos sítios anatômicos intrabucais (BRENER et al., 2007, DRAGOMIR et al., 2010). A localização anatômica mais comumente acometida pelo carcinoma espinocelular bucal é o bordo posterior da língua (além de ser a localização com as taxas mais elevadas de mortalidade), seguida pelo assoalho bucal (BRENER et al., 2007; SIEGEL et al., 2011; HASHIM et al., 2016).

Somente para o Brasil estima-se no ano de 2016, 11.140 novos casos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.350 em mulheres (INCA, 2016).

Acredita-se que esses valores são ocasionados por falta de conscientização sobre os sintomas e causas do câncer bucal, sendo necessário uma abordagem através da educação pública para conseguir se reduzir o número de casos novos da doença (WARNAKULASURIYA, 2009).

O câncer de boca tem como principais agentes etiológico o tabaco, álcool, a exposição à radiação ultravioleta e a imunossupressão. Muitos fatores relacionados ao estilo de vida, mas também ao meio ambiente e a genética podem desempenhar alterações sistêmicas no indivíduo e contribuir para a carcinogênese (SCULLY; BAGAN, 2009).

O prognóstico do carcinoma espinocelular bucal depende principalmente do tamanho do tumor, do envolvimento ganglionar, da localização anatômica e da escolha do tratamento (SCULLY; BAGAN, 2009). As principais formas de tratamento para essa neoplasia são a cirurgia, a radioterapia, e quimioterapia sendo que a forma de tratamento é indicada de acordo com a localização do tumor, tipo histológico e estadiamento clínico (INCA, 2001). O prognóstico do carcinoma espinocelular bucal, bem como os demais tumores é dependente do estadiamento do tumor (GÖDENEY, 2014). A utilização da classificação TNM é um sistema mundialmente aceito para descrever a extensão de um tumor, ela é composta por três análises que nomeiam esta classificação, a extensão do tumor primário (estágio T), a presença de linfonodos regionais (estágio N) e, a presença de metástases distantes (estágio M) sendo que cada estágio clínico apresenta uma classificação de acordo com as características do tumor (GREENE; SOBIN, 2008).

Geralmente o prognóstico é favorável em estágios iniciais, especialmente aqueles que são bem diferenciados e não metastáticos, mas infelizmente a maioria das lesões são diagnosticadas em uma fase tardia da doença (SCULLY; BAGAN, 2009). A taxa de sobrevivência da doença quando diagnosticada em estágios iniciais é de 80% e quando diagnosticada tardiamente é apenas de 20% (SCULLY; BAGAN, 2009).

No entanto, muitas vezes se observa que mesmo lesões com o mesmo estadiamento clínico e localização apresentam comportamento clínico diferentes. Ainda não existem critérios bem definidos que possam prever o comportamento clínico e a evolução dos carcinomas espinocelulares bucais. Diante disso, o uso de biomarcadores poderia auxiliar no monitoramento da progressão da doença ou atuando como um indicador de prognóstico (SINEVICI; O'SULLIVAN, 2016). Os biomarcadores envolvem os eventos moleculares desregulados durante a carcinogênese que participam na sinalização celular, crescimento, sobrevivência, motilidade, angiogênese e controle do ciclo celular. Os biomarcadores mais estudados incluem os oncogênes de sinalização de proliferação, o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e a Ciclina D1, os componentes p53 e p21 da sinalização anti-proliferativa, efetores apoptóticos tais como Bcl-2 e também componentes envolvidos na imortalização, angiogênese e invasão no processos de metástase (SANTOSH; JONES; HARVEY, 2016). Porém, até o momento nenhum biomarcador ou conjunto de biomarcadores mostrou-se totalmente eficaz na avaliação do câncer bucal.

1.2 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS BUCAIS

Globalmente é aceito que os carcinomas espinocelulares bucais podem ser precedidos por alterações visíveis na mucosa bucal, as quais são denominadas lesões potencialmente malignas. Estas alterações estão presentes na forma de manchas ou placas de coloração branca e/ou vermelha na mucosa bucal (GEORGE et al., 2011; LIU et al., 2012).

Dentre as lesões potencialmente malignas bucais, a leucoplasia é a mais comum (BSOUL et al., 2005). Atualmente a leucoplasia é caracterizada pela OMS, como uma mancha ou placa branca não removível por raspagem e que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra patologia (VAN DER WAAL, 2009 ; SCULLY; BAGAN, 2009).

A leucoplasia pode afetar qualquer local da cavidade bucal, dentre eles acometem principalmente região de mucosa mandibular e mucosa bucal (WALDRON; SHAFER, 1975). A prevalência da leucoplasia bucal é de aproximadamente 2% no mundo (PETTI et al., 2003). Outro estudo realizado em pacientes no sul do Brasil avaliou a prevalência de lesões de mucosa bucal e observou-se uma frequência de 1,1% de leucoplasias e essas lesões predominaram em pacientes do sexo masculino, etilistas e fumantes (CARRARD et al., 2011).

A etiologia dessa doença continua desconhecida, apesar de inúmeros agentes químicos serem propostos como causadores da leucoplasia. Estes agentes incluem o tabaco, álcool e radiação ultravioleta (NAIR et al., 2012). Petti e colaboradores, em 2003, observaram que a prevalência de leucoplasias

é seis vezes maior em pacientes fumantes do que em não fumantes.

O diagnóstico da leucoplasia é clínico e por exclusão de outras patologias. Frente ao diagnóstico clínico da leucoplasia é necessário realizar uma biópsia para a identificação das alterações epiteliais (VAN DER WAAL, 2009). Clinicamente as leucoplasias são subdivididas no tipo homogênea e não-homogênea. A leucoplasia do tipo homogênea é plana, fina, uniforme e de cor branca (WARNAKULASURIYA et al.,2007; VAN DER WAAL, 2009). Podendo ou não apresentar fissuras e os bordos das lesões, podem ou não, estar bem delimitados à mucosa bucal normal. Geralmente, regridem espontaneamente após a eliminação de fatores irritativos (MARTINS et al.,2008). A leucoplasia do tipo não-homogênea é caracterizada predominantemente por lesões brancas e planas, e por algumas lesões vermelhas irregulares ou nodulares (MARTINS et al.,2008). Esta variação denomina-se de eritroleucoplasia e tem um risco acrescido de malignização (WARNAKULASURIYA et al.,2007; VAN DER WAAL, 2009).

Microscopicamente as lesões com potencial de malignização apresentam alterações epiteliais que variam desde áreas de atrofia ou hiperplasia, acantose, hiperqueratose, displasia epitelial e até carcinoma espinocelular (VAN DER WAAL, 2009). As lesões que apresentam displasia epitelial, muitas vezes está correlacionada com o sub-tipo clínico não-homogêneo, sendo em geral considerado o mais importante indicador do potencial de malignização (VAN DER WAAL, 2009). De acordo com WALDRON e SHAFER (1975), após a análise microscópica de 3256 lesões diagnosticadas clinicamente como leucoplasias, 80% das lesões apresentavam combinações de

hiperortoceratose, hiperparaceratose e acantose. Observou-se também a presença de 12,2% de displasia leve a moderada nas lesões, 4,5% de displasia epitelial grave ou carcinoma *in situ* e foram diagnosticados 3,1% como carcinomas espinocelulares.

A figura 1 representa o espectro de alterações clínicas e microscópicas que podem ocorrer nas lesões de leucoplasias bucais.

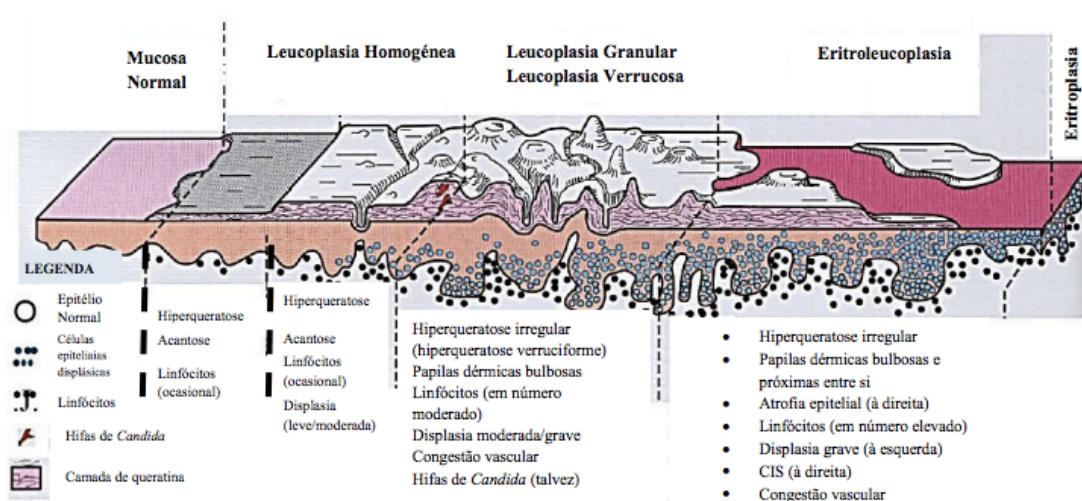


Figura 1 – Evolução da severidade das alterações epiteliais e das alterações clínicas das leucoplasias. **Fonte:** NEVILLE et al. Patologia Oral e Maxilofacial. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

Atualmente, considera-se que a taxa de transformação maligna de lesões leucoplásicas anualmente é de aproximadamente 1% (VAN DER WAAL, 2009). No entanto, estes dados variam na literatura. Um estudo realizou 101 biópsias de lesões diagnosticadas clinicamente como potencialmente malignas revelando que 69% dessa amostra apresentava displasia epitelial ou carcinoma *in situ*. De todas as lesões 12% desenvolveram carcinoma espinocelular após

um período médio de acompanhamento de 7 anos e meio. (HOLMSTRUP et al., 2007).

São considerados fatores de risco de transformação maligna: o gênero feminino, a longa duração da lesão, a leucoplasia em não-fumantes, a localização da lesão na língua ou assoalho bucal, dimensões superiores a 2cm e a presença de displasia epitelial (FELLER L; LEMMER J, 2012; LIMA et al., 2012; HOLMSTRUP et al., 2006).

A excisão cirúrgica continua a ser o tratamento de escolha da leucoplasia, porém outras modalidades terapêuticas são utilizadas como a criocirurgia, cirurgia a laser incluindo evaporação com CO₂, administração tópica ou sistêmica de retinóides e fundamentalmente a remoção de hábitos (VAN DER WAAL, 2009; NAIR et al., 2012).

Independente do tratamento utilizado e das características da lesão, não é possível prever com certeza se a leucoplasia irá ou não evoluir para transformação maligna. Assim, o uso de biomarcadores também poderia ser utilizado para detectar as lesões com potenciais de transformação maligna, pois eles sinalizam as mudanças precoces no epitélio, correlacionando positivamente com o prognóstico da lesão (SINEVICI; O'SULLIVAN, 2016). Os biomarcadores sinalizam alterações celulares relacionadas a diferentes funções que podem estar associadas à carcinogênese e progressão tumoral. Uma importante função celular para manter a homeostasia em situações de estresse é a autofagia.

1.3 AUTOFAGIA CELULAR

A autofagia é uma via catabólica que ocorre com os lisossomos, para realizar a degradação de componentes celulares e proteínas que já não se encontram funcionais e assim manter a homeostasia celular. A autofagia é um processo complexo que compreende três vias, para realizar a entrega dos componentes celulares não funcionais para o lisossomo, que são: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (YANG et al., 2011).

A macroautofagia, também conhecida simplesmente como autofagia é iniciada pela formação de uma membrana ao redor de organelas e proteínas, denominada fagóforo. A fusão das extremidades do fagóforo origina uma estrutura fechada de dupla membrana, designada autofagossomo (Figura 2). A membrana externa do autofagossomo se funde com o lisossomo originando o autolisossomo que é responsável pela digestão celular (VAN LIMBERGEN et al., 2009).

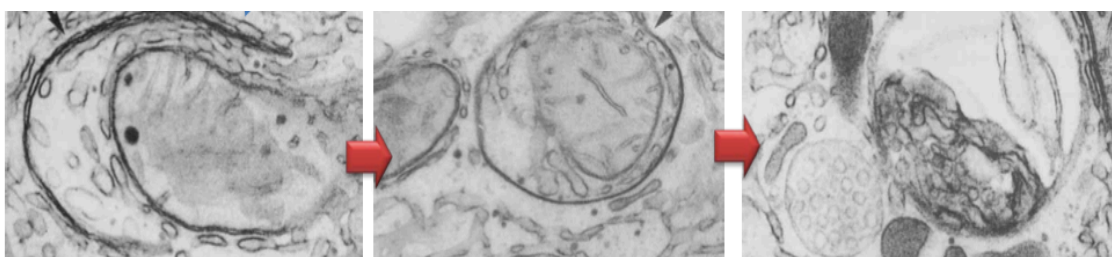
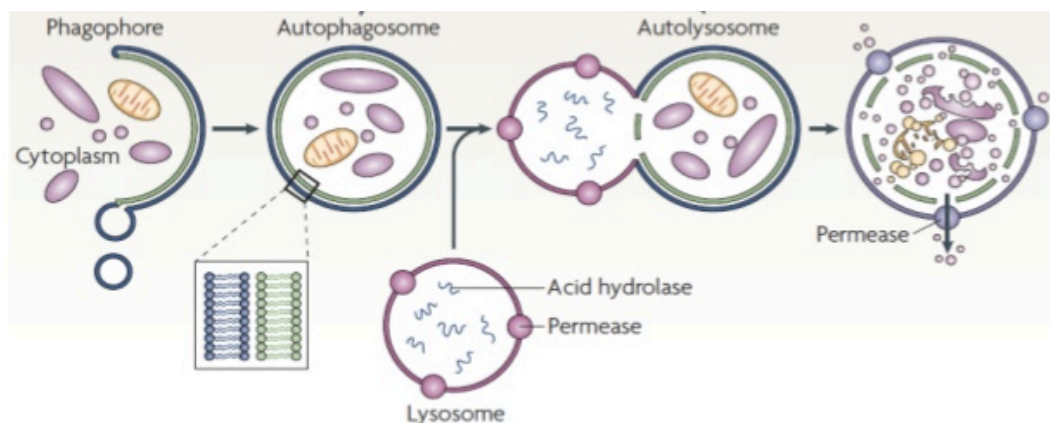


Figura 2 – Formação do autofagossomo. **Fonte:** Obtida de Meléndez, A. and Levine, B. Autophagy in *C. elegans* (August 24, 2009), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.147.1, <http://www.wormbook.org>.

A microautofagia tem sua origem a partir dos componentes citosólicos, que serão incorporados diretamente na superfície do lisossomo através da invaginação da membrana do lisossomo (VAN LIMBERGEN et al., 2009). A autofagia mediada por chaperonas ocorre através de chaperonas específicas que permitem a translocação de proteínas com pentapeptídeos específicos para o lisossomo, resultando na degradação das mesmas (VAN LIMBERGEN et al., 2009).

A via autofágica é controlada pelos genes ATG (Figura 3). A formação e expansão da membrana do autofagossomo é mediada por dois sistemas de conjugação de proteínas semelhantes a ubiquitina, o LC3 (Atg8) e o Atg12. O precursor de LC3 é modificado primeiramente pelo Atg4 para formar o LC3-I

que em seguida é modificado por Atg3 e Atg7 para uma forma menor, o LC3-II. O LC3-II é recrutado para o crescimento da membrana pelo Atg12. Em seguida o complexo Atg5-Atg12 se associa a Atg16 para iniciar o processo de prolongação da membrana através do recrutamento de LC3-II. Uma vez formado o autofagossomo, o complexo Atg-5-Atg12-Atg16 se dissocia da membrana autofágica e é reciclado juntamente com o LC3-II (VAN LIMBERGEN et al., 2009).

Nas células dos mamíferos, a via reguladora é melhor caracterizada através da classe I de PI3K (fosfoinosítide – 3 – quinase) e m-TOR, que atuam inibindo a autofagia. A m-TOR, atua inibindo a autofagia através das atividades inibitórias da serina/ trionina e ATG1 (VAN LIMBERGEN et al., 2009).

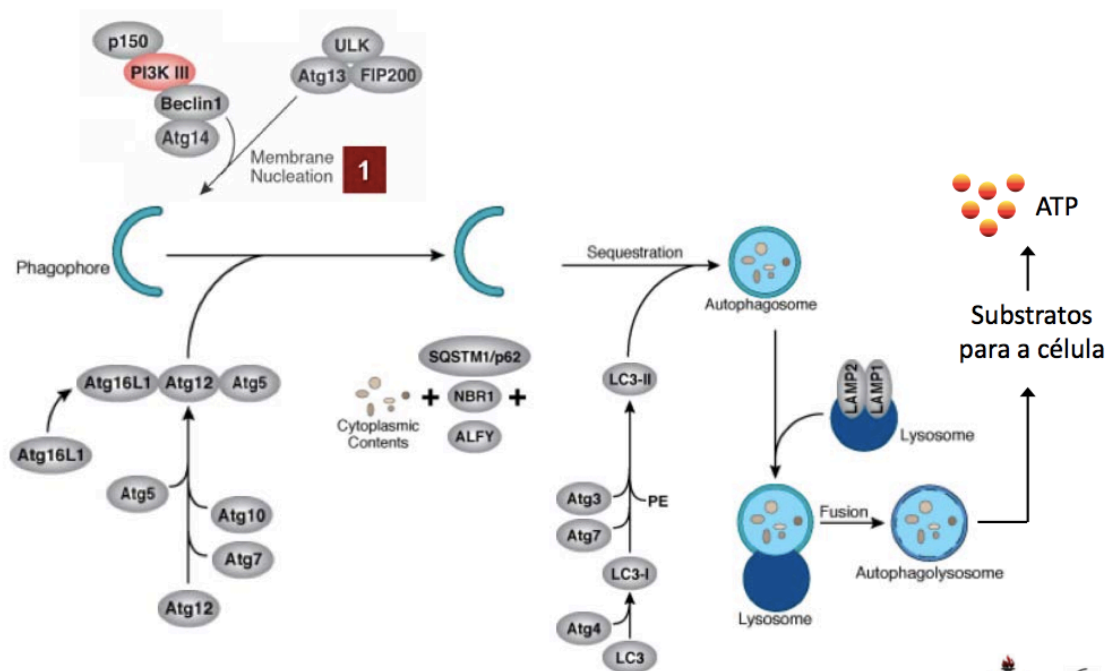


Figura 3 – Via de sinalização da autofagia. São mostradas as principais proteínas envolvidas no processo autofágico. Fonte: <http://www.cellsignal.com>.

No câncer, já foi demonstrado altos níveis de autofagia e este processo ocorre em decorrência de estresses presentes neste microambiente: a hipóxia, privação de nutrientes e a acidose. A hipóxia se encontra presente em diversas regiões dos tumores sólidos e resulta de um desequilíbrio entre produção e o consumo de oxigênio. A hipóxia é causada pela perfusão tecidual limitada e a vasculatura anormal do tumor (HOOGSTEEN et al., 2007). As evidências indicam que 60% dos tumores se desenvolvem em condições de hipóxia (YANG et al., 2015). A hipóxia induz a expressão do fator de transcrição HIF-1^α (fator de indução de hipóxia) que desencadeia uma resposta celular. O HIF-1^α é um regulador de autofagia induzida por hipóxia de mitocôndrias, denominada mitofagia, ocorrendo assim a redução da regulação da fosforilação oxidativa durante o processo de adaptação celular (ROHWER; CRAMER, 2011). Em estudos recentes com linhagens de células hepáticas humanas, foi verificado o aumento de marcadores de autofagia na presença do fator de transcrição HIF-1^α, concluindo-se que o mesmo regula e modula a autofagia (VAUPEL; MAYER, 2015).

A privação de fatores de crescimento no microambiente tumoral ocorre devido à intensa proliferação celular e deficiente aporte sanguíneo. Devido a essas alterações metabólicas, a oscilação entre autofagia e apoptose promove a homeostase do tecido e proporciona que as células resistentes à apoptose utilizem a autofagia como mecanismo de sobrevivência quando os fatores de crescimento são limitados e a absorção dos nutrientes diminui (ALTMAN; RATHMELL, 2009).

Também em ambientes de baixo pH, a autofagia foi observada pela identificação de proteínas associadas à autofagia como LC3 e pela presença de vacúolos de dupla membrana, os chamados autofagossomos (WOJTKOWIAK; GILLIES, 2012).

O mecanismo da autofagia celular, já foi identificado em diversas neoplasias malignas, como sendo um processo desregulado (MAYCOTTE; THORBURN, 2011). Desse modo, a função desse mecanismo intracelular catabólico pode tanto promover a sobrevivência tumoral, como desencadear a morte celular, porém esse fenômeno ainda não é completamente bem compreendido nesse tipo de patologia (HE; KLIONSKY, 2009).

Considera-se que a autofagia é importante na regulação do desenvolvimento e progressão do câncer, auxiliando também na resposta das células tumorais à terapia antineoplásica (HIPPERT; O'TOOLE; THORBURN, 2006). No entanto, o papel da autofagia nesse processo é complexo, apresentando um papel dual. De certo modo as funções da autofagia atuam como um mecanismo supressor de tumor, evitando o acúmulo de organelas e proteínas danificadas. Por outro lado, a autofagia é um mecanismo fundamental para a sobrevivência de células tumorais ao inóspito microambiente tumoral (ZHI; ZHONG, 2015).

No processo inicial da carcinogênese, a autofagia pode atuar como um mecanismo de supressão tumoral, eliminando organelas e proteínas celulares. Além disso, a autofagia nessa fase também degrada agentes tóxicos e citotóxicos, atuando assim como um mecanismo preventivo (HIPPERT;

O'TOOLE; THORBURN, 2006). Entretanto, não se sabe ao certo o mecanismo pelo qual a autofagia poderia contribuir para inibir o desenvolvimento do tumor, dentre as possibilidades, a mais aceita é a da degradação seletiva da catalase, que contribui para a neutralizar as espécies reativas de oxigênio, ocasionando a morte de células tumorais (HIPPERT; O'TOOLE; THORBURN, 2006). A autofagia nas células neoplásicas atua limitando o processo inflamatório, a instabilidade do genoma e dano tecidual, o que é benéfico para prevenir a carcinogênese (CUI et al., 2013).

No entanto, durante a carcinogênese as células necessitam da autofagia para sobreviverem ao microambiente que surge devido ao aumento da atividade proliferativa. Há muitos estudos que comprovam que a autofagia é ativada em células cancerígenas através de fatores causadores de estresse, como: hipóxia, acidez, privação de fatores de crescimento e em resposta a agentes terapêuticos (ALTMAN; RATHMELL, 2009). Considerando que a autofagia é importante para a sobrevivência das células tumorais, a inibição desse processo poderá ser um método para a terapia do câncer. Atualmente existem inibidores específicos para a autofagia, dentre eles, a Cloroquina e o 3-MA (3-Metiladenina), que tem a função de bloquear a via autofágica, através da supressão da função catalítica do lisossoma, ou seja, decorrente da neutralização do pH do lisossomo (CUI et al., 2013).

Diante do exposto, torna-se necessário um método para que se possa avaliar a macroautofagia em lesões. Uma possibilidade é a técnica de imunohistoquímica, no qual a utilização dos anticorpos, como o LC3-II, Beclin-I

e p62 detectam o processo autofágico em tecidos parafinados (HU et al., 2015).

A literatura relata sobre a relação da autofagia e o valor prognóstico em diferentes tipos de câncer, como de pulmão, carcinoma espinocelular bucal, hipofaringe e ovário, o qual demonstra que existe uma relação entre a progressão tumoral e o processo autofágico (SCHLAFLI et al., 2016; TANG et al., 2013; WANG et al., 2013; VALENTE et al., 2014). Estudos foram realizados para corroborar esse achado no câncer bucal, um estudo avaliou 90 casos de carcinoma espinocelular bucal, encontrando uma associação entre a elevada expressão imunohistoquímica de LC3-II como um indicador de pior prognóstico em carcinomas espinocelulares bucais (TANG et al., 2013). Outro estudo avaliou a expressão da proteína ATG16L1, responsável por atuar na formação do autofagossomo, em carcinoma espinocelular bucal e verificaram sua associação com parâmetros clínicos patológicos através da técnica de imunohistoquímica, onde observou-se associação entre a alta expressão da proteína ATG16L1 e estágios clínicos avançados, maior tamanho dos tumores e maiores taxas de recorrência (TANG et al., 2015). Ao contrário dessas informações, observou-se que em neoplasias de pulmão e adenocarcinomas esofágicos, os elevados níveis da proteína LC3 diminuem a agressividade tumoral (SCHLAFLI et al., 2016; SCHLAFLI et al., 2016).

Desse modo, verificamos que a autofagia é um processo que pode estar envolvido no desenvolvimento e progressão de neoplasias e os resultados apresentados na literatura são divergentes, sendo necessárias mais pesquisas para melhor se compreender a função da autofagia em tumores. Sendo assim,

através de nosso trabalho será estudado pela primeira vez na literatura a detecção de autofagia em leucoplasias bucais, e também será analisado o processo autofágico em carcinomas espinocelulares bucais, no formato de TMA.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação dos níveis de autofagia em carcinomas espinocelulares e leucoplasias bucais com os parâmetros clínico-patológicos e a evolução das lesões.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar em amostras teciduais de mucosa bucal normal os níveis de autofagia por imunohistoquímica da proteína LC3-II e correlacionar com parâmetros clínicos e a evolução das lesões.

- Avaliar em amostras teciduais de carcinomas espinocelulares os níveis de autofagia por imunohistoquímica da proteína LC3-II e correlacionar com parâmetros clínicos e a evolução das lesões.

- Avaliar em amostras teciduais de leucoplasias bucais os níveis de autofagia por imunohistoquímica da proteína LC3-II e correlacionar com parâmetros clínicos e a evolução das lesões.

4 REFERÊNCIAS

ALTMAN, B. J.; RATHMELL, J. C. Autophagy: Not good OR bad, but good AND bad. **Autophagy**, v. 5, p. 569–570, 2009.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev. bras. cancerol*, v. 53, n. 1, p. 63–69, mar. 2007.

BSOUL, S. A.; HUBER, M. A.; TEREZHALMY, G. T. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. **J Contemp Dent Pract**. v. 6, p. 1-16, 2005.

CARRARD, V. C. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Diseases**. v.17, p. 171-179, 2011.

CASATI, M. F. M. et al. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 41, n. 4, p. 186-191, 2012.

CUI, J.; GONG, Z.; SHEN, H. The role of autophagy in liver cancer: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1836, n. 1, p. 15-26, 2013.

DRAGOMIR, L. P. et al. Clinical, Epidemiological And Histopathological Prognostic Factors In Oral Squamous Carcinoma. **Current Health Sciences Journal**, v. 36, n. 4, 2010.

FELLER L, LEMMER J. Oral leukoplakia as it relates to HPV infection: a review. **Int J Dent.** v. 2012, p. 540-561, 2012.

GEORGE, A. et al. Potentially Malignant Disorders of oral Cavity. **Oral Maxillof Pathol J.** v. 2, p. 95-99. 2011.

GÖDENY, M. Prognostic factors in advanced pharyngeal and oral cavity cancer; significance of multimodality imaging in terms of 7th edition of TNM. **Cancer Imaging.** v. 14, p. 15, 2014.

GREENE, F.; SOBIN, L. The staging of cancer: A retrospective and prospective appraisal. **CA Cancer J. Clin.** v. 58, p. 180-190, 2008.

HASHIM, D. et al. The role of oral hygiene in head and neck cancer: Results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium. **Annals of Oncology Advance Access published,** 2016.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. **Annu Rev Genet.** v. 43, p. 67–93, 2009.

HIPPERT, M. M.; O'TOOLE, P. S.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? **Cancer Research,** v. 66, n. 19, p. 9349-9351, 2006.

HOLMSTRUP, P. et al. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol.** v. 42, p. 461-74, 2006.

HOLMSTRUP, P. et al. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? **J Oral Pathol Med.**v. 36, p. 262–266, 2007.

HOOGSTEEEN, I. J. et al. The hypoxic tumour microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. **Clinical Oncology**, v.19, n.6, p.385-396, 2007.

HU, Y; LEI, X; ZHANG, H; MA, J; YANG, W; CHEN, M; CUI, J; ZHAO, H. Expressions and clinical significance of autophagy- related markers Beclin1, lc3, and egFr in human cervical squamous cell carcinoma. **OncoTargets and Therapy**. v.8 2243–2249, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA/MS). Carcinoma Epidermóide da Cabeça e Pescoço. Condutas do INCA/MS. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 361-376, 2001. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/rbc/n_47/v04/pdf/normas.pdf >. Acesso em: 02 de maio de 2016, 16:00 horas.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> > Acesso em: 02 de novembro de 2016, 15:00 horas.

LIMA, J, S. et al. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non smokers. **Oral Pathol**. v. 26, p. 543-549, 2012.

LIU, W. et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia- clinocopathological factors affecting outcome. **Plos One**. v.7, n. 4, p.1-7, 2012.

MARTINS RB, GIOVANI EM, VILLALBA H. Lesions considered malignant that affect the mouth. **Ver Inst Cienc Saúde**, v.26, 467-476, 2008.

MAYCOTTE, P.; THORBURN, A. Autophagy and cancer therapy. **Cancer Biology & Therapy**. v. 11, n. 2, p. 127-137, 2011.

NAIR, D. R. et al. Oral cancer: premalignant conditions an screening-an update. **J Cancer Res Ther**. v. 8, p. 57-66, 2012.

NEVILLE, et al. Patologia Oral e Maxilofacial. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

PETTI, S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncology**. v. 39, p. 770–780, 2003.

ROHWER, N.; CRAMER, T. Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n. 3, p. 191-201, 2011.

ROSENFELDT, M. T. et al. Analysis of macroautophagy by immunohistochemistry. **Autophagy**. v. 8, n. 6, p. 963–969, 2012.

SANTOSH, A. B.; JONES, T.; HARVEY, J. A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. **J Can Res Ther**. v. 12, n. 2, p. 486-492, 2016.

SCHLAFLI, A. M. et al. Prognostic value of the autophagy markers LC3 and p62/SQSTM1 in early-stage non-small cell lung cancer. **Oncotarget**. v. 7, n. 26, p. 39544-39555, 2016.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncology**. v. 45, p. 301–308, 2009.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin.** v.61, n. 4, p. 212-236, 2011.

SINEVICI, N.; O'SULLIVAN, J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. **Oral Oncology.** v. 61, p.12–18, 2016.

TANG, J. et al. Overexpression of Autophagy-Related 16-Like 1 in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathol. Oncol. Res.** v. 21, p. 301–305, 2015.

TANG, J. Y. et al. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. **Human Pathology.** v. 44, p. 2558–2562, 2013.

VALENTE, G; MORANI, F; NICOTRA, G. et al. Expression and Clinical Significance of the Autophagy Proteins BECLIN 1 and LC3 in Ovarian Cancer. **Biomed Res Int**, p. 462658, 2014.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification, and present concepts of management. **Oral Oncol.** v. 45, p. 317–323, 2009.

VAN LIMBERGEN J. et al. Autophagy: from basic science to clinical application. **Mucosal Immunology**, v. 2, n. 4, p. 315-330, 2009.

VAUPEL, P,; MAYER, A. The Clinical Importance of Assessing Tumor Hypoxia: Relationship of Tumor Hypoxia to Prognosis and Therapeutic

Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 10, p. 878-80, 2015.

WALDRON, C.; SHAFER, W. Leukoplakia revisited a clinicopathologic study 3256 Oral Leukoplakias. **Cancer**. v. 36, n. 4, p.1386-1392, 1975.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**. v. 45, p.309–316, 2009.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**. v. 36, n.10, p. 575-580, 2007.

WANG, J; PAN, X; DING, L; LIU, D; LEI, D; JIN, T. Aberrant Expression of Beclin-1 and LC3 Correlates with Poor Prognosis of Human Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **PLOS ONE**. v. 8, e69038, 2013.

WOJTKOWIAK, J. W.; GILLIES, R. J. Autophagy on acid. **Autophagy**, v. 8, n. 11, p. 1688–1689, 2012.

YANG, X. et al. The role of autophagy induced by tumor microenvironment in different cells and stages of cancer. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 14, 2015.

YANG, Z. J. et al. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. **Mol Cancer Ther**. v. 10, p.1533–1541, 2011.

YU, C. C. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. **Journal of Oncology**. 2011.

ZHI, X; ZHONG, Q. Autophagy in cancer. **F1000Prime Reports**. v. 7, p. 18, 2015.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

*** O artigo foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Oral Pathology & Medicine (Online ISSN: 1600-0714), no qual será submetido. Qualis A2, Fator de impacto 1,859

Autophagy Analysis in Oral Carcinogenesis

De Lima, T;¹ Pannone, G;² Visioli, F.¹

1. Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Departamento de Medicina Clínica e Experimental, Universidade de Foggia, Itália.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de autofagia, através da marcação imunoistoquímica de LC3-II em leucoplasias e carcinomas espinocelulares em comparação com a mucosa bucal normal.

Metodologia: 7 mucosas bucais normais, 51 leucoplasias bucais e 120 carcinomas espinocelulares bucais foram incluídos no estudo. Cortes histológicos das mucosas e leucoplasias foram avaliados em toda sua extensão, enquanto que os carcinomas foram avaliados na forma de TMA (Bloco microarranjo tecidual). Após a técnica de imunoistoquímica, as células

positivas para LC3-II foram quantificadas nas diferentes camadas epiteliais das mucosas e leucoplasias e nos microarranjos de carcinomas espinocelulares. A correlação entre células positivas com as diferentes variáveis clínico-patológicas e com a evolução das lesões foi testada pelo teste *t*, ANOVA e análise de sobrevida de Kaplan-Meier.

Resultados: Observamos aumento dos níveis de autofagia no CEC ($p < 0,001$) em relação aos outros grupos, porém sem associação com pior evolução e sobrevida desses pacientes. Entre as leucoplasias, observamos maior percentual de células positivas na camada intermediária de leucoplasias displásicas ($p = 0,0319$) e na camada basal de lesões com pior evolução ($p = 0,0133$).

Conclusão: Os níveis de autofagia aumentam durante o processo de carcinogênese bucal e estão correlacionados com o pior comportamento das leucoplasias.

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular bucal é considerado o sexto tipo de câncer mais frequente no mundo^{1,2}. A expectativa de vida por cinco anos é de cerca de 50% quando metástases linfonodais estão presentes e a sobrevida dos pacientes acometidos por essa patologia pouco se alterou nas últimas décadas³. Novos avanços na compreensão da biologia do câncer bucal são necessários para diminuir suas taxas de mortalidade.

O carcinoma espinocelular bucal pode ser precedido por alterações visíveis na mucosa bucal, denominadas desordens potencialmente malignas. Dentre elas a leucoplasia é a mais comum, com prevalência estimada de aproximadamente 2%⁴. O risco de transformação maligna é maior em lesões displásicas, no entanto algumas dessas lesões podem permanecer clinicamente inalteradas ou até mesmo regredirem por completo⁴. Atualmente, os principais fatores considerados de risco para transformação maligna são: gênero feminino, a longa duração da lesão, a leucoplasia em não-fumantes e a presença de displasia epitelial^{5,6,7}. No entanto, não é possível ainda prever o comportamento dessas lesões, sendo necessária a busca de biomarcadores que detectem alterações celulares que sinalizam o processo de carcinogênese.

Diante disso, entender o controle do desenvolvimento e progressão das neoplasias é necessário, sendo a autofagia celular um mecanismo importante para a ocorrência desse desfecho. Autofagia é um processo catabólico para degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas, sendo essas funções críticas na manutenção da homeostase celular e que possui como finalidade, preservar a viabilidade celular em condições de estresse⁸. O processo de iniciação da autofagia envolve diversos membros da família de proteínas Atg⁹. A formação do autofagossomo é mediada pelo Atg8 e Atg12. O Atg8 é modificado pelo Atg4 para formar o LC3-I que em seguida é modificado por Atg3 e Atg7 para uma forma menor, o LC3-II. O LC3-II é recrutado para o crescimento da membrana pelo Atg12. Em seguida o complexo Atg5-Atg12 se associa a Atg16 para iniciar o processo de prolongação da membrana através do recrutamento de LC3-II. Uma vez

formado o autofagossomo, o complexo Atg-5-Atg12-Atg16 se dissocia da membrana autofágica e é reciclado juntamente com o LC3-II¹⁰.

A autofagia é um processo que está envolvido no desenvolvimento e progressão do câncer, atuando possivelmente de modo dual na carcinogênese^{11,12}. Pode atuar como um mecanismo supressor de tumor, evitando assim o acúmulo de organelas e proteínas danificadas. Por outro lado, a autofagia pode ser um mecanismo fundamental para a sobrevivência de células no inóspito microambiente que surge durante a carcinogênese¹³.

Desse modo o objetivo do estudo, foi avaliar os níveis de LC3-II, um marcador de autofagia, em amostras teciduais de carcinomas espinocelulares e leucoplasias através da técnica de imunohistoquímica, e correlacionar com os parâmetros clínicos e a evolução das lesões.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizadas 7 amostras de mucosa bucal normal (provenientes de frenectomias labiais), 51 amostras de leucoplasias bucais e 120 amostras de tecidos de carcinomas espinocelulares bucais. As amostras foram provenientes do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e da Fundação G. Pascale, na cidade de Nápoles, Itália. As amostras de carcinoma espinocelular foram provenientes de peças

cirúrgicas da ressecção total do tumor, sendo que nenhum paciente recebeu nenhum tratamento prévio à cirurgia.

As lâminas foram revisadas por patologistas (FV, GP) para a caracterização da amostra, todas as informações clinico-patológicas foram obtidas dos arquivos dos laboratórios e dos prontuários dos pacientes. Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Parecer 1.394.505).

Nas amostras de leucoplasias, a evolução foi considerada boa, se a lesão não recidivou após uma biópsia total, se permaneceu inalterada após uma biópsia parcial, se diminuiu em tamanho ou regrediu, ou ainda se o aspecto clínico melhorou com o tempo. A evolução foi considerada ruim, se a lesão piorou o seu aspecto clínico ou aumentou de tamanho, se houve recidiva, se novas lesões surgiram ou se houve transformação maligna (VAN DER WAAL, 2009).

O consumo de álcool foi considerado como positivo quando o paciente ingeria ao menos 30g de álcool por semana. Os pacientes foram considerados ex-fumantes ou ex-alcoolistas se pararam de consumir essas substâncias há no mínimo 1 ano.

Construção do Microarranjo Tecidual

A partir das amostras de carcinoma espinocelular bucal foi construído um bloco de microarranjo tecidual (TMA). Após a seleção de áreas representativas, foram coletados de cada bloco de parafina, dois cilindros com

área de 0,28mm² e transferidos para o bloco receptor utilizando Galileo TMA CK 3500 (ISE TMA Software, Integrated System Engineering). Para cada paciente duas áreas foram selecionadas.

Imunoistoquímica

A partir dos blocos de parafina foram feitos cortes de 3 µm de espessura, estes foram desparafinizados e reidratados em etanol. Após foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com metanol e água oxigenada. A recuperação antigênica foi efetuada em panela de pressão a 121°C, e em seguida as amostras foram reincubadas com anticorpo primário (LC3-II, 1:100, Cell Signalling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) overnight a 4°C. O sistema de detecção utilizado foi EnVision™ + Dual Link (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e 3,3-diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, CA, EUA) foi utilizada para a visualização. Após, foi realizada a contra-coloração com Hematoxilina. Como controle positivo foi utilizada uma amostra de carcinoma espinocelular previamente testada e para controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune de cabra.

Quantificação das Mucosas Bucais normais e das Leucoplasias normais

Foram realizadas imagens de toda a extensão do corte histológico. As amostras foram capturadas com uma ampliação de 400 vezes usando o software Qcapture Versão 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc.; Surrey, BC, Canadá), além de um binóculo Microscópio modelo CX41RF (Olympus

América Latina Inc., Miami, FL, EUA) acoplado a uma câmara Qcolor 5, Coollet, RTV (Olympus América Latina Inc.) e conectado a um computador (Dimension 5150, Dell, Eldorado do Sul, RS, Brasil). Após capturadas as imagens, foi utilizado o software ImageJ para Mac OS X versão 1.5 (NIH, EUA) para a contagem de 1000 células para determinar o percentual de células marcadas positivas e negativas para autofagia, totalizando 1000 células na camada basal, 1000 células na camada parabasal, 1000 células na camada intermediária e 1000 células na camada superficial. A camada basal foi definida por conter pelo menos um ponto de contato com a membrana basal, a camada parabasal era composta por camadas celulares imediatamente acima da camada basal (de aspecto não achatado), a camada espinhosa localizada entre a camada parabasal e superficial, sendo a camada superficial caracterizada por células achatadas (VISIOLI et al., 2012).

Quantificação do TMA

Foi realizada a contagem das células positivas para o imunomarcador LC3-II nas lesões de carcinoma, utilizando um binóculo Microscópio modelo CX41RF (Olympus América Latina Inc., Miami, FL, EUA). Foram quantificadas todas as células neoplásicas em cada cilindro e determinado o percentual de células positivas para o anticorpo LC3 II. Ao final da quantificação foi realizada a média entre os dois cilindros analisados de cada paciente.

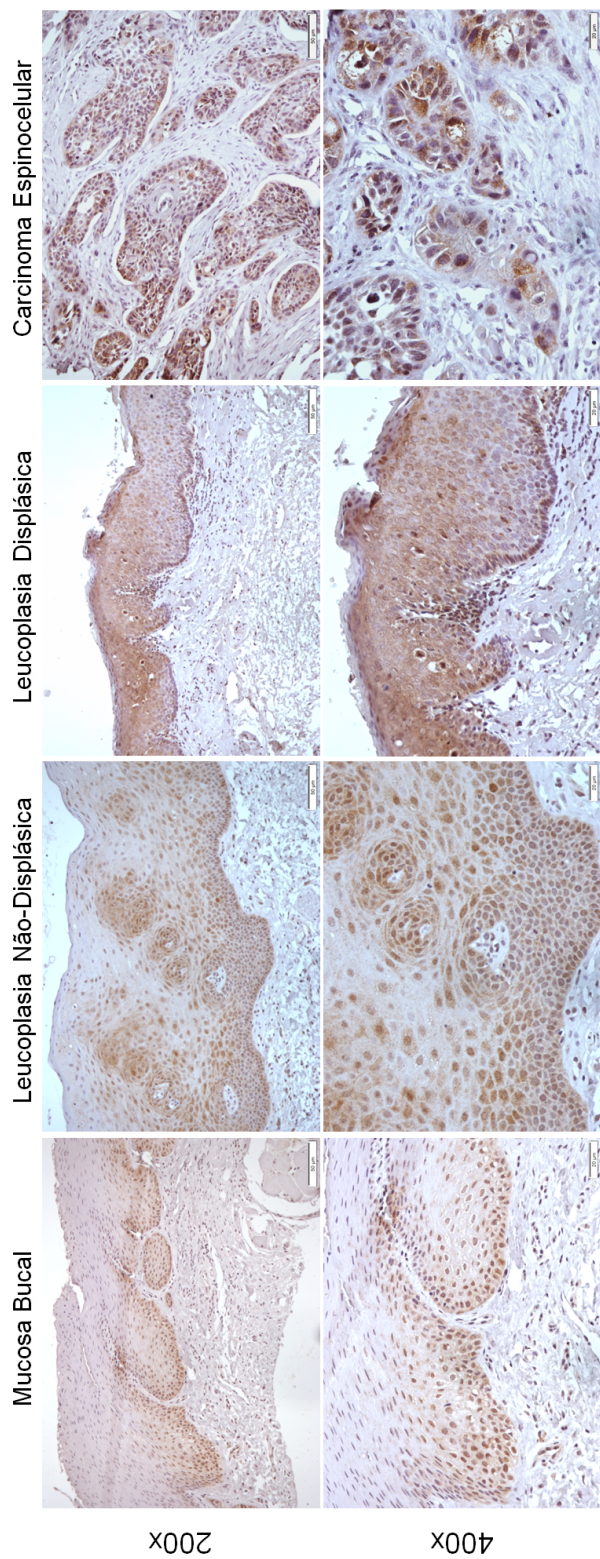
Análise dos Dados

Para a análise estatística foram utilizados os softwares SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, New York, USA) e GraphPad

Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). A distribuição dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Sminov. Sendo a distribuição paramétrica, os dados foram comparados pelo teste t de Student ou ANOVA. A análise de sobrevida foi realizada por meio da curva de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

A imunomarcção de LC3-II foi observada em todas as amostras analisadas (Figura1).



Foi observado um aumento crescente no percentual de células positivas para LC3-II da mucosa bucal normal para as leucoplasias e das leucoplasias para o carcinoma espinocelular ($p < 0.0001$) (Gráfico 1).

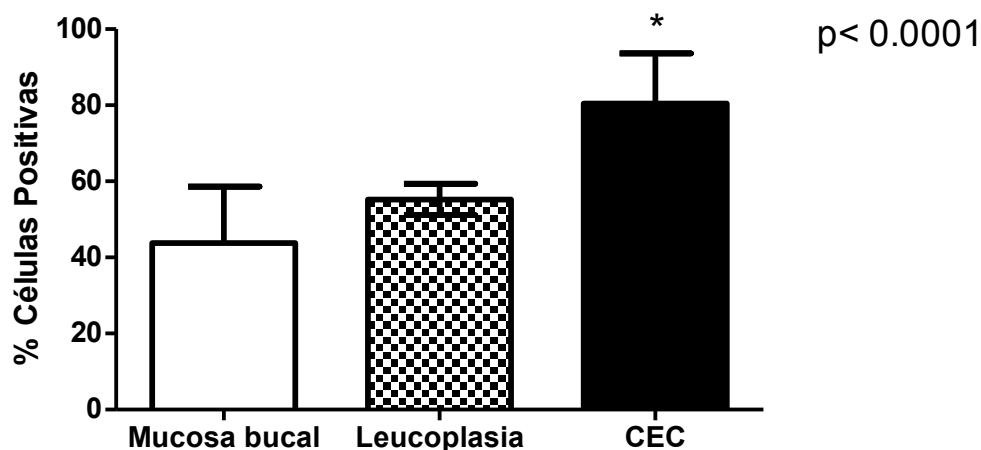


Gráfico 1. Distribuição das células positivas para LC3-II de acordo com o grupo estudado.

51 pacientes com leucoplasia foram estudados. O perfil demográfico desses pacientes está sumarizado na tabela 1. A maioria da amostra era composta por homens (60%), com média de idade de 55,86 anos, fumantes e consumidores de álcool. Os sítios mais acometidos foram língua (25,5%), assoalho bucal (15,68%) e palato (27,45%). A maioria das lesões eram não-homogêneas e não displásicas. A média de duração do acompanhamento dos pacientes com leucoplasia foi de 4,3 anos e para a maioria deles, o curso da doença piorou (39,21%), 4 pacientes apresentaram transformação maligna, sendo a maioria dessas lesões localizadas em bordo de língua e em pacientes do sexo feminino.

Tabela 1. Características Clínico-patológicas das leucoplasias bucais.

| | Características | N | % |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------|
| Sexo | Masculino | 30 | 60.78 |
| | Feminino | 21 | 39.22 |
| Idade | Média (\pm DP) | 55.86 \pm 12.24 | |
| | Variação | 26-79 | |
| Local da lesão | Palato | 14 | 27.45 |
| | Língua | 13 | 25.52 |
| | Assoalho da boca | 08 | 15.69 |
| | Outros | 14 | 27.45 |
| Status Tabagismo | Fumante | 18 | 35.29 |
| | Ex-Fumante | 06 | 11.76 |
| | Nunca fumou | 04 | 07.84 |
| | NI | 23 | 45.09 |
| Consumo Álcool | Consumidor | 18 | 35.29 |
| | Ex-consumidor | 05 | 09.80 |
| | Nunca Bebeu | 05 | 09.80 |
| | NI | 23 | 45.11 |
| Diagnóstico Histopatológico | Displásico | 20 | 39.21 |
| | Não-Displásico | 31 | 60.79 |
| Tipo Clínico | Homogêneo | 05 | 09.80 |
| | Não-Homogêneo | 25 | 49.02 |
| | NI | 21 | 41.18 |
| Evolução | Boa | 11 | 21.57 |
| | Ruim | 20 | 39.21 |
| | NI | 20 | 39.21 |

NI- não informado

Foi observado um aumento de imunomarcção de LC3-II nas leucoplasias bucais em comparação às amostras de mucosa bucal normal, principalmente nas camadas mais superiores do epitélio ($p= 0,0013$) (Tabela 2).

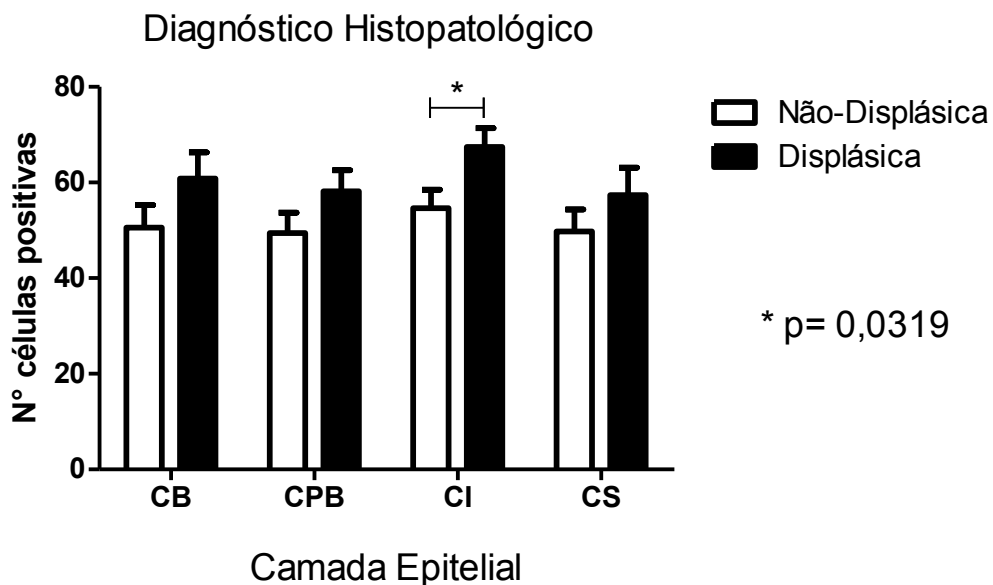
Tabela 2. Comparação entre a imunomarcção de LC3-II na mucosa bucal normal e em leucoplasias bucais.

| | % Células Positivas para LC3-II | | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------|-----------|------------------|-----------|----------------------|-----------|--------------------|-----------|
| | Camada Basal | | Camada Parabasal | | Camada Intermediária | | Camada Superficial | |
| | Média | DP | Média | DP | Média | DP | Média | DP |
| Mucosa | | | | | | | | |
| Bucal | 50.837 | (±18.990) | 46.467 | (±16.883) | 55.712 | (±11.625) | 22.344 | (±19.229) |
| Leucoplasia | 57.793 | (±22.193) | 54.865 | (±19.631) | 62.502 | (±19.652) | 53.576 | (±24.208) |
| <i>p</i> (Teste <i>t</i>) | 0,8690 | | 0,7501 | | 0,7539 | | 0,0013 | |

Não foram encontradas associações significativas entre a imunomarcção de LC3-II e o tipo clínico da leucoplasia, nem com o consumo de fumo e álcool (Tabela 3). Observamos um aumento de células positivas para LC3-II em lesões displásicas em comparação a não-displásicas (Gráfico 2) e na camada intermediária do epitélio esse aumento foi estatisticamente significativo ($p=0,0319$). As lesões de pior evolução apresentaram aumento da expressão de LC3-II (Gráfico 3), o qual foi significativo na camada basal ($p=0,0133$).

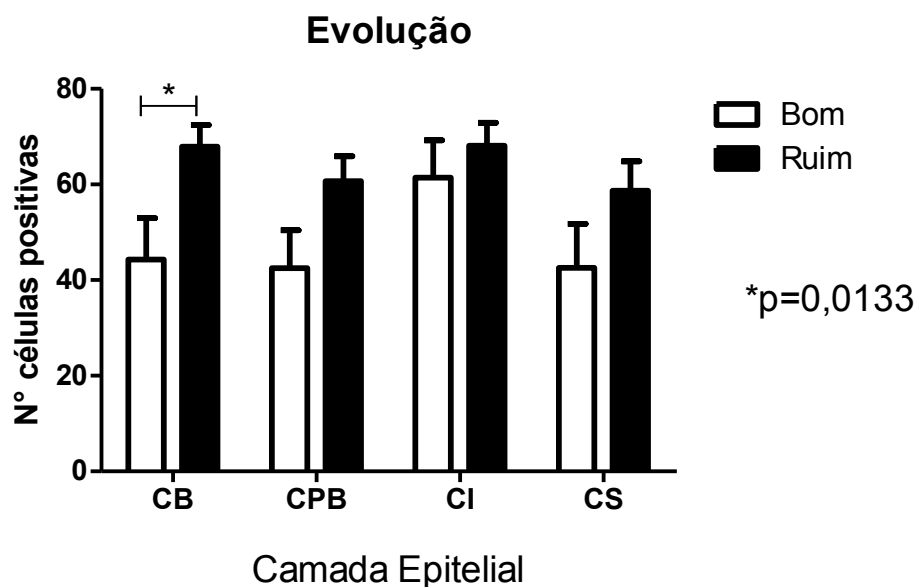
Tabela 3. Distribuição da imunomarcção de LC3-II de acordo com as variáveis estudadas em leucoplasias.

| | | % Células Positivas para LC3-II | | | | | | | |
|------------------|----------------------------|---------------------------------|----------|------------------|----------|----------------------|----------|--------------------|----------|
| | | Camada Basal | | Camada Parabasal | | Camada Intermediária | | Camada Superficial | |
| | | Média | DP | Média | DP | Média | DP | Média | DP |
| Aspecto Clínico | Homogênea | 63.64 | (±22.28) | 60.76 | (±17.32) | 69.26 | (±14.34) | 56.66 | (±30.00) |
| | Não-Homogênea | 50.65 | (±28.63) | 50.20 | (±26.24) | 60.10 | (±24.43) | 48.15 | (±27.76) |
| | <i>p</i> (Teste <i>t</i>) | 0.3529 | | 0.4023 | | 0.4313 | | 0.5469 | |
| Fumo | Fumante | 53.46 | (±29.19) | 51.00 | (±27.05) | 62.81 | (±26.18) | 49.04 | (±29.85) |
| | Ex-Fumante | 46.33 | (±30.08) | 43.78 | (±27.82) | 48.23 | (±24.67) | 48.68 | (±30.09) |
| | Nunca Fumou | 73.48 | (±21.3) | 68.85 | (±20.37) | 74.55 | (±14.20) | 58.58 | (±28.14) |
| | <i>p</i> (ANOVA) | 0.3652 | | 0.3779 | | 0.3370 | | 0.8384 | |
| Álcool | Consumidor | 55.85 | (±30.13) | 55.14 | (±25.92) | 64.12 | (±22.28) | 53.84 | (±28.93) |
| | Ex-Consumidor | 38.30 | (±32.20) | 37.53 | (±30.13) | 46.67 | (±30.70) | 44.03 | (±36.07) |
| | Nunca bebeu | 56.36 | (±14.26) | 52.04 | (±13.55) | 65.54 | (±12.20) | 58.22 | (±24.04) |
| <i>p</i> (ANOVA) | 0.6012 | | 0.5295 | | 0.4253 | | 0.7967 | | |



CB- camada basal CPB- camada parabasal CI- camada intermediária CS- camada superficial

Gráfico 2. Distribuição das células positivas para LC3-II de acordo com a camada epitelial e com o diagnóstico histopatológico.



CB- camada basal CPB- camada parabasal CI- camada intermediária CS- camada superficial

Gráfico 3. Distribuição das células positivas para LC3-II de acordo com a camada epitelial e com a evolução das lesões.

Foram analisadas 120 amostras tumorais de carcinoma espinocelular bucal, entre as amostras predominou o gênero masculino (70,8%) e a média de idade dos pacientes que constituíam a amostra foi de 67,3 anos de idade e a maioria das lesões estavam localizadas na língua e assoalho da boca, sendo que predominavam as lesões de grau 2. A maioria dos pacientes foi submetido à radioterapia associada à remoção cirúrgica da lesão (Tabela 4).

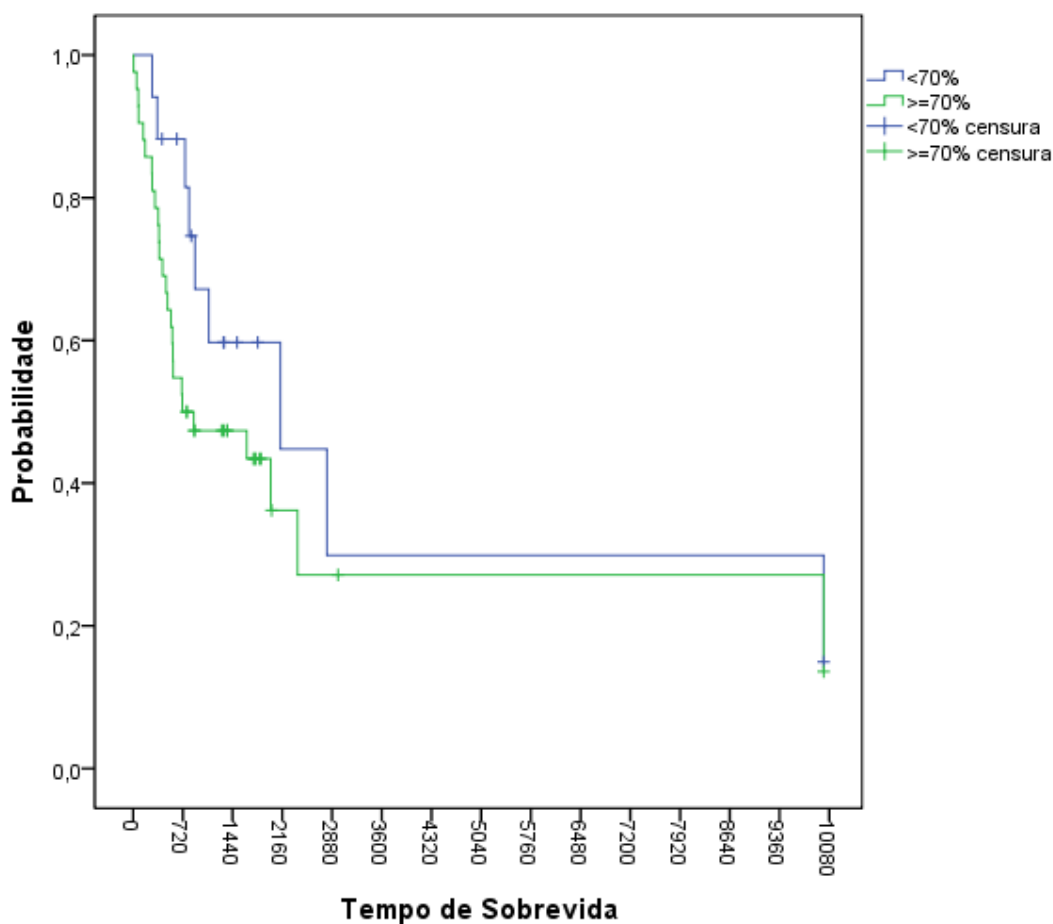
Tabela 4. Características Clínico-patológicas da amostra de carcinomas espinocelulares bucais.

| | Características | N | % |
|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------|------|
| Sexo | Masculino | 85 | 70,8 |
| | Feminino | 35 | 29.2 |
| Idade | Média (±DP) | 67.3 ± 11.0 | |
| | Variação | 31-92 | |
| Local da lesão | Língua | 59 | 49.2 |
| | Assoalho da boca | 14 | 11,7 |
| | Trígono e Gengiva | 17 | 14.1 |
| | Outros | 30 | 25 |
| Tratamento Adjuvante | Radioterapia | 43 | 35.8 |
| | Quimioterapia | 2 | 1.66 |
| | Radioterapia + Quimioterapia | 27 | 22.5 |
| | Nenhum | 15 | 12.5 |
| | NI | 33 | 27,5 |
| Grau de Diferenciação | Bem diferenciado - Grau 1 | 23 | 19.2 |
| | Moderadamente diferenciado – Grau 2 | 61 | 50.8 |
| | Pobrememente diferenciado – Grau 3 | 29 | 24.2 |
| | NI | 7 | 5,8 |
| Dimensão Tumor | Média (±DP) | 2.73 ± 1.26 cm | |
| | Variação | 03-6.0 cm | |
| Profundidade de Invasão | Média (±DP) | 11.17 ± 4.73 mm | |
| | Variação | 0.9-24mm | |

Observamos mais células positivas para LC3-II em tumores de Grau , T3 e T4, com metástase regional, com maior profundidade de invasão e nos pacientes que foram a óbito pelo tumor. No entanto, não encontramos associações estatisticamente significativas (Tabela 5). Para avaliar a associação entre LC3-II com a sobrevida dos pacientes, realizamos uma curva de sobrevivência de Kaplan-Meier, dividindo a amostra em $\geq 70\%$ de células positivas para LC3-II e com $< 70\%$ de células positivas para LC3-II. Observamos maior sobrevida para os pacientes com menor percentual de células positivas, porém este dado não é estatisticamente significativo ($p=0.21$) (Gráfico 4).

Tabela 5. Análise da imunomarcção de LC3-II de acordo com as variáveis clínicas e histológicas das lesões de carcinoma espinocelular bucal.

| | % Imunomarcção LC3-II | | |
|-------------------------|-----------------------|--------|----------|
| | Média | DP | <i>p</i> |
| Diferenciação | | | |
| Grau 1 | 79.81 | ±14.78 | |
| Grau 2 | 78.83 | ±12.84 | |
| Grau 3 | 80.76 | ±11.94 | 0.9280 |
| Tamanho do tumor | | | |
| T1+T2 | 79.67 | ±14.54 | |
| T3+T4 | 81.72 | ±10.43 | 0.4544 |
| Metástase regional | | | |
| N0 | 79.84 | ±13.54 | |
| N1 | 81.02 | ±12.96 | 0.6568 |
| Evolução do paciente | | | |
| Vivo | 80.52 | 13.50 | |
| Morto pelo tumor | 82.74 | 12.12 | 0.4587 |
| Profundidade de invasão | | | |
| Até 10mm | 79.58 | 14.38 | |
| >10mm | 81.14 | 12.28 | 0.5615 |

Gráfico 4. Análise de sobrevida Kaplan-Meier.

DISCUSSÃO

A autofagia é um processo catabólico que consiste na degradação e reciclagem dos componentes celulares e assim mantém a homeostasia celular. Diante disso, nosso estudo buscou avaliar os níveis de autofagia celular em amostras teciduais de carcinomas espinocelulares e leucoplasias através da técnica de imunistoquímica e correlacionar com os parâmetros clínico-patológicos e a evolução das lesões. Para este fim, já foi demonstrado que o LC3-II é um marcador de autofagossomos sensível para verificar autofagia em humanos¹⁴. Observamos que o percentual de células positivas para o marcador

LC3-II aumentou da mucosa bucal normal para as lesões leucoplásicas e atingiu as maiores médias nos carcinomas espinocelulares bucais.

Na mucosa bucal normal, as células que apresentam autofagia se concentram na camada basal, parabasal e intermediária. Já nas leucoplasias, observamos grande número de células positivas para autofagia também na camada superficial do epitélio. Além disso, maior número de células realizando autofagia foi observado em amostras displásicas e com pior evolução. Apesar do papel dual da autofagia, nas lesões de leucoplasia o aumento dos níveis autofágicos parece sinalizar o processo de transformação maligna. Não há estudos prévios sobre a detecção de autofagia em leucoplasias para estabelecermos comparações. Entretanto, o estudo realizado por LI e colaboradores, os quais avaliaram o processo autofágico em lesões de fibrose submucosa bucal, também observaram o aumento da expressão de LC3-II nas lesões potencialmente malignas de fibrose submucosa oral, tanto por imunohistoquímica quanto por PCR em tempo real em comparação com amostras de controles¹⁵.

Um possível mecanismo que explique o aumento de autofagia em displasias epiteliais e em leucoplasias de pior evolução é que nessas lesões usualmente ocorre um aumento da atividade proliferativa¹⁶. O aumento da proliferação no tecido pode resultar no surgimento de áreas de hipóxia e com poucos nutrientes, consequentemente ativando o processo autofágico^{17,18}.

Nas lesões malignas, o percentual de células positivas para LC3-II aumenta significativamente, atingindo altas proporções (média 80,46%). Essa observação sugere que a autofagia é altamente ativada no carcinoma espinocelular bucal. No

entanto, a técnica não foi sensível para detectar diferenças entre as lesões de acordo com parâmetros clínicos e com o comportamento tumoral.

Na literatura encontramos resultados opostos ao nosso estudo, os quais relatam que pacientes portadores de carcinoma espinocelular bucal com expressão elevada do marcador LC3-II, apresentavam baixa taxa de sobrevida^{19,20}. O mesmo também foi encontrado em outro tipo de neoplasia como o câncer de pâncreas²¹. No entanto, a associação entre autofagia e prognóstico no câncer parece variar para tumores de diferentes origens. Em câncer de ovário e de hipofaringe, foi observado que maior o percentual de células LC3-II I positivas estava associado a tumores de melhor prognóstico^{22,23}.

Os resultados observados na literatura podem ser divergentes em relação aos nossos achados devido ao fato de que em nosso estudo utilizamos amostras teciduais em formato de TMA, onde apenas uma pequena área do tumor é analisada. Outro fator que pode ter contribuído para nossos achados não serem semelhantes aos demais estudos é a diversidade de clones de anticorpos e diferentes protocolos de imunistoquímica, não existe na literatura padronização para a investigação de LC3-II em amostras teciduais.

Além do marcador LC3-II, existem outros marcadores de autofagia, também investigados em diferentes neoplasias. Em carcinomas de ovário e hipofaringe, além de LC3-II, baixos níveis de Beclin-I estavam associados a pior sobrevida²². Porém, a interpretação imunistoquímica do Beclin-1 é complexa, visto que essa proteína pode atuar na progressão do processo autofágico²⁴. Outro marcador utilizado para autofagia é o P62. Em estudos realizados com carcinomas espinocelulares bucais, pode-se constatar que o aumento da expressão da

proteína P62 citoplasmática está associado ao pior prognóstico da doença^{25,20}.

É importante ressaltar que a amostra selecionada para este estudo reflete as principais características apontadas em estudos epidemiológicos dessas patologias. Tanto em relação às amostras de leucoplasias quanto de carcinomas espinocelulares bucais, as características sócio-demográficas, de localização anatômica e de exposição a carcinógenos estão de acordo com a literatura prévia como sendo as características mais prevalentes nessas populações^{26,27,28,20}. Uma exceção é o fato de encontrarmos maior número de lesões leucoplásicas não-homogêneas, acreditamos que isso se deva a um viés em relação ao preenchimento das fichas de biópsias dos pacientes, visto que essa era uma informação faltante em grande parte dos casos e, possivelmente, os clínicos tenham maior atenção ao preencher essa informação nos casos não-homogêneos por considerarem essas lesões mais graves.

CONCLUSÃO

De acordo com a amostra estudada, podemos concluir que o processo autofágico encontra-se aumentado em leucoplasias e em carcinomas espinocelulares bucais em relação à mucosa bucal normal. O aumento dos níveis de autofagia está associado com o aumento da severidade das alterações epiteliais e com pior comportamento das leucoplasias bucais. Dessa forma, a detecção de autofagia por meio da análise imunistoquímica de LC3-II pode auxiliar no diagnóstico e predição do comportamento clínico dessas lesões.

REFERÊNCIAS

1) YU, C. C. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *Journal of Oncology* 2011.

2) SIEGEL, R. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 212-236.

3) TACHEZY, R; KLOZAR, J; RUBENSTEIN, L; SMITH, E; SALÁKOVÁ, M; SMAHELOVÁ, J. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* 2009; 5: 878-887.

4) VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification, and present concepts of management. *Oral Oncol* 2009; 45: 317–323.

5) FELLER L, LEMMER J. Oral leukoplakia as it relates to HPV infection: a review. *Int J Dent* 2012; 540-561.

6) LIMA, J, S. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non smokers. *Oral Pathol* 2012; 26: 543-549.

7) HOLMSTRUP, P. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol* 2006; 42: 461-474.

8) YANG, Z. J. et al. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1533–1541.

9) YANG, Z; KLIONSKY, D,J. Eaten Alive: A History Of Macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 2010; 12: 814-822.

10) VAN LIMBERGEN J. et al. Autophagy: from basic science to clinical application. *Mucosal Immunology* 2009; 2: 315-330.

11) HIPPERT, M. M.; O'TOOLE, P. S.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Research* 2006; 66: 9349-9351.

12) CUI, J.; GONG, Z.; SHEN, H. The role of autophagy in liver cancer: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1836: 15-26.

13) ZHI, X; ZHONG, Q. Autophagy in cancer. *F1000Prime Reports* 2015; 7: 18.

14) CHANG, S,J; OU-YANG, F; TU, H,P et al. Decreased expression of autophagy protein LC3 and stemness (CD44+/CD24-/low) indicate poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Human Pathology* 2016; 48: 48–55.

15) LI, J; ZHAO, T,T; ZHANG, P et al. Autophagy mediates oral submucous fibrosis. *Exp Ther Med* 2016; 5: 1859-1864.

16) THOMSON, P,J; SOAMES, J,V; BOOTH, C; O'SHEA, J,A. Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression. *Cell Prolif* 2002; 35: 110–120.

17) TILAKARATNE, W,M; IQBAL, Z; THE, M,T et al. Upregulation of HIF-1alpha in malignant transformation of oral submucous fibrosis. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 372-377.

18) ZHANG, H; BOSCH-MARCE, M; SHIMODA, LA et al. Mitochondrial

autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem* 2008; 283: 10892-10903.

19) TANG, J. Y. High LC3 expression correlates with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Human Pathology* 2013; 44: 2558–2562.

20) LIU, L,J; CHEN, F,F; LUNG, J; LO, H,C; LEE, H,F; LU, C,Y; HUNG, H,C. Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2014; 26: 944-954.

21) FUJII, S; MITSUNAGA, S; YAMAZAKI, M. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* 2008; 99: 1813-1819.

22) WANG, J; PAN, X; DING, L; LIU, D; LEI, D; JIN, T. Aberrant Expression of Beclin-1 and LC3 Correlates with Poor Prognosis of Human Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Plos One* 2013; 7: e69038.

23) VALENTE, G; MORANI, F; NICOTRA, G. et al. Expression and Clinical Significance of the Autophagy Proteins BECLIN 1 and LC3 in Ovarian Cancer. *Biomed Res Int* 2014; 462658.

24) CIECHOMSKA, I,A; GOEMANS, G,C; SKEPPER, J,N; TOLKOVSKY, A,M. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function. *Oncogene* 2009; 28: 2128–2141.

25) INUI, T; CHANO, T; TAKIKITA-SUZUKI, M; NISHIKAWA, M; YAMAMOTO, G; OKABE H. Association of p62/SQSTM1 excess and oral carcinogenesis. *Plos One* 2013; 8: e74398.

26) MCDOWELL, D,J. An Overview of Epidemiology and Common Risk Factors for Oral Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngol Clin N Am* 2006; 39: 277–294.

27) WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45: 309–316.

28) CASATI, M, F, M. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço* 2012; 41: 186-191.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A autofagia tem por função degradar os componentes celulares danificados da própria célula, atuando como uma “via” de reciclagem celular. Sabe-se que a autofagia em neoplasias apresenta uma dupla função, podendo atuar tanto como um mecanismo que favorece a sobrevivência das células nas condições adversas do ambiente celular, como também pode atuar como um mecanismo supressor de tumor (ZHI; ZHONG, 2015; HIPPERT; O'TOOLE; THORBURN, 2006). A autofagia atua eliminando organelas e proteínas celulares, ou degradando agentes tóxicos e citotóxicos o que pode inibir a transformação maligna celular (MIZUSHIMA et al.,2011).

Nosso estudo verificou que o processo autofágico encontra-se aumentado em carcinomas espinocelulares bucais e em lesões potencialmente malignas. Uma provável explicação para o aumento de autofagia na carcinogênese deve-se ao aumento da atividade proliferativa. O aumento crescente do número de células epiteliais pode resultar em áreas de hipóxia e pouco nutrientes, favorecendo assim a ocorrência do processo autofágico (THOMSON et al.,2002). Do mesmo modo, em carcinomas espinocelulares o processo autofágico se intensifica devido ao estresse ocasionado por interações celulares no microrambiente tumoral (ALTMAN; RATHMELL, 2009).

Entretanto, durante a realização desse estudo nos deparamos com algumas limitações as quais podem ser responsáveis por alguns resultados diferentes ao que a literatura relata. Dentre eles podemos destacar o uso do imunomarcador LC3-II, o qual pode ser utilizado em diferentes concentrações e existem diferentes

clones disponíveis. Além disso, o formato de TMA como os carcinomas espinocelulares foram utilizados também dificultou a comparação com outros estudos. Com a técnica de microarranjos teciduais, apenas uma pequena área do tumor é analisada, o que facilita a realização do estudo e diminui o custo com reagentes, porém a área que é avaliada pode não ser suficiente para detectarmos diferenças na imunomarcação do LC3-II entre os tumores analisados.

Sendo assim, podemos concluir através desse estudo que o uso do marcador autofágico LC3-II   útil para auxiliar a detectar o comportamento das lesões potencialmente malignas. Por outro lado, em carcinomas espinocelulares este não é considerado um bom biomarcador, visto que em todas as lesões a maior parte das células era positiva.

Novos estudos são necessários para comprovar que a autofagia pode ser um biomarcador de prognóstico em leucoplasias bucais, de preferência utilizando estudos prospectivos longitudinais de longo tempo, onde o desfecho principal é a transforma o maligna. Além disso, estudos em modelos animais de carcinogênese induzida com inibidores de autofagia podem comprovar a relevância da autofagia no processo de transforma o maligna. Inibir a via autofágica durante o processo de carcinogênese pode apresentar potencial terapêutico e quimiopreventivo.

Referências

MIZUSHIMA, N; KOMATSU, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**. v. 4, p.728-741, 2011.

THOMSON, P,J; SOAMES, J,V; BOOTH, C; O'SHEA, J,A. Epithelial cell proliferative activity and oral cancer progression. **Cell Prolif**. v. 35, p.110–120, 2002.

ALTMAN, B. J.; RATHMELL, J. C. Autophagy: Not good OR bad, but good AND bad. **Autophagy**, v. 5, p. 569–570, 2009.

HIPPERT, M. M.; O'TOOLE, P. S.; THORBURN, A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9349-9351, 2006.

ZHI, X; ZHONG, Q. Autophagy in cancer. **F1000Prime Reports**. v. 7, p. 18, 2015.