

ISADORA PEREIRA GOMES

**AVALIAÇÃO MOLECULAR E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE
MALFORMAÇÕES LINFÁTICAS ORAIS**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2021**

Isadora Pereira Gomes

AVALIAÇÃO MOLECULAR E IMUNO-HISTOQUÍMICA DE MALFORMAÇÕES LINFÁTICAS ORAIS

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal

Orientador: Prof.(a): Dra. Carolina Cavaliere Gomes

Belo Horizonte
2021

Ficha Catalográfica

G633a Gomes, Isadora Pereira.
2021 Avaliação molecular e imuno-histoquímica de malformações
T linfáticas orais / Isadora Pereira Gomes. -- 2021.
76 f. : il.
Orientadora: Carolina Cavalieri Gomes.
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.
1. Linfangioma. 2. Imuno-histoquímica. 3. Transdução de sinal. I. Gomes, Carolina Cavalieri. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



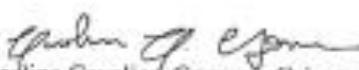
FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação molecular e imuno-histoquímica de malformações linfáticas orais

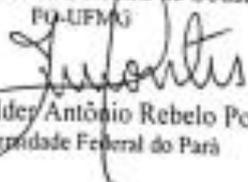
ISADORA PEREIRA GOMES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Patologia Bucal.

Aprovada em 22 de julho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

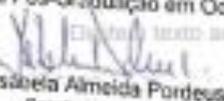

Prof(a). Carlina Cavaliari Gomes – Orientadora
FO-UFMG


Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa
FO-UFMG


Prof(a). Hélder Antônio Rebelo Pontes
Universidade Federal do Pará

Belo Horizonte, 22 de julho de 2021.

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 26/07/2021.


Profa. Isabela Almeida Porteus
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais, Lina e Ricardo, e ao meu irmão Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre iluminar os meus caminhos e por mostrar que me ama assim como eu o amo.

Agradeço aos meus pais, Lina e Ricardo, e ao meu irmão, Gabriel, por todo o apoio, suporte e encorajamento na minha trajetória acadêmica. Amo vocês e sem vocês nada disso seria possível. E também, a minha madrinha, Tânia, minha maior entusiasta.

A professora Carolina Cavalieri Gomes que, para além de uma orientadora, é uma mãe científica, com todo o seu zelo, carinho, incentivo e oportunidades. Vamos indo sempre em frente e juntas.

Agradeço a professora Manoela Martins e sua equipe da UFRGS pelo auxílio com as reações de imuno-histoquímica para pATK1, diante do cenário da pandemia COVID-19.

Aos demais professores da área de Estomatologia e Patologia Bucal da FAO-UFG, em especial ao professor Ricardo Santiago Gomez, meu agradecimento por todo o conhecimento compartilhado e por instigar a curiosidade científica e a busca incansável ao conhecimento.

Agradeço às companheiras de laboratório que me ajudaram de perto na construção desse estudo, Letícia, Thaís e Núbia, por toda a paciência e ajuda. Agradeço também aos demais amigos de laboratório de Biologia Molecular pela boa convivência.

Por tornarem a caminhada tão leve e especial, agradeço ao Victor e a Taynara, meus irmãos acadêmicos. E junto a eles, os colegas do mestrado, Gabi, Dani, Flavinha, Eustáquio e Carol, por dividirem todos os momentos bons e ruins desses últimos anos mesmo que por vídeos-chamadas e conversas na internet.

Por me acompanharem desde a graduação e por embarcarem na pós-graduação junto a mim eu agradeço as minhas amigas, Lorrany, Aninha e Luiza. Obrigada por sempre me lembrarem que o nosso propósito é maior que qualquer coisa e por me fazerem ficar tranquila quanto aos prazos e responsabilidades.

Agradeço a todos aqueles que se fizeram presentes e me ajudaram de todas as formas durante esse período, em especial João, Lu, Luna, Sâmila e Aline.

Gostaria de agradecer a Mara, Domênico e Dani, do laboratório de anatomia patológica da FAO-UFMG por sempre serem tão prestativos e por ajudarem em diversas fases da execução deste projeto.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro concedido através da minha bolsa de pesquisa e também às instituições financiadoras Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por seguirem valorizando a ciência mesmo em tempos sombrios.

“Pensava que quando se sonha tão grande a realidade aprende.”

Valter Hugo Mãe

RESUMO

As malformações linfáticas são distúrbios do desenvolvimento caracterizados pelo crescimento excessivo de vasos linfáticos. Essa condição acontece principalmente em região de cabeça e pescoço devido à presença fisiológica de grande concentração de vasos linfáticos na região. As malformações linfáticas podem ocorrer de maneira isolada ou associadas a síndromes como de CLOVES e Klippel-Trènaunay. A presença de mutações no gene *PIK3CA* e a ativação das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK pode ocorrer tanto nas malformações linfáticas esporádicas, como naquelas associadas a síndromes. As mutações em *PIK3CA* ocorrem nos éxons 10 e 20, sendo as mutações no códon 1047 (éxon 20) as mais frequente nas malformações linfáticas esporádicas. No entanto, em malformações linfáticas orais não se sabe se estes fenômenos ocorrem. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de mutações no códon 1047 do gene *PIK3CA* e avaliar a ativação das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK em amostras de malformações linfáticas orais. Uma amostra de conveniência de 14 tecidos de malformações linfáticas orais fixados em formol e embebidos em parafina foram submetidas a reações de imuno-histoquímica para as formas fosforiladas de AKT1 (pAKT-Ser473) e ERK1/2 (pERK1/2-Thr202/Tyr204), marcadores de ativação das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK, respectivamente. Quatro destas amostras foram submetidas a Sequenciamento de Sanger para o códon 1047 do gene *PIK3CA*. Foram observados padrões de marcação positivas para pAKT1 e pERK1/2 nas células endoteliais de todas as amostras de malformações linfáticas orais avaliadas. Todas as amostras submetidas ao Sequenciamento de Sanger apresentaram sequência selvagem para a região de interesse. Com os resultados obtidos sugere-se que as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK estão envolvidas na patogênese das malformações linfáticas orais.

Palavras-chave: Linfangioma. Imuno-histoquímica. Vias de sinalização. Proteínas de sinalização intracelular.

ABSTRACT

Molecular and immunohistochemistry evaluation of oral lymphatic malformations

Lymphatic malformations are developmental disorders characterized by excessive growth of lymphatic vessels. This condition occurs mainly in the head and neck region due to the physiological presence of high concentration of lymphatic vessels in the region. Lymphatic malformations may occur in isolation or associated with syndromes such as CLOVES and Klippel-Trènaunay. Mutations in the *PIK3CA* gene and activation of the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways may occur both in sporadic lymphatic malformations and in those associated with syndromes. Mutations in hotspot 1047 are the most frequently found in isolated lymphatic malformation. However, in oral lymphatic malformations it is not known whether these mutations occur. The aim of this study was to evaluate the presence of mutations in codon 1047 of the *PIK3CA* gene and to evaluate the activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways in samples of oral lymphatic malformations. A convenience sample of 14 tissues of oral lymphatic malformations formalin fixed paraffin embedded were submitted to immunohistochemistry reactions to the phosphorylated forms of AKT1 (pAKT-Ser473) and ERK1/2 (pERK1/2-Thr202/Tyr204), activation markers of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways, respectively. Four of these samples were submitted to Sanger Sequencing for codon 1047 of the *PIK3CA* gene. Positive marking patterns for pAKT1 and pERK1/2 were observed in the endothelial cells of all samples of oral lymphatic malformations evaluated. All samples submitted to Sanger Sequencing were wild type for the region of interest. With the results obtained it is suggested that the PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways are involved in the pathogenesis of oral lymphatic malformations.

Keywords: Lymphangioma. Immunohistochemistry. Signaling pathway. Intracellular signaling proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sistema de drenagem linfática em cavidade oral.....	20
Figura 2- Representação esquemática da localização anatômica das cadeias linfonoidais em região de cabeça e pescoço.....	21
Figura 3- Apresentação clínica típica de malformações linfáticas orais.....	23
Figura 4- Aspectos microscópicos das malformações linfáticas orais.....	24
Figura 5- Esquema da ativação da via PI3K/AKT.....	26
Figura 6- Esquema de ativação da via MAPK/ERK.....	30
Figura 7- <i>Cross-talk</i> entre as vias de sinalização intracelular PI3K/AKT e MAPK/ERK.....	32
Figura 8- Fluxograma metodológico do estudo.....	34
Figura 9- Características histológicas das malformações linfáticas orais.....	41
Figura 10- Captura de tela dos cromatogramas demonstrando o códon 1047 do gene <i>PIK3CA</i> por sequenciamento de Sanger das quatro amostras de malformações linfáticas orais.....	41
Figura 11- Imuno-expressão para proteínas pAKT1 e pERK1/2 em malformações linfáticas orais.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Mutações no gene <i>PIK3CA</i> identificadas em estudos prévios de malformações linfáticas	28
Tabela 2- Iniciadores utilizados para a detecção das mutações na região de interesse no gene <i>PIK3CA</i>	36
Tabela 3- Características clínicas das 14 amostras de malformações linfáticas orais incluídas no estudo.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AKT1	<i>AKT Serine/threonine kinase 1</i>
BAD	<i>Bcl2-associated agonist death promoter</i>
C.C.G.	Carolina Cavalieri Gomes
CLOVES	<i>Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular Malformations, Epidermal Nevis, Spinal/Skeletal Anomalies/Scoliosis</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK 1/2	<i>Extracellular signal regulated kinase 1 and Extracellular signal regulated kinase 2</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FFPE	<i>Formalin fixed paraffin embedded</i>
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
FOXO	<i>Forkhead/winged Helix box gene, group O</i>
GAB	<i>GRB2-associated binder</i>
GLA	<i>Generalized Lymphatic Anomaly</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
gDNA	DNA genômico
°C	Grau Celsius
H&E	Hematoxilina e Eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
I.P.G.	Isadora Pereira Gomes
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
KTS	Síndrome de Klippel-Trènaunay
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
ml	Mililitro
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

ng	Nanograma
Pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PROS	<i>PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum</i>
RAS	<i>GTPase Ras</i>
R.S.G.	Ricardo Santiago Gomez
RSK	<i>Ribosomal S6 kinase</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Sistema linfático na região de cabeça e pescoço.....	18
2.2 Malformações linfáticas	21
2.3 Via de sinalização celular PI3K/AKT	25
2.4 Via de sinalização intracelular MAPK/ERK.....	29
2.5 Meios de compensação entre as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK	31
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivo específico	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Aspectos éticos	34
4.2 Delineamento do estudo.....	34
4.3 Amostras	35
4.4 Extração do DNA.....	35
4.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)	36
4.6 Sequenciamento de Sanger	37
4.7 Imuno-histoquímica	38
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Dados clínico-patológicos.....	40
5.2 Sequenciamento de Sanger	41
5.3 Imuno-histoquímica	42

6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48
ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação pelo COEP	57
ANEXO B – Artigo submetido para publicação no periódico <i>Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology</i>	61

1 INTRODUÇÃO

O sistema linfático apresenta papel fundamental na manutenção da homeostase tecidual e na imunidade (BARRET, 2006). Durante a formação embrionária, o sistema linfático se desenvolve próximo a quinta semana de gestação e se forma em grande proximidade ao sistema vascular venoso (SABIN, 1992). Quando ocorre um defeito no desenvolvimento de uma parte dos vasos linfáticos, ocorre a formação das malformações linfáticas, lesões em que há proliferação de vasos linfáticos que não se comunicam de forma adequada ao restante do sistema (PERKINS, 2018).

Sendo assim, as malformações linfáticas são anomalias de desenvolvimento, originárias de sequestros de tecido que apresentam falha na drenagem linfática (ELLURU, 2014). Cerca de 50 a 75% dos casos de malformações linfáticas acontecem em região de cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral, pela alta concentração de vasos linfáticos nesta região. Aproximadamente metade dessas lesões são notadas ao nascimento, enquanto 90% das lesões se desenvolvem até os 2 anos de idade e sem predileção por sexo (HOCHMAN, 2011; PERKINS, 2010). Clinicamente, as malformações linfáticas orais se manifestam principalmente como uma placa composta de diversas vesículas de conteúdo claro, com aparência que lembram ovos de sapos. Essas lesões em sua maioria ocorrem em dorso de língua, mas também podem acometer os lábios, a mucosa jugal, o palato duro, palato mole e o assoalho bucal (KOLAY, 2017).

Essas malformações podem ocorrer tanto de forma esporádica, e serem lesões isoladas, podem se apresentar como lesões múltiplas na anomalia linfática generalizada (GLA) ou ainda podem ser componente de algumas síndromes como a síndrome de Proteus (OMIM #176920), síndrome de Klippel-Trènaunay (KTS; OMIM #149000), síndrome de crescimento lipomatoso excessivo congênito, malformações vasculares e nevos epidérmicos (CLOVES; OMIM #612918) e síndrome da malformação linfática do lábio inferior, malformação linfática de cabeça e pescoço, assimetria da face e membros e crescimento excessivo parcial ou generalizado (CLAPO; OMIM #613089) (KUREK, 2012; LIU, 2010; NATHAN, 2017; RODRIGUEZ-LAGUNA, 2018).

As vias PI3K/AKT e MAPK/ERK são as principais vias de sinalização intracelular e regulam a sobrevivência celular, proliferação, crescimento tumoral e angiogênese. Receptores de membrana celular iniciam o processo de sinalização que acontece a partir de quinases e outras proteínas citoplasmáticas que culminam no controle de expressão gênica no núcleo celular. Essas duas vias são vias compensatórias e existem diversos fatores de *cross-talk* em diferentes níveis da cascata de sinalização (ERSAHIN, 2015; LAVOIE, 2020; VANHAESEBROECK, 2012). A ativação das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK é observada em malformações linfáticas esporádicas e também associadas a síndromes (BOSCOLO, 2015; GLASER, 2018; KIM, 2019; OSBORN, 2015).

Mutações ativadoras no gene *PIK3CA* foram recentemente relatadas em casos de malformações linfáticas isoladas, associadas à síndrome de CLOVES (OMIM #612918) e Trippel-Trénaunay (OMIM #1490000). Essas mutações levam às substituições p.Cys420Arg, p.Glu542Lys, p.Gln545Lys, p.His1047Arg ou p.His1047Leu. As mutações no códon 1047 estavam presentes em 47% das malformações linfáticas isoladas avaliadas por Luks e colaboradores em 2015, sendo assim, o códon mais frequentemente mutado nas amostras (LUKS, 2015). O gene *PIK3CA* codifica a subunidade p100 α da enzima PI3K, a qual é relacionada a diversas atividades celulares como crescimento celular e controle de apoptose (GRAUPERA, 2008, ZHAO, 2010). As síndromes que apresentam as mutações no gene *PIK3CA* são agrupadas na sigla PROS (*PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum*) (KEPPLER-NOREUIL, 2015).

Considerando os achados moleculares recentemente reportados em malformações linfáticas esporádicas e associadas a síndromes, o presente estudo teve o objetivo de investigar a presença de mutações no gene *PIK3CA* em amostras de malformações linfáticas esporádicas orais. Sabendo-se também que as vias de sinalização intracelulares PI3K/AKT e MAPK/ERK estão associadas à angiogênese e linfangiogênese e se encontram frequentemente ativadas em amostras de malformações linfáticas esporádicas e associadas a síndromes, objetivou-se também avaliar a imuno-expressão da proteína AKT1 fosforilada (pAKT1) e ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) nas amostras de malformações linfáticas orais. A relevância do tema está principalmente relacionada ao melhor entendimento da patogênese molecular dessa

lesão abrindo caminhos para estudos com terapias alvo para o tratamento de lesões refratárias aos tratamentos atualmente adotados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sistema linfático na região de cabeça e pescoço

O sistema linfático desempenha um importante papel na manutenção da homeostase tecidual e na resposta imunológica frente à inflamação e propagação metastática tumoral. É um sistema complexo composto por vasos linfáticos, linfonodos e órgãos linfoides, tais como medula óssea, tonsilas, baço e timo (BARRET, 2006). Durante o desenvolvimento embrionário, o sistema linfático é derivado de fendas mesenquimais, formadas depois da quinta semana de gestação, com o desenvolvimento dos vasos linfáticos em grande proximidade com as veias (SABIN, 1909; SEMO, 2016).

A rede vascular linfática é um sistema fechado de fluxo unidirecional de baixa pressão que está presente em quase todos os órgãos do corpo. Alguns tecidos avasculares como epiderme, cartilagem e córnea e alguns órgãos vascularizados como cérebro, polpa dentária e retina não apresentam vasos linfáticos (BARRET, 2006; BERGGREN, 2014; PETROVA, 2020). Os vasos linfáticos servem como um sistema de drenagem para o excesso de fluido intersticial proveniente dos filtrados de capilares sanguíneos, moléculas hidrofílicas de qualquer tamanho, células, vírus e bactérias (BARRET, 2006; PETROVA, 2020). Estes materiais coletados formam a chamada linfa, que é transportada para os linfonodos de drenagem antes de retornar à circulação venosa (LIAO, 2013). Os vasos linfáticos permitem a drenagem de cerca de 10% de todo o fluido intersticial, enquanto os 90% restantes são reabsorvidos pelo sistema venoso (CLEMENT, 2004).

A rede linfática superficial é composta por vasos linfáticos chamados iniciais que drenam a linfa para a rede linfática profunda, composta por vasos pré-coletores e coletores que transportam a linfa até a cadeia de linfonodos mais próxima (WERNER, 2003). É pelos vasos linfáticos iniciais que ocorre a passagem dos componentes dos tecidos circundantes ao interior da rede vascular linfática através de pressão oncótica e hidrostática (ZAWIEJA, 2005). Os vasos linfáticos iniciais são capilares avalvulares que apresentam lúmen vascular largo (entre 30 e 50 μm de diâmetro), quando comparados a capilares sanguíneos circundantes (entre 5 e 10 μm de diâmetro) e podem aumentar sua capacidade e expandir para um diâmetro de até 100 μm . Os

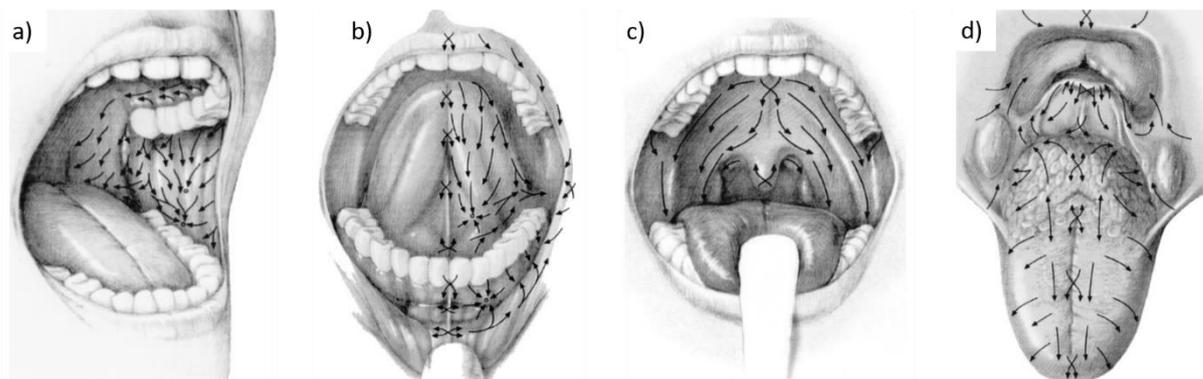
vasos linfáticos iniciais são firmemente aderidos ao tecido circundante ancorados por filamentos, permitindo o deslocamento à medida que o espaço intersticial se expande. As paredes consistem em uma camada única de células endoteliais que podem ser organizadas sem contato ou podem ser conectadas por meio de junções inter-epiteliais que funcionam como válvulas de admissão e drenagem. Uma rede de fibra elástica normalmente circunda esses capilares e, como não há pericitos ao redor dos vasos linfáticos, essa rede desempenha um papel fundamental na transmissão de forças que regulam o transporte de fluidos e migração celular para dentro e fora dos vasos linfáticos (WERNER, 2003; ZAWIEJA, 2005).

Os vasos linfáticos iniciais drenam a linfa para os vasos pré-coletores que apresentam permeabilidade diminuída pela presença de células musculares lisas e válvulas intraluminais (PETROVA, 2020). Essas válvulas linfáticas intraluminais mantêm o fluxo linfático em uma única direção, impedindo que haja retorno de fluxo para a periferia. Em condições fisiológicas, forças passivas atuam sobre a drenagem como a pressão externa, movimento muscular esquelético circundante e a gravidade. Quando necessário um mecanismo ativo é acionado sob controle adrenérgico, colinérgico e peptinérgico através de contrações autônomas de vasos linfáticos (LIAO, 2013; ZAWIEJA, 2005). Macrófagos e células dendríticas que estão também em associação à vasculatura linfática fornecem fatores que regulam a proliferação endotelial linfática e sua permeabilidade (PETROVA, 2020)

Por meio dos vasos linfáticos coletores a linfa é então levada ao linfonodo. Os vários linfonodos da cadeia filtram a linfa, removendo materiais estranhos como bactérias e células cancerosas. Células dendríticas dentro do linfonodo participam da apresentação de antígenos e desencadeiam uma resposta imune com células B (BARRETT, 2006). A linfa é transportada pelos vasos linfáticos até os linfonodos e devolvida à circulação sanguínea através da conexão de grandes ductos linfáticos com veias (PETROVA, 2020).

Em cavidade oral é possível observar um complexo sistema de drenagem linfática, como ilustrado na Figura 1. A linfa originada na região de dorso de língua e gengiva mandibular é drenada para os linfonodos no espaço submandibular. A região anterior do assoalho bucal drena aos linfonodos submentuais e a região posterior do assoalho bucal em direção à orofaringe. O sistema linfático da mucosa jugal drena principalmente para o espaço submandibular. (WERNER 2003).

Figura 1. Sistema de drenagem linfática em cavidade oral.



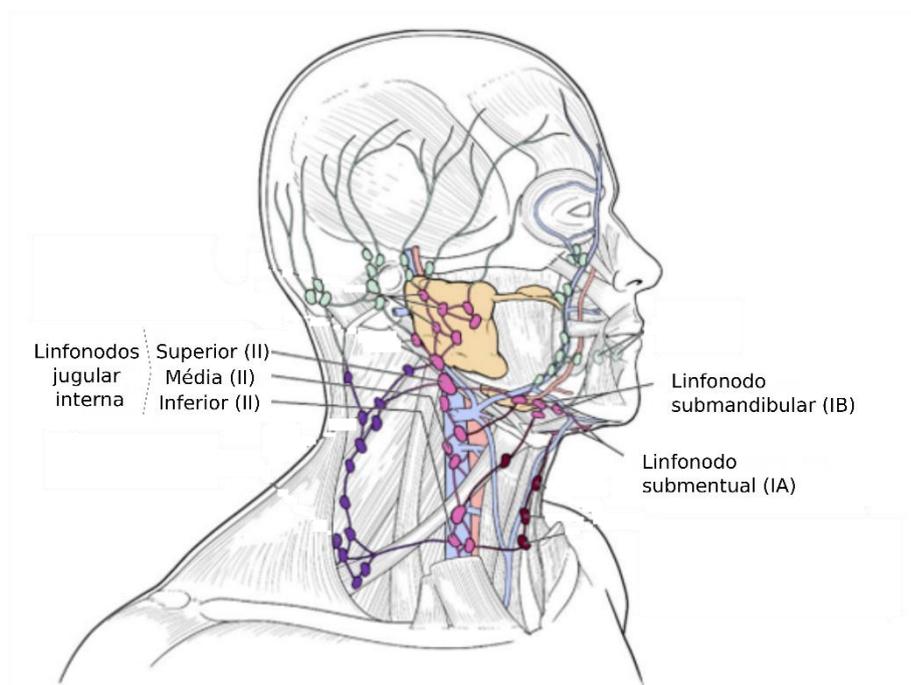
Legenda: As setas indicam a direção de drenagem e os pontos “o” indicam a direção de drenagem em profundidade.

- a) Direção de drenagem linfática em mucosa jugal e gengiva em maxila.
- b) Direção de drenagem linfática em ventre de língua, mucosa labial e assoalho bucal.
- c) Direção de drenagem linfática em palato duro, palato mole e úvula.
- d) Direção da drenagem linfática em dorso de língua.

Fonte: WERNER, 2003, p. 324-325.

A língua contém redes linfáticas particularmente densas, o plexo superficial aumenta a densidade à medida que se move do ápice em direção ao ventre lingual, já na rede profunda observa-se um aumento significativo no número e no diâmetro dos vasos pré-coletores. A densidade desses vasos linfáticos iniciais é maior na mucosa do que na camada muscular, por outro lado, o número de vasos pré-coletores e coletores aumenta na transição entre submucosa e camada muscular. A drenagem na língua ocorre, em grande parte, juntamente com a linfa do assoalho bucal em direção a região submandibular e o restante flui para os linfonodos jugulares superiores ou submandibulares. A drenagem linfática da porção anterior da cavidade oral é direcionada principalmente para os linfonodos cervicais do nível I, enquanto a drenagem da língua e assoalho posterior é direcionada para linfonodos no nível II (WERNER 2003). A Figura 2 traz uma representação esquemática da localização das cadeias de linfonodos da região de cabeça e pescoço.

Figura 2. Representação esquemática da localização anatômica das cadeias linfonoidais em região de cabeça e pescoço.



Legenda: Figura representativa das cadeias linfonoidais da região de cabeça e pescoço, com destaque, cadeia em rosa, para a principal cadeia de drenagem linfática da cavidade oral, representada pelos linfonodos submandibulares, submentuais e a cadeia cervical jugular interna.

Fonte: ABOU-FOUL, 2020, p. 6. (Adaptado)

Durante o desenvolvimento do sistema linfático na fase embrionária precoce ou tardia podem ocorrer alterações por causas ainda não totalmente compreendidas que levariam à ocorrência de malformações linfáticas em diversos locais do corpo, explicadas no item a seguir.

2.2 Malformações linfáticas

As malformações linfáticas são anomalias do desenvolvimento dos sacos embrionários linfáticos que apresentam falhas na conexão entre essas estruturas e o restante do sistema linfático (ELLURU, 2014; GARZON, 2007). As malformações linfáticas são anomalias vasculares de fluxo lento caracterizadas por canais linfáticos dilatados e/ou cistos revestidos com endotélio linfático (STEINER, 2017; ZHANG, 2018).

As malformações linfáticas podem ocorrer de forma isolada ou associadas a síndromes como Proteus (OMIM #176920), síndrome de Trippel-Trèunany (OMIM #149000), síndrome de CLOVES (OMIM #612918) e CLAPO (OMIM #613089) (BROUILLARD, 2014; LIU, 2010; MC CUAIG, 2017; ZHANG, 2018).

As malformações linfáticas podem ocorrer em todo o corpo, mas acometem principalmente regiões ricas em vasos linfáticos, como cabeça e pescoço e cavidade oral (estes representando entre 50 e 75% dos casos), axila, virilha e mediastino (STEINER, 2017). Na cavidade oral, o local mais acometido é o dorso de língua, seguido pelos lábios, mucosa jugal, palato mole e assoalho de boca (BHAYYA, 2015; GUPTA, 2011).

Grandes malformações linfáticas podem ser diagnosticadas no útero com ultrassom já no início do segundo trimestre, mas as lesões são mais comumente notadas ao nascer, e a grande maioria é evidente aos 2 anos de idade. Ao contrário dos hemangiomas infantis, as malformações linfáticas persistem ao longo da vida, crescem proporcionalmente com o tamanho do paciente e não sofrem involução espontânea (BUCKMILLER, 2010; ELLURU, 2014).

Clinicamente, as malformações linfáticas podem ser classificadas como macrocísticas, microcísticas ou mistas. As malformações linfáticas macrocísticas são grandes massas císticas, por vezes superficiais, subjacentes à pele normal ou tecido subcutâneo, embora possa ocorrer também em espaços mais profundos como no retroperitônio (STEINER, 2017). Em região de cabeça e pescoço as malformações macrocísticas são frequentemente localizadas abaixo do nível do músculo miloioideo (ELLURU, 2014; STEINER, 2017). Da mesma forma, as malformações linfáticas microcísticas podem ocorrer em muitos tecidos, mas afetam mais comumente a pele ou superfícies de mucosa, se apresentam como vesículas microcísticas, muitas vezes firmes, translúcidas com conteúdo claro ou hemorrágico. Em região de cabeça e pescoço, as lesões microcísticas são comumente encontradas acima do nível do músculo miloioideo e envolvem a cavidade oral, orofaringe, língua, glândula submandibular e espaço pré-epiglótico. As malformações mistas apresentam tanto um componente macrocístico quanto microcístico (ELLURU, 2014; STEINER, 2017).

Como representado na Figura 3, clinicamente as lesões orais apresentam-se em sua maioria como um conjunto irregular de vesículas de paredes finas e repletas

de conteúdo proteico semelhantes a ovos de sapos (ALRASHDAN, 2018; BHAYYA, 2015; DEVI, 2016; SUNIL, 2012). Pode-se observar vesículas avermelhadas e azuladas que representam a ruptura de capilares sanguíneos no espaço linfático. Além disso, lesões mais profundas podem gerar massas de crescimento lento e difuso sem alterações na coloração da mucosa (BHAYYA, 2015; DEVI, 2016; MOTAHHARY, 2006; USHA, 2014).

Figura 3. Apresentação clínica típica de malformações linfáticas orais.



Legenda: Observa-se uma malformação linfática em ventre e dorso de língua apresentando um conjunto irregular de vesículas de paredes finas preenchidas ora por material proteico claro, ora por extravasamento sanguíneo.

Fonte: STANESCU et al, 2006, p. 375.

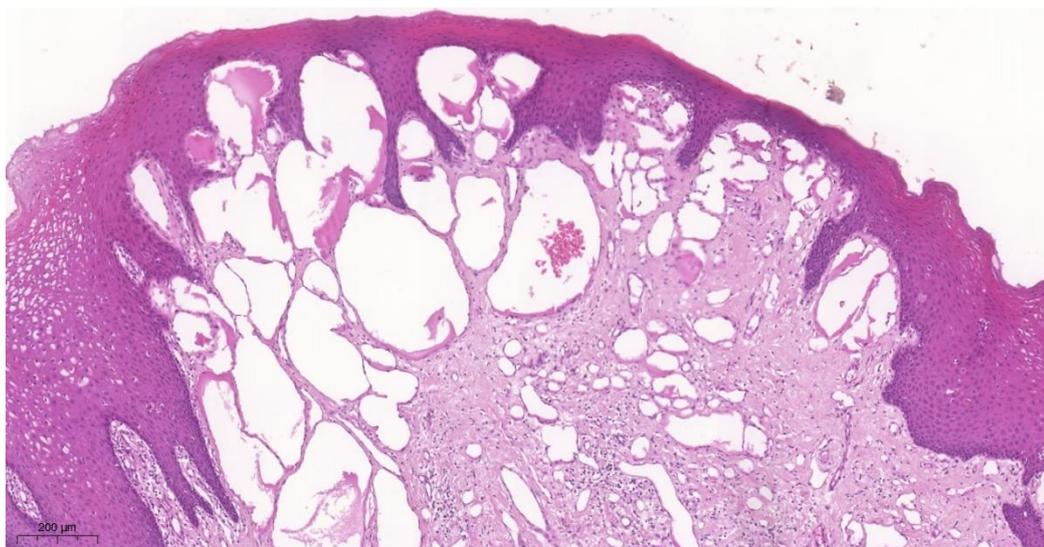
Apesar da história pregressa e o exame clínico serem muito sugestivos, facilitando o diagnóstico de malformação linfática oral, em casos raros outras lesões podem apresentar características semelhantes e por isso são considerados como diagnósticos diferenciais. Dentre estas lesões podemos destacar o hemangioma, o tumor de células granulares, lipomas ou tumores de glândula salivar (ALQAHTANI, 1999; BHAYYA, 2015; JOSHI, 2015; STANESCU, 2006; USHA, 2014).

As complicações clínicas das malformações linfáticas estão relacionados à localização anatômica dessas lesões, bem como à extensão do envolvimento das estruturas anatômicas locais (ELLURU, 2014). O curso clínico varia de lesões relativamente inócuas a lesões graves com problemas funcionais devido ao envolvimento da língua, órbita ou vias aéreas causando crescimento ou destruição esquelética (HOCHMAN, 2011). As principais complicações associadas às

malformações linfáticas orais são a macroglossia, extrusão da língua, obstrução das vias aéreas superiores, dislalia e disfagia (KOLAY, 2017).

Os achados histológicos das malformações linfáticas são demonstrados na Figura 4. Observam-se diversos espaços vasculares linfáticos justaepiteliais de diversos diâmetros por vezes preenchidos com fluido eosinofílico rico em proteínas. Uma única camada de células endoteliais reveste as paredes dos canais linfáticos. O tecido conjuntivo adjacente pode apresentar infiltrado inflamatório crônico, predominantemente composto por linfócitos (ELLURU, 2014). A utilização de marcadores para podoplanina (d2-40) pode ser utilizada em caso de dificuldade de diagnóstico histológico, uma vez que este é um marcador específico das células endoteliais linfáticas (AGARWAL, 2014; ORDONEZ, 2012; PERKINS, 2018).

Figura 4. Aspectos microscópicos das malformações linfáticas orais.



Legenda: Observa-se a presença de vasos linfáticos de diversos calibres próximos ao epitélio da mucosa oral, por vezes preenchidos por material eosinofílico proteico (H&E, aumento original 200x)

Fonte: Arquivo da própria autora, 2021. (Captura de tela obtida no aplicativo *Case Viewer 2.3*).

O tratamento depende da apresentação clínica, do tamanho da lesão, da localização anatômica e das complicações. A decisão entre observação, farmacoterapia, excisão cirúrgica e escleroterapia é complexa (ELLURU, 2014). Em pacientes com malformações linfáticas, pequenas lesões podem ser manejadas por uma abordagem conservadora preservativa. Malformações linfáticas microcísticas e

mistas são tratadas majoritariamente com remoção cirúrgica enquanto para as malformações macrocísticas a injeção intralesional de agentes esclerosantes é feita como um passo anterior a cirurgia ressectiva. Malformações que causam comprometimento das vias aéreas requerem intervenção cirúrgica imediata (ZHANG, 2018). A excisão cirúrgica tem bons resultados com a remoção da lesão, porém a taxa de recorrência da lesão é de 39% (ALQAHTANI, 1999; BHAYYA, 2015). Tratamentos alternativos como a laserterapia, escleroterapia, crioterapia e uso de esteroides são considerados (BHAYYA, 2015).

2.3 Via de sinalização celular PI3K/AKT

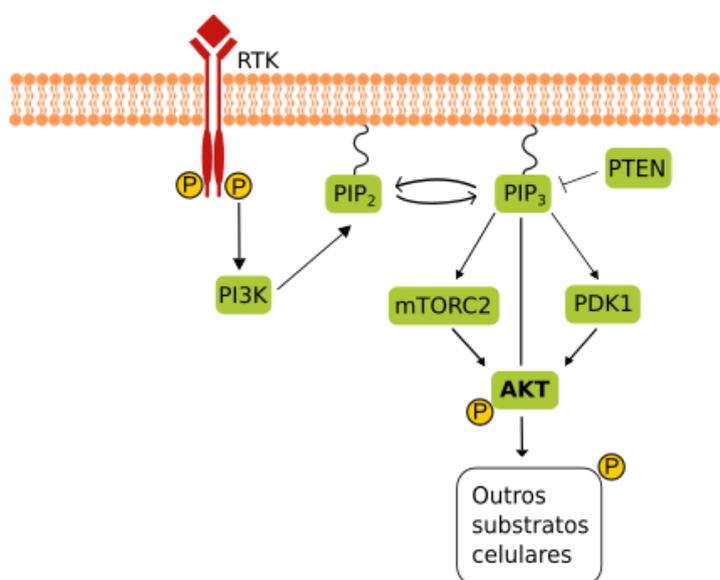
A via PI3K/AKT é uma das principais vias de sinalização celular e é importante para uma gama de processos celulares, incluindo crescimento e divisão celular, migração de células, produção de novas proteínas, transporte de componentes intracelulares e a sobrevivência celular (FRUMAN, 2017; VANHAESEBROECK, 2012). Além disso, alterações na sinalização em PI3K contribuem para um amplo espectro de doenças humanas como câncer, distúrbios imunológicos, distúrbios neurológicos, crescimento localizado de tecidos e doença cardiovascular (CANTLEY, 2002; FRUMAN, 2017; OSBORN, 2015; YUAN, 2008).

Embora existam três classes de PI3K (I, II e III), baseadas em sua estrutura, substrato, distribuição e função, a classe I é a mais relevante para o desenvolvimento de cânceres e malformações vasculares. A PI3K classe I possui quatro isoformas, α , β , δ e γ , cada uma das quais consiste em um heterodímero que inclui uma subunidade catalítica (p110 α , p110 β , p110 δ e p110 γ , codificadas pelos genes *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CG* e *PIK3CD*) e uma reguladora (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β e p55 γ , codificadas por *PIK3R1*, *PIK3R2*, *PIK3RE*) (FRUMAN, 2017; YANG, 2019). Cada isoforma catalítica forma um dímero com uma subunidade reguladora que modula a atividade e a localização intracelular do complexo. As subunidades catalíticas e reguladoras fazem contatos adicionais que mantêm a enzima em baixa atividade em condições basais (JIANG, 2009).

A ativação de PI3K classe I α acontece diretamente a partir de fosforilação gerada pela ligação de fatores de crescimento ao receptor de tirosina quinase (RTK) ou indiretamente quando, após a ligação do fator de crescimento ao RTK, há o

intermédio de outras moléculas para fosforilação de PI3K, como o IRS ou GAB (MENDOZA, 2011). Quando a subunidade catalítica é fosforilada, esta dissocia-se da subunidade reguladora, resultando na geração de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) a partir de fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP₂). O fosfolipídio PIP₃ atua como um segundo mensageiro para recrutar proteínas citoplasmáticas para locais específicos do plasma, ativando principalmente PDK1 e AKT (FIGURA 5). Vários caminhos *downstream* divergentes podem ser disparados simultaneamente pela ativação do PI3K, a via AKT é ativada e regula múltiplas funções celulares incluindo metabolismo, síntese de proteínas, progressão do ciclo celular, crescimento tumoral e angiogênese (JIANG, 2008; KOBIALKA, 2019; YANG, 2019).

Figura 5. Esquema da ativação da via PI3K/AKT



Legenda: Com a recepção de estímulo pelo receptor RTK, há a fosforilação de PI3K que converte PIP₂ em PIP₃, essa molécula então ativa AKT diretamente, ou por intermédio de mTORC2 e PDK1. AKT fosforilada ativa diversos substratos celulares relacionados a sobrevivência, proliferação e motilidade celular.

Fonte: Produção da própria autora, 2021.

Em células normais, o PIP₃ é induzido transitoriamente pela estimulação do fator de crescimento e é rapidamente metabolizado pelas fosfatases lipídicas, incluindo a proteína codificada pelo supressor de tumor *PTEN*, que termina a sinalização PI3K através da defosforilação de PIP₃ (YUAN, 2008). As células neoplásicas frequentemente contêm quantidades elevadas de PIP₃ devido ao aumento da atividade de proteínas sinalizadoras oncogênicas que residem *upstream*

PI3K ou devido à ocorrência de mutações ativadoras da própria PI3K. Sinalização PI3K elevada pode contribuir para a tumorigênese e é uma marca registrada do câncer humano (LAWRENCE, 2014).

Mutações ativadoras em *PIK3CA*, o gene que codifica a subunidade catalítica p100 α de PI3K, foram recentemente identificadas como um novo mecanismo de indução da sinalização oncogênica de PI3K, promovendo a tumorigênese através da regulação positiva da via PI3K/AKT (SAMUELS, 2004; YUAN, 2008). Algumas mutações de *PIK3CA* associadas ao câncer também podem ocorrer durante o desenvolvimento e podem apresentar-se em diversas síndromes conhecidas como *PIK3CA-Related overgrowth spectrum* (PROS) que agrupam as síndromes de KTS (OMIM #149000), CLOVES (OMIM #612918) e CLAPO (OMIM #613089) (KEPPLER-NOREUIL, 2014; KUREK, 2012; LEE, 2012; LINDHURST, 2012; LUKS, 2015; PIACITELLI, 2019; RIVIERI, 2012; VAHIDNEZHAD, 2016, YEUNG, 2017; ZHAO, 2008).

Recentemente, foram descritas mutações somáticas ativadoras no gene *PIK3CA* (p.Cys420Arg, p.Glu542Lys, p.Gln545Lys, p.His1047Arg ou p.His1047Leu) em malformações linfáticas esporádicas e associadas a síndromes. Há uma diferença entre a prevalência das mutações entre cada um dos códons e o tipo de amostra avaliada. No primeiro estudo a descrever tais mutações, malformações linfáticas associadas a síndromes apresentaram maior frequência de mutações no códon 545 (~24%-33%), enquanto malformações esporádicas apresentaram maior frequência de mutações no códon 1047 (47%) (LUKS, 2015). A partir desta descoberta, diversos estudos avaliaram a presença destas mutações em amostras de malformações linfáticas esporádicas e também associadas a síndromes demonstradas na Tabela 1 (BLESINGER, 2018; BOSCOLO, 2015; GLASER, 2018; ZENNER, 2019). Essas mesmas mutações somáticas, além de uma mutação somática adicional (p.Gln546Lys) foram encontradas em uma amostra de Anomalia Linfática Generalizada (GLA) (RODRIGUEZ-LAGUNA, 2018). A constatação de que essas mutações estavam presentes especificamente nas células endoteliais linfáticas de malformações linfáticas foi descrita por Blesinger *et al* (2018).

Estudos com tecidos de malformações linfáticas e com células endoteliais linfáticas provenientes de malformações linfáticas mostraram hiperativação da via PI3K/AKT através da diferença de expressão em western-blot da forma fosforilada de

AKT (pAKT) e proteína AKT total (BLESINGER, 2018; BOSCOLO, 2015; GLASER, 2018; LE CRAS, 2020; OSBORN, 2015).

Tabela 1. Mutações no gene PIK3CA identificadas em estudos prévios de malformações linfáticas.

Estudo	Amostras	Códon	Mutações	%	
LUKS, 2015	LM (n=17)	420	p.Cys420Arg (n=1)	5,8%	
		542	p.Glu542Lys (n=4)	23,5%	
		545	p.Glu545Lys (n=3)	17,6%	
		1047	p.His1047Leu (n=3)	47%	
	KTS (n=21)			p.His1047Arg (n=5)	
		542	p.Glu542Lys (n=3)	14,2%	
		545	p.Glu545Lys (n=10)	47,6%	
	CLOVES (n=33)		1047	p.His1047Leu (n=1)	33,3%
				p.His1047Arg (n=6)	
		420	p.Cys420Arg (n=6)	18,2%	
		542	p.Glu542Lys (n=6)	18,2%	
	BOSCOLO, 2015	LM (n=48)	545	p.Glu545Lys (n=8)	24,2%
1047			p.His1047Leu (n=2)	24,2%	
BLESINGER, 2018	LM (n=6)		p.His1047Arg (n=6)		
		1047	p.His1047Leu (n=2)	4,1%	
		109	Glu109Del (n=1)	16,7%	
		420	p.Cys420Arg (n=1)	16,7%	
		545	p.Glu545Lys (n=2)	33,3%	
GLASER, 2018	LM (n=9)	546	p.Gln546Lys (n=1)	16,7%	
		1047	p.His1047Leu (n=1)	16,7%	
		542	p.Glu542Lys (n=3)	33,3%	
		545	p.Glu545Ala (n=2)	22,2%	
	VLM (n=1)			p.Glu545Lys (n=4)	44,4%
		545	p.Glu545Lys (n=1)	100%	
		542	p.Glu542Lys (n=1)	100%	
	CLOVES (n=2)	KTS (n=1)	542	p.Glu542Lys (n=1)	100%
			1047	p.His1047Leu (n=1)	50%
				p.His1047Arg (n=1)	50%
ZENNER, 2019	LM (n=81)	542	p.Glu542Lys (n=18)	22,2%	
		545	p.Glu545Lys (n=18)	22,2%	
		1047	p.His1047Arg (n=22)	27,2%	

Abreviações: LM (malformação linfática), KTS (Síndrome de Trippel-Trènaunay), VLM (malformação linfática e venosa), CVLM (malformação capilar linfática, e venosa)

Legenda: Mutações identificadas e sua frequência nos casos avaliados em estudos prévios de malformações linfáticas isoladas e associadas a síndromes.

Fonte: Produção da própria autora, 2021.

A ativação da via MAPK/ERK também foi observada em malformações linfáticas e será abordada na próxima subseção.

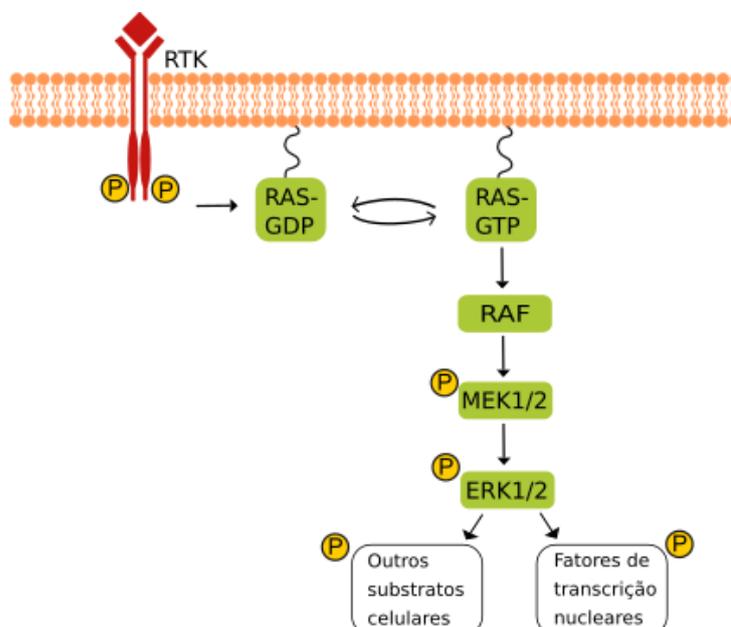
2.4 Via de sinalização intracelular MAPK/ERK

As vias de sinalização MAPK são as principais vias de sinalização intracelular e controlam diversos processos celulares como a expressão gênica, ciclo celular, metabolismo, proliferação, diferenciação, motilidade, apoptose e sobrevivência celular. Diferentes vias de sinalização MAPK podem atuar na regulação celular, e as mais estudadas são a *extracelular regulated kinases* (ERK1/2), Jun NH2 terminal kinases (JNK1/2/3) e p38 (p38 α , β , δ e γ). (KRISHNA, 2008; LAVOIE, 2020; SHAUL, 2007).

Nas vias de MAPK cada cascata é composta por pelo menos três quinases MAPK, MAPK quinase (MAPKK) e MAPK quinase quinase (MAPKKK). Tudo se inicia quando pequenas proteínas G (RAS) recebem um sinal e fosforilam MAPKKK, que fosforila MAPKK, que fosforila MAPK que, por sua vez, fosforila seu alvo específico como por exemplo fatores de transcrição, finalizando assim a transmissão de sinal deste estímulo. Usualmente a proteína correspondente à MAPK de cada cascata que dá o nome à via (LAVOIE, 2020; SHAUL, 2007).

Por exemplo, na via canônica MAPK/ERK, e mais especificamente na cascata RAS-RAF-MEK-ERK (FIGURA 6), as MAPKKK correspondem às proteínas RAF, as MAPKK à proteína MEK1/2 e a MAPK às proteínas ERK1 e ERK2 (KRISHNA, 2008; YOON, 2006). O estímulo de sinal captado pelos receptores será transmitido para pequenas proteínas G (de ligação a GTP), essas pequenas GTPases irão recrutar e ativar as quinases da família RAF, que irá se ligar e fosforilar MEK1/2, que então fosforila ERK1/2 a qual irá atuar em seus diversos substratos nucleares ou citoplasmáticos levando ao controle dos diversos processos celulares pelos quais a via é responsável (KRISHNA, 2008; LAVOIE, 2020).

Figura 6. Esquema de ativação da via MAPK/ERK.



Legenda: Com a recepção de estímulo pelo receptor RTK, há a fosforilação de RAS-GDP em RAS-GTP que ativa RAF (MAPKKK), que fosforila MEK1/2 (MAPKK), que fosforila ERK1/2 (MAPK) que por sua vez age em alvos celulares e nucleares relacionados a sobrevivência, proliferação e motilidade celular.

Fonte: Produção da própria autora, 2021.

A via MAPK/ERK sofre regulação por fosforilação e defosforilação e pode ser regulada também pela ação de *cross-talk* com outras vias de sinalização intracelular. (MENDOZA, 2011; SHAUL, 2007). Mutações ativadoras da via MAPK/ERK são associadas a diferentes tipos de câncer e distúrbios proliferativos (BUROTTO, 2014; SAMATAR, 2014). Além disso a via MAPK/ERK apresenta papel importante na angiogênese (BLESINGER, 2018).

Em alguns estudos com células endoteliais linfáticas isoladas de malformações linfáticas, não foram encontradas diferenças entre os padrões de expressão em Western-blot entre a expressão total de ERK1/2 comparado à expressão de pERK1/2 (BOSCOLO, 2015; LE CRAS, 2020). Em contrapartida, estudos utilizando a mesma metodologia encontraram hiperativação de ERK em malformações linfáticas (BLESINGER, 2018; OSBORN, 2015). Além disto, um estudo utilizando imunohistoquímica para pERK1/2 em malformações linfáticas, mostrou forte positividade nas células endoteliais dos vasos linfáticos (KIM, 2019).

2.5 Meios de compensação entre as vias PI3K/AKT e MAPK/ERK

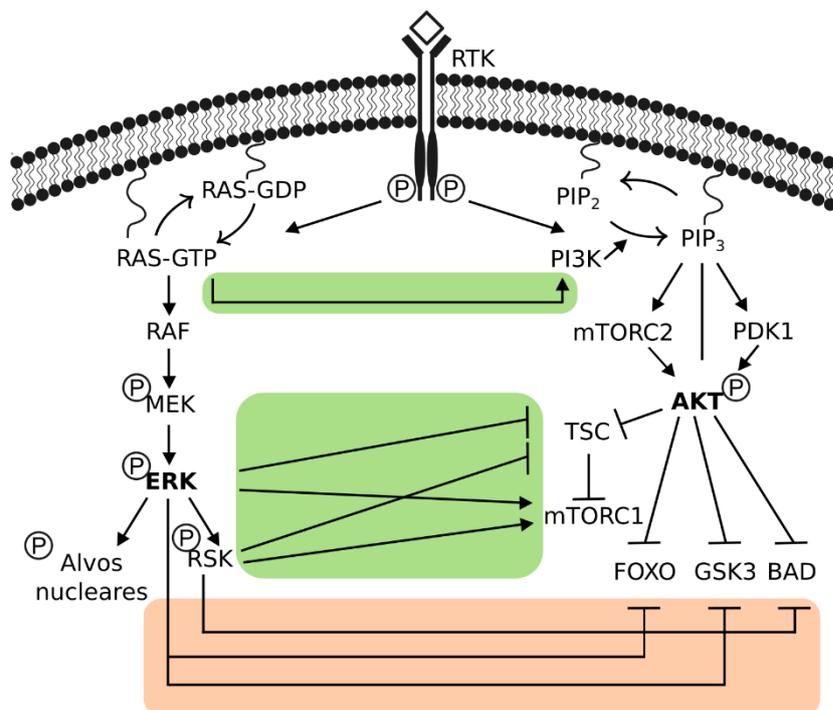
As vias de sinalização intracelular PI3K/AKT e MAPK/ERK apresentam diversos mecanismos de *cross-talk*, expressos na forma de inibição cruzada, ativação cruzada e convergência de sinais. Por definição, a inibição cruzada ocorre quando um componente de uma via regula negativamente um componente *upstream* da outra via inibindo, assim, a capacidade de sinalização da outra via. Já na ativação cruzada, um componente de uma via regula positivamente um componente *upstream* da outra via aumentando, assim, a sinalização desta. Por fim, a convergência de sinais acontece quando duas vias atuam diretamente no mesmo complexo ou proteína regulando positivamente ou negativamente sua função (MENDOZA, 2011).

Em resumo, quando um receptor de tirosina quinase (RTK) interage com sinais externos, como por fatores de crescimento, esses receptores são capazes de ativar as vias de PI3K/AKT e MAPK/ERK. Na via de MAPK/ERK, quando o RAS-GTP ativado interage e ativa RAF, que fosforila e ativa MEK, ativando ERK por fosforilação. ERK em seu estado fosforilado pode agir fosforilando uma variedade de proteínas alvo tanto nucleares quanto citoplasmáticas (KRISHNA, 2008; SHAUL, 2007). Já em PI3K/AKT, o sinal externo estimula a fosforilação de PIP₂ por PI3K, convertendo-o em PIP₃. AKT é recrutada para a membrana plasmática ligando-se ao PIP₃ e, em seguida, é ativada devido à fosforilação por PDK1 e mTORC2 que também se ligam ao PIP₃. AKT então inibe o TSC levando à ativação do mTORC1, uma vez que o TSC é inibidor de mTORC1. AKT leva à proliferação celular e sobrevivência celular inibindo FOXO, GSK3 e BAD, uma vez que essas proteínas inibem a proliferação celular ou induzem a morte celular (YANG, 2019). Portanto, tanto as vias MAPK/ERK quanto PI3K/AKT desempenham um papel importante na sobrevivência, proliferação e crescimento celular (ARKUN, 2016; ERSAHIN, 2015; MENDOZA, 2011).

A ativação cruzada inclui ativação de PI3K por RAS, inibição do TSC pela ERK e RSK, que também ativam o mTORC1. Nestes casos, os membros da via MAPK/ERK regulam componentes *upstream* da via PI3K/AKT, aumentando sua atividade. Além disso, tanto MAPK/ERK quanto PI3K/AKT podem atuar diretamente nos mesmos alvos *downstream*, como FOXO, GSK3 e BAD regulando negativamente suas funções, caracterizando a convergência de sinais (FIGURA 7). A inibição cruzada entre essas vias é caracterizada pela inibição de GAB, intermédio entre a fosforilação

de PI3K por RTK, a partir de ERK e pela inibição de RAF por AKT (DE LUCA, 2012; ERSAHIN, 2015; MENDONZA, 2011; NIBA, 2013).

Figura 7 – *Cross-talk* entre as vias de sinalização intracelular PI3K/AKT e MAPK/ERK.



Legenda: Os mecanismos de ativação cruzada estão representados pelos quadros verdes e a convergência de sinais pelo quadro laranja.

Fonte: produção da própria autora, 2021.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil imuno-histoquímico e molecular de amostras de malformações linfáticas orais.

3.2 Objetivo específico

Caracterizar as amostras de malformações linfáticas orais a partir de dados clínicos;

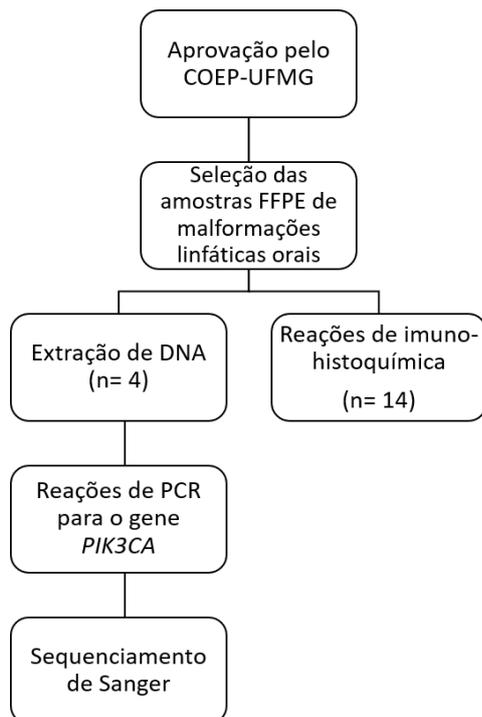
Investigar mutações no códon 1047 do gene *PIK3CA* em amostras de malformações linfáticas orais;

Caracterizar a imunoexpressão das formas fosforiladas das proteínas AKT1 e ERK1/2 em amostras de malformações linfáticas orais.

4 METODOLOGIA

A Figura 8 apresenta o fluxograma da metodologia deste estudo, a qual é detalhada nas subseções seguintes.

Figura 8 – Fluxograma metodológico do estudo.



Legenda: Imagem esquemática da sequência dos experimentos deste estudo

Fonte: Produção pela própria autora, 2021.

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 30531120.4.0000.5149; Parecer: 4.082.465) (ANEXO A).

4.2 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal, do tipo retrospectivo, com população-alvo constituída por indivíduos com diagnóstico histopatológico de linfangioma oral com

registro no laboratório de Patologia Oral e Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG.

4.3 Amostras

Foi utilizada uma amostra de conveniência de casos de malformações linfáticas orais fixados em formol e incluídos em parafina (*formalin fixed paraffin embedded*; FFPE). No total, 38 casos foram identificados no arquivo do serviço de Patologia Oral e Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Oito casos não apresentavam os tecidos FFPE arquivados. Os diagnósticos dos 30 casos restantes foram revisados por dois patologistas bucais (R.S.G. e C.C.G.), associando as características clínicas e histopatológicas com lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E), nesta etapa 16 casos foram excluídos pelo tecido remanescente nos blocos não serem representativos de malformações linfáticas orais. Dados clínicos como sexo, idade, localização da lesão foram coletados para todos os casos.

4.4 Extração do DNA

Os tecidos FFPE foram submetidos a cortes de 8µm de espessura em micrótomo, descartando os três primeiros cortes de cada amostra. Foram coletados de 20 a 40 cortes, a depender da disponibilidade de tecido, e então foram depositados em microtubos de 1,5ml.

O DNA genômico (gDNA) das amostras de tecidos FFPE foi extraído utilizando o *QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany). Aos microtubos em que as amostras foram depositadas foi adicionado a *Deparaffinization Solution* (QIAGEN, Hilden Germany) para desparafinização a 56°C por 25 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, foi adicionado Buffer ATL e, após centrifugação, foi adicionada à fase inferior transparente a proteinase K (QIAGEN, Hilden, Germany) e encubado novamente a 56°C até que o conteúdo se tornasse homogêneo, por aproximadamente 12 horas. Em seguida era levado a incubação em banho seco a 90°C por 1 hora. A fase inferior, contendo o DNA foi então transferida para um novo microtubo e seguiu-se pela aplicação de Buffer AL e em seguida, etanol absoluto

(Merck). Então, o DNA foi retido na membrana da coluna *QIAamp Min Elutecolumn* (*QIAampMinElute® Columns*) e foram feitas lavagens com Buffer AW1 e Buffer AW2. Por fim, foram realizadas três eluições com 30µl, 25µl e 20µl de Buffer ATE, respectivamente.

A análise da concentração e pureza do gDNA obtido de todas as amostras foi realizada por meio do espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Os parâmetros utilizados para seleção das extrações foram as que apresentaram razão de absorbância 260/280 entre 1,8 e 2,0 e razão 260/230 entre 2,0 e 2,2.

4.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Foram realizadas as reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das regiões de interesse do gene *PIK3CA* para quatro amostras a fim de investigar a presença de mutações p.His1047Arg e p.His1047Leu, no éxon 20 (Luks et al., 2015). Os demais nucleotídeos do amplicon analisado foram também inspecionados manualmente na busca de possíveis outras mutações. Os iniciadores utilizados foram desenhados com o auxílio da ferramenta *Primer-BLAST®* (National Center for Biotechnology Information, Rockville, MD, USA) e estão descritos na Tabela 2. Foi adicionada aos iniciadores uma sequência M13 para simplificar o fluxo de trabalho e a análise dos dados. A adição desta sequência permite que todos os produtos da PCR sejam sequenciados utilizando apenas o par de iniciadores M13. A sequência M13 para os iniciadores *Forward* foi 5'GTAAAACGACGGCCAGT3' e para iniciadores *Reverse* 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados para a detecção das mutações na região de interesse no gene *PIK3CA*.

Iniciador	Sequência	Códon de interesse	Tamanho do amplicon sequenciado (pb)
PIK3CA Exon 20 F	GTAAAACGACGGCCAGTACTGAGCAAGAGGCTTTGGAG	1047	150
PIK3CA Exon 20 R	CAGGAAACAGCTATGACCCAGAGTGAGCTTTCATTTTCTC		

Abreviações: pb: pares de base.

Sequência M13 em destaque,

Fonte: Produção pela própria autora, 2021.

Para as reações da PCR foi utilizado um volume final de 25µl, contendo 100ng de gDNA, 10µM de cada iniciador e 1x de *MyTaq HD Red Mix* (Bioline Reagents Ltd, UK). Todas as reações foram realizadas na *Mastercycler Gradient thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany) e as condições para os ciclos de PCR para o alvo *PIK3CA* foram ajustadas para permitirem uma melhor amplificação do gDNA de amostras FFPE. A primeira etapa foi de desnaturação inicial que ocorreu a 95°C por 3 minutos. As etapas seguintes se repetiram por 45 ciclos: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento à temperatura de melting específica do iniciador (60°C) por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Por fim, a etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos seguido de resfriamento a 4°C. As reações de PCR foram conduzidas utilizando controle positivo (amostra de gDNA de alta qualidade extraído de hiperplasias fibrosas inflamatórias) e negativo (todos os componentes na ausência do gDNA).

A fim de verificar o resultado da amplificação, os produtos de PCR foram então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% marcado por fluorescência (SYBR™ Safe DNA gel stain; introgen by Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), e visualizados em um transiluminador sob luz UV. Os produtos de PCR passaram por um processo de purificação enzimática com a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, USB®, Santa Clara, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 2µl da enzima ExoSAP-IT em 5µl de amostra e levados à *Mastercycler Gradient thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany) em ciclo de 37°C por 15 minutos, seguido de ciclo a 20°C por 15 minutos.

4.6 Sequenciamento de Sanger

Após a realização da purificação dos produtos da PCR foi realizado o sequenciamento de Sanger para determinar a sequência de nucleotídeos da região de interesse do gene. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando

reagentes do kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, Wilmington, USA) e a eletroforese capilar ocorreu no equipamento *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Wilmington, USA). Todos os produtos foram sequenciados com o iniciador *reverse*. Os cromatogramas gerados foram visualizados e manualmente inspecionados no software *SnapGene* (GSL Biotech; disponível em: snapgene.com), utilizando-se a sequência referência do gene para comparação (PIK3CA: NM_006218.4).

4.7 Imuno-histoquímica

Para avaliar a ativação das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK nas amostras de malformações linfáticas orais foram realizadas reações de imuno-histoquímica para as formas fosforiladas das proteínas AKT1 (pAKT1) e ERK1/2 (pERK1/2) em 14 amostras seguindo protocolo padrão.

Para cada amostra FFPE foram confeccionadas duas lâminas. Foram realizados dois cortes de 3µm por lâmina de vidro silanizada (StarFrost, Knittel Glass, Germany). Os cortes foram desparafinizados com xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e em seguida hidratados com álcool em concentrações graduais de 95% a 80% (Merck). A recuperação antigênica foi realizada com tampão de Citrato de pH 6,0 (pAKT1) e com tris-EDTA de pH 8,0 para pERK1/2 por 30 minutos, em *steamer* a 90°C. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com metanol e peróxido de hidrogênio na proporção de 1:1. A incubação com o anticorpo primário foi realizada com anticorpo monoclonal de coelho pAKT1 (s473, EP2109Y, Abcam), diluído 1:200 com diluente de anticorpo, e anticorpo monoclonal de coelho anti-pERK1/2 (1:100, Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology, catalog number #4376), diluído 1:100 com diluente de anticorpo, a 4°C por 18 horas. Para o controle negativo a incubação foi realizada pela omissão do anticorpo primário. O controle positivo interno foi realizado pela presença de epitélio de mucosa oral nos cortes, tecido com marcação conhecida. Para a visualização da reação para pAKT1 foi utilizado o complexo *avidin-biotin* e *Horseradish peroxidase* (LSAB Kit, Dako Cytomation) e para pERK1/2 foi utilizado o sistema a base de polímero (EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, USA) e para ambos o cromógeno diaminobenzidina (Dako North America, Carpinteria, USA) com incubação de acordo com a inspeção visual. A contra-coloração

foi realizada com hematoxilina de Mayer por 3 minutos, os cortes foram então desidratados em concentrações graduação de 70% a 90% de álcool absoluto (Merck), imersos em xilol e montados em lâminas por meio de montagem Entellan (Merck).

Os resultados das duas reações de imuno-histoquímica foram avaliados por três observadores (I.P.G., R.S.G. e C.C.G.) em microscópio óptico de luz. Toda a extensão das lâminas foi avaliada e a marcação foi considerada positiva quando foi nuclear ou citoplasmática nas células endoteliais dos vasos linfáticos, independente da sua intensidade. As lâminas então foram escaneadas em um aumento de 20x, utilizando Pannoramic MIDI Digital Slide Scanner (3DHistech, Hungary) e as imagens foram visualizadas e capturadas utilizando o aplicativo Case Viewer v.2.3. (3DHistech).

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão apresentados abaixo e foram escritos sob forma de artigo científico, publicado no periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology* (doi: 10.1016/j.oooo.2021.08.018. Qualis A2 – Fator de impacto: 1.601 em 2019) (ANEXO B).

5.1 Dados clínico-patológicos

Na tabela 3 observa-se a descrição dos dados clínicos das 14 amostras de malformações linfáticas orais obtidas entre os anos de 1969 e 2019. A idade dos indivíduos variou de 7 a 72 anos, com média de 19 anos. Quanto ao sexo, tem-se uma proporção sexo 1:1, com sete indivíduos do sexo feminino e sete indivíduos do sexo masculino. A língua foi o lugar mais acometido (8/14; 57,4%).

Tabela 3 – Características clínicas das 14 amostras de malformações linfáticas orais incluídas no estudo.

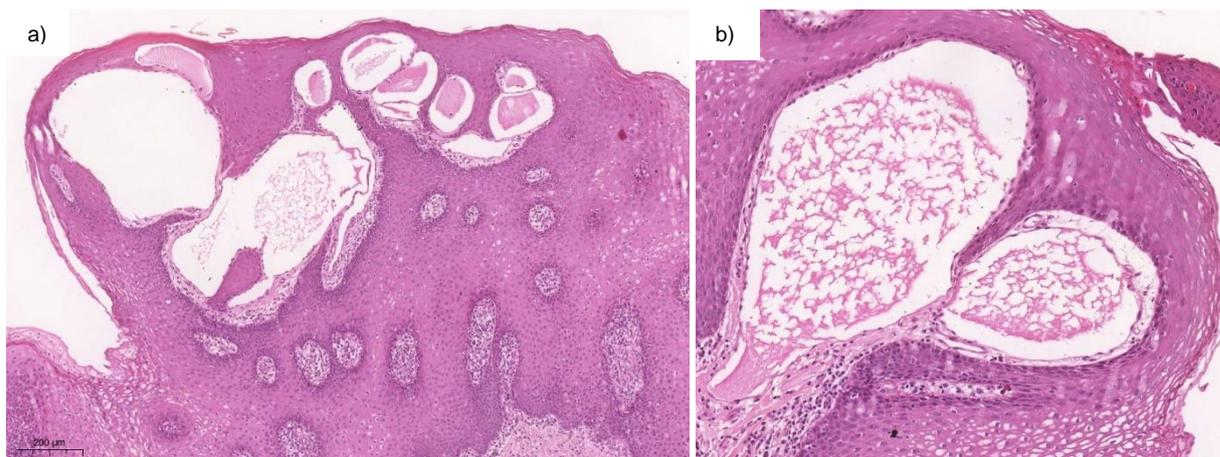
Amostra	Sexo	Idade	Tempo de evolução	Tamanho em mm	Localização	Biópsia
1*	M	11	Indeterminado	SD	Mucosa jugal	Excisional
2*	M	26	1 ano	SD	Fundo de vestibulo	Excisional
3*	F	12	Indeterminado	6mm	Ventre de língua	Excisional
4*	M	8	Indeterminado	20mm	Pilar amigdaliano	Excisional
5	F	34	12 anos	SD	Mucosa jugal	Incisional
6	F	7	6 anos e 6 meses	5mm	Dorso de língua	Excisional
7	F	35	23 anos	SD	Ventre de língua	Excisional
8	M	6	Indeterminado	30mm	Dorso de língua bilateral	Incisional
9	M	7	1 ano e 4 meses	SD	Dorso de língua	Excisional
10	F	72	Indeterminado	SD	Borda lateral de língua	Incisional
11	F	23	2 meses	3mm	Dorso de língua	Excisional
12	F	10	5 anos	20mm	Dorso de língua	Incisional
13	M	8	Indeterminado	25mm	Palato duro/Palato mole	Incisional
14	M	8	Indeterminado	20mm	Pilar amigdaliano	Incisional

* Amostras submetidas ao Sequenciamento de Sanger para o éxon 20 do gene *PIK3CA*
 Abreviações: F: Feminino, M: Masculino, SD: Sem o dado.

Fonte: Produzido pela própria autora, 2021.

Microscopicamente, todos os 14 casos apresentavam como característica principal os diversos vasos linfáticos com diferentes dilatações. O endotélio desses vasos é fino e o lúmen por vezes é preenchido por fluido eosinofílico e eventuais linfócitos. O estroma é de tecido conjuntivo fibroso com algumas células inflamatórias (Figura 9).

Figura 9 – Características histológicas das malformações linfáticas orais.



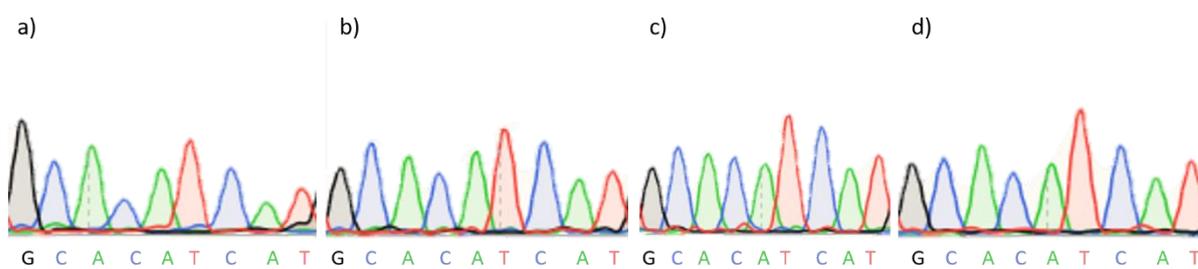
Legenda: a) Observa-se a presença de vasos linfáticos de diferentes calibres, por vezes bem próximos ao epitélio da mucosa oral (Amostra #13. H&E, aumento original 50x)
b) Destaque para os vasos linfático com camada endotelial fina e conteúdo proteico em seu interior (Amostra #13. H&E, aumento original 100x)

Fonte: Arquivo da própria autora, 2021. (Captura de tela obtida no aplicativo *Case Viewer 2.3*)

5.2 Sequenciamento de Sanger

Quatro amostras de linfangioma foram sequenciadas para análise de mutações em no códon 1047, éxon 20 do gene *PIK3CA*. Todas as amostras apresentaram seqüências selvagens para este gene, como demonstrado na Figura 10.

Figura 10 – Captura de tela dos cromatogramas demonstrando o códon 1047 do gene *PIK3CA* por sequenciamento de Sanger das quatro amostras de malformações linfáticas orais.



Legenda: Observa-se ausência de mutações em todas as quatro amostras.

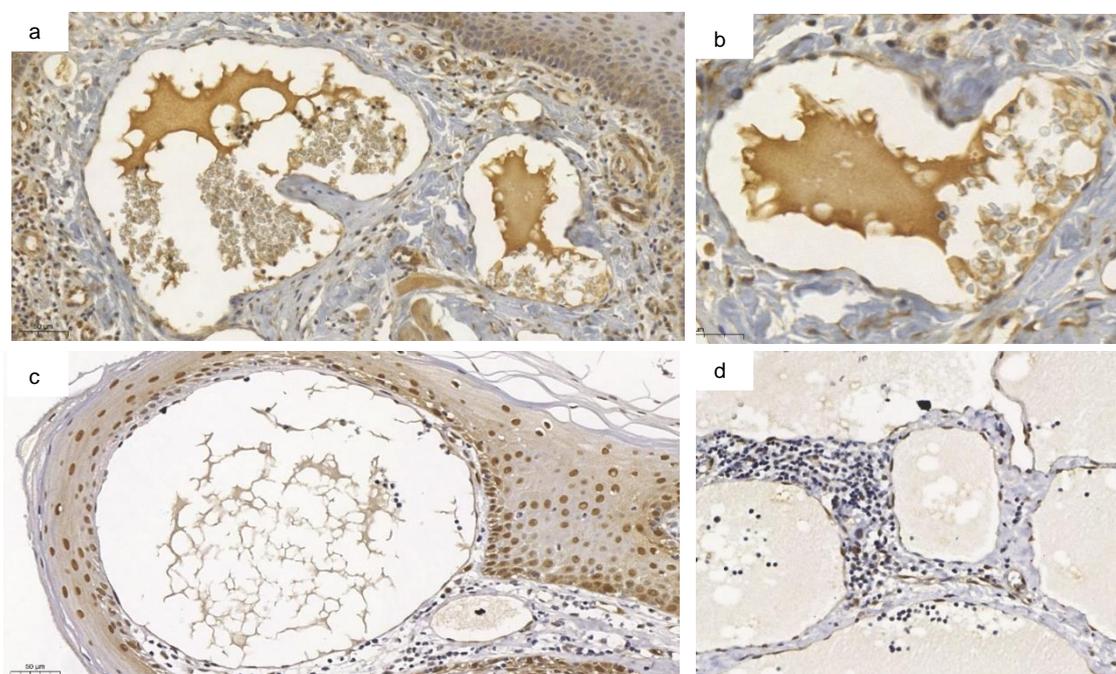
a) Amostra #1; b) Amostra #2; c) Amostra #3; d) Amostra #4.

Fonte: Produção da própria autora, 2021. (Capturas de telas obtidas do aplicativo *Snap Gene® Viewer* 5.0.7).

5.3 Imuno-histoquímica

A expressão imuno-histoquímica da forma fosforilada de AKT1 e de ERK1/2 foi observada em todas as 14 amostras de malformações linfáticas orais. O padrão de imuno-expressão foi semelhante em todas as amostras, sendo observada intensa imunopositividade predominantemente citoplasmática em pAKT1 e nuclear para pERK1/2. O padrão de expressão imuno-histoquímica descrito para pAKT1 e pERK1/2 pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Imuno-expressão para proteínas pAKT1 e pERK1/2 em malformações linfáticas orais.



- Legenda: a) Positividade citoplasmática e áreas focais de positividade nuclear para pAKT1 nas células endoteliais linfáticas. Positividade nas células epiteliais da mucosa oral serviram como controle interno da reação.(Amostra #8. Aumento original 200x).
- b) Destaque da positividade citoplasmática e nuclear para pAKT1 nas células endoteliais linfáticas (Amostra #8. Aumento original 400x).
- c) Positividade nuclear para pERK1/2 nas células endoteliais linfáticas. Positividade nas células epiteliais da mucosa oral serviram como controle interno da reação.(Amostra #13. Aumento original 200x)
- d) Destaque da positividade nuclear para pERK1/2 nas células endoteliais linfáticas (Amostra#4. Aumento original 200x).

Fonte: Arquivo da própria autora, 2021. (Captura de tela obtida no aplicativo *Case Viewer* 2.3)

6 DISCUSSÃO

Historicamente, as malformações linfáticas macrocísticas e microcísticas foram chamadas de “Higroma cístico” e “Linfangioma circunscrito”, respectivamente. Porém, essa nomenclatura é inadequada, pois o sufixo “-oma” denota uma neoplasia benigna, doença causada pela proliferação celular autônoma que não é uma característica das malformações linfáticas (COLLETTI, 2020; STEINER, 2017). A Organização Mundial da Saúde (OMS), apresenta uma série de inconsistências na classificação e nomenclatura das malformações vasculares. Assim, a Sociedade Internacional para o Estudo de Anomalias Vasculares (ISSVA) estabelece desde sua primeira classificação em 1996, seguida da atualizada (2014) a nomenclatura universal para todas as anomalias vasculares (ISSVA, 2014; STEINER, 2017; WASSEF, 2015). Métodos conflitantes de classificação e terminologias confusas, dificultaram por anos a discussão de malformações congênitas do sistema linfático (GARZON, 2007). Uma correta terminologia diagnóstica proporciona acesso a publicações recentes sobre opções de tratamento, com isso, o uso de uma terminologia desatualizada pode representar atraso no tratamento adequado do paciente (COLLETTI, 2020). O uso da palavra linfangioma para se referir as malformações linfáticas está obsoleta há décadas, porém ainda é ensinada dentro das instituições de ensino em Odontologia e ainda consta nos Descritores em Saúde (DeCS).

Os estudos presentes na literatura tratam das malformações linfáticas como um todo, com lesões macro e microcísticas e de diferentes localizações anatômicas sendo avaliadas em conjunto. Também não se observaram estudos específicos para as malformações linfáticas orais. A etiopatogenia das malformações linfáticas vem sendo elucidada nos últimos anos e estudos sugerem que a ativação das vias de sinalização celular PI3K/AKT e MAPK/ERK, bem como mutações somáticas no gene *PIK3CA* sejam os principais mecanismos associados ao desenvolvimento destas lesões (BLESINGER, 2018; BOSCOLO, 2015; GLASER, 2018; LUKS, 2015; OSBORN, 2015).

Vias de sinalização celular como PI3K/AKT e MAPK/ERK são ocasionalmente ativadas causando disfunção das células endoteliais, podendo resultar no aparecimento de malformações linfáticas (LUKS, 2015; NGUYEN, 2017; RODRIGUEZ-LAGUNA, 2018). Apesar de Luks e colaboradores (2015) não

encontrarem correlações entre mutações específicas em *PIK3CA* com os fenótipos macro ou microcístico ou na severidade clínica em malformações linfáticas, Zenner e colaboradores (2019) fizeram um estudo para avaliar a correlação entre a presença de mutações em *PIK3CA* e características clínicas das malformações linfáticas. A localização na região orofacial e também o tipo misto tiveram diferenças estatísticas que comprovam que estão mais associados à presença de mutações nesse gene. A ausência de mutações no gene *PIK3CA* nas amostras avaliadas de malformações linfáticas orais neste estudo pode estar associado a inocuidade das lesões estudadas que se apresentavam com tamanho reduzido. No entanto, a frequência de mutações específicas no códon 1047 difere bastante nos estudos prévios, alguns estudos não detectaram esta mutação (GLASER, 2018) e em outros a frequência variava entre 4,1% a 47% nas amostras de malformações linfáticas isoladas (BLESINGER, 2018; BOSCOLO, 2015; LUKS, 2015; ZENNER, 2019). Nosso estudo sugere que aparentemente mutações no códon 1047 não são frequentes nas amostras de malformações linfáticas orais. No entanto, cabe ressaltar que o número de amostras avaliadas foi pequeno. Considerando a ausência de mutação nas quatro amostras inicialmente avaliadas, não expandimos o coorte para acessar a mutação em mais amostras.

A ativação das vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK/ERK foi recentemente reportada em malformações linfáticas (BLESINGER, 2018; BOSCOLO, 2015; GLASER, 2018; KIM, 2019; OSBORN, 2015), porém o envolvimento dessas vias especificamente nas malformações linfáticas orais ainda não foi descrito. Assim, nosso estudo verificou a ativação de PI3K/AKT e MAPK/ERK em malformações linfáticas orais a partir de imuno-histoquímica para as formas fosforiladas de AKT1 e ERK1/2. A presença dessas proteínas fosforiladas representa a ativação final das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK, respectivamente. O padrão de imunomarcagem para pERK1/2 e pAKT1 foi similar com marcação positiva nas células endoteliais linfáticas. A ativação de PI3K/AKT e MAPK/ERK observada nas malformações linfáticas orais no presente estudo foi similar ao observado em malformações linfáticas esporádicas e associadas a síndromes com a presença de mutações em *PIK3CA* (BLESINGER, 2018; BOSCOLO 2015; OSBORN, 2015).

Em estudos prévios, células endoteliais de malformações linfáticas demonstraram aumento na proliferação e expressão de pAKT e pERK quando

comparados com células endoteliais linfáticas de tecido normal dérmico, demonstrando o estado de ativação angiogênica (BLESINGER, 2018; BOSCOLO 2015; OSBORN, 2015). A transdução de sinais de PI3K pelas quinases AKT e mTOR são bem documentadas no processo de tumorigênese e angiogênese (JIANG, 2008; KOBIALKA, 2019), e também na formação do tecido linfático em camundongos (ZHOU, 2010). A fosforilação de ERK também é demonstrada como um marcador de angiogênese em células endoteliais (BLESINGER, 2018). As vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK/ERK são intimamente relacionadas pelo fato de serem ativadas por receptores de membrana semelhantes e pelos diversos modos de *cross-talk* entre elas (MENDOZA, 2011). As interações entre as vias descritas na subseção da revisão de literatura do presente estudo vão de acordo com a ativação simultânea dessas vias em nossas amostras.

As malformações linfáticas orais não regridem ou desaparecem (VAN DAMME, 2020). Entretanto, complicações como extrusão lingual, obstrução de vias aéreas superiores e dificuldade em mastigar e falar podem acontecer dependendo da localização e extensão das lesões (KOLAY, 2018). Os tratamentos convencionais são escleroterapia para lesões macrocísticas, porém as lesões microcísticas não respondem bem a esse tratamento e frequentemente são tratadas com remoção cirúrgica (COLLETTI, 2014). Entretanto, essas lesões frequentemente sofrem recidivas (BOSCOLO, 2015; ZHANG, 2018). Inclusive, estudos iniciais buscaram observar os sintomas clínicos e efeitos sobre atividades cotidianas em pacientes portadores de malformações linfáticas que ainda não foram submetidos a cirurgias ressectivas. Os sintomas clínicos estão intimamente relacionados à gravidade da lesão, enquanto os impactos na vida diária não apresentam essa correlação, demonstrando assim que, a despeito da agressividade clínica, os pacientes enfrentam limitações em atividades cotidianas devido a presença da malformação linfática (KIRKHAM, 2015). Adicionalmente, dependendo da localização da lesão a remoção cirúrgica se torna um desafio por proximidades com estruturas anatômicas importante e também pela extensão (KOLAY, 2018).

Com a dificuldade de se encontrar tratamentos efetivos, diversas terapias alternativas têm sido testadas ao longo dos anos, como a ablação a laser (FRANÇA, 2013; SHUMAKER, 2013) e a fotocoagulação a laser (CHANG, 2020). É bem descrito na literatura que mutações em componentes das vias PI3K/AKT e MAPK/ERK

ocorrem em diversos tipos de câncer humanos, e inibidores seletivos de terapia alvo para essas vias vem sendo desenvolvidos para aprimoramento dos meios de tratamento (PORTA, 2014; SAMATAR, 2014; VIGNOT, 2005; YANG, 2019). Seguindo a descoberta do envolvimento patogênico dessas vias em malformações vasculares, o uso de terapias alvo começaram a ser testadas neste contexto (NGUYEN, 2017, VAN DAMME, 2020). Sirolimus (um inibidor específico de mTOR) é a droga mais estudada no contexto das malformações linfáticas tanto experimentalmente (DI BLASIO, 2018) quanto clinicamente em casos refratários (ADAMS, 2016; PARK, 2018; WIEGAND, 2018; YESIL, 2016), inclusive em casos de malformações linfáticas orais em língua (GHARIANI-FETOUI, 2019). Além deste, inibidores específicos de *PIK3CA* (Ly294002 e Wortmannin) foram testados *in vitro* demonstrando resultados encorajadores nas células endoteliais linfáticas de malformações linfáticas (BLESINGER, 2018; BOSCOLO, 2015). A ativação das vias PI3K/AKT em malformações linfáticas orais observadas no presente estudo revela que essas vias de sinalização intracelular estão envolvidas com a patogênese molecular dessas lesões. Nossos resultados podem servir de base para novos estudos investigativos sobre a patogênese molecular e terapias alvo como um passo antecedente a cirurgia em casos desafiadores de malformações linfáticas orais.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que as vias de sinalização PI3K/AKT e MAPK/ERK encontram-se ativadas em malformações linfáticas esporádicas orais, elucidando parcialmente a patogênese molecular destas lesões.

REFERÊNCIAS

ABOU-FOUL, A. K. Surgical anatomy of the lymphatic drainage of the salivary glands: a systematic review. **J Laryngol Otol**, v. 7, n. 1, p. 1-7, Oct. 2020.

ADAMS, M. T., SALTZMAN, B., PERKINS, J. A. Head and neck lymphatic malformation treatment: a systematic review. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 147, n. 4, p. 627-639, Oct. 2012.

AGARWAL, D., PARDHE, N., BAJPAI, M., GUPTA, S., MATHUR, N., VANAKI, S., *et al.* Characterization, localization and patterning of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinoma: A comparative study using D2-40 and CD-34 IHC marker. **J Clin Diagn Res**, v. 8, p. 86-89, Oct. 2014.

ALQAHTANI, A., NGUYEN, L. T., FLAGEOLE, H., SHAW, K., LABERGE, J. M. 25 years' experience with lymphangiomas in children. **J Pediatr Surg**, v. 34, n. 7, p. 1164-1168, Jul. 1999.

ARKUN, Y. Dynamic modeling and analysis of the *cross-talk* between insulin/AKT and MAPK/ERK signaling pathways. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 1-22, Mar. 2016.

BAKER, C. L., VAUGHN, C. P., SAMOWITZ, W. S. A PIK3CA pyrosequencing-based assay that excludes pseudogene interference. **J Mol Diagn**, v. 14, n. 1, p. 56-60, Jan. 2012.

BARRETT, T., CHOYKE, P. L., KOBAYASHI, H. Imaging of the lymphatic system: new horizons. **Contrast Media Mol Imaging**, v. 1, n. 6, p. 230-245, Nov. 2006.

BERGGREEN, E., WIIG, H. Lymphatic function and responses in periodontal disease. **Exp Cell Res**, v. 325, n. 2, p. 130-137. Feb. 2014.

BHAYYA, H., PAVANI, D., AVINASH TEJASVI, M. L., GEETHA, P. Oral lymphangioma: a rare case report. **Contemp Clin Dent**, v. 6, n. 1, p. 584-587, Nov. 2015.

BLESINGER H., *et al.* PIK3CA mutations are specifically localized to lymphatic endothelial cells of lymphatic malformations. **Plos One**, v. 13, n. 7, p. 1-18, Jul. 2018.

BOSCOLO, E. *et al.* AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation, **Angiogenesis**, v. 18, n. 2, p. 151-162, Apr. 2015.

BROUILLARD, P., BOON, L., VIKKULA, M. Genetics of lymphatic anomalies. **J Clin Invest**, v. 124, n. 3, p. 898-904, Mar. 2014.

BUCKMILLER, L. M., RICHTER, G. T., SUEN, J. Y. Diagnosis and management of hemangiomas and vascular malformations of the head and neck. **Oral Dis**, v. 16, n. 5, p. 405-418, Jul. 2010.

BUROTTO, M. *et al.* The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. **Cancer**. New York, v. 120, n. 22, p. 3446-3456, Nov. 2014.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 31, n. 296 (5573), p. 1655-1657, May. 2002.

CHANG, C. J., HSIAO, Y. C. Long term follow-up intralesional laser photocoagulation for head and neck lymphatic malformations using neodymium-yttrium-aluminium-garnet laser. **Ann Plast Surg**, v. 84, n. 3, p. 288-292, Mar. 2020.

CLEMENT, O., LUCIANI, A. Imaging the lymphatic system: possibilities and clinical applications. **Eur Radiol**, v. 14, n. 8, p. 1498-1507, Aug. 2004.

COLLETTI, G. *et al.* Contemporary management of vascular malformations. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 3, p. 510-528, Mar. 2014.

COLLETTI, G., TOMBRIS, S., ROZELL-SHANNON, L. Don't call me "lymphangioma!". **Oral Maxillofacial Surg**, Letter to the editor, Jun. 2020.

Di BLASIO L., *et al.* PI3K/mTOR inhibition promotes the regression of experimental vascular malformations driven by *PIK3CA*-activating mutations. **J Cell Death and Disease**, v. 9, n. 45, p. 1-15, Dec. 2018.

DE LUCA, A. *et al.* The RAS/RAF/ MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Expert Opin Ther Targets**. London, v. 16, n. 2, p. S17-S27, Apr. 2012.

DEVI, A., NARWAL, A., YADAY, A. B., SINGH, V., GUPTA, A. Classical cases of lymphangioma – As multiple vesicular eruptions. **J Clin Diagn Res**, v. 10, n. 1, p. 22-23, Jun. 2016.

ELLURU, R. G., BALAKRISHNAN, K., PADUA, H. M. Lymphatic malformations: diagnosis and management. **Semin Pediatr Surg**, v. 23, n. 4, p. 178-185, Aug. 2014.

ERSAHIN, T., TUNCBAG, N., CETIN-ATALY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Mol Biosyst**, v. 11, n. 7, p. 1946-1954, Jul. 2015.

FRANÇA, K, *et al.* Lasers for cutaneous congenital vascular lesions: a comprehensive overview and update. **Lasers Med Sci**, v. 28, n. 4, p. 1197-1204, Jul. 2013.

FRUMAN, D. A., *et al.* The PI3K pathway in human disease. **Cell**, v. 70, n. 1, p. 605-635, Aug. 2017.

GHARIANI-FETOUI, N. *et al.* Efficacy of sirolimus in the treatment of microcystic lymphatic malformation of the tongue. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 33, n. 9, p. 336-337, Sep. 2019.

GARZON, M. C. *et al.* Vascular malformations: part I. **J Am Acad Dermatol**, v. 56, n. 3, p. 353-370, Mar. 2007.

GLASER, K. *et al.* Linkage of metabolic defects to activated PIK3CA alleles in endothelial cells derived from lymphatic malformation. **Lymphat Res Biol**, v. 16, n. 1, p. 43-55, Feb. 2018.

GRAUPERA, M. *et al.* Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. **Nature**, v. 453, n. 7195, p. 662-666, May. 2008.

GUPTA, S., AHUJA, P., REHANI, U., SINGH, V. Lymphangioma of cheek region – an unusual presentation. **J Oral Biol Craniofac Res**, v. 1, n. 1, p. 47-49, Oct. 2011.

HOCHMAN, M., ADAMS, D. M., REEVES, T. D. Current knowledge and management of vascular anomalies, II: malformations. **Arch Facial Plast Surg**, v. 13, n. 6, p. 425-433, Nov. 2011.

ISSVA. International Society for the study of vascular anomalies. Classification of 2014, reviewed in 2018. Acesso em: 14 de Maio de 2021 <www.issva.org/classification>

JIANG, B. H., LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 150-158, Jan. 2008.

JIANG B. H., LIU, L. Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. **Advances in Cancer Research**, v. 102, n. 9, p. 16-65, Jan. 2009.

JOSHI, P. S., HONGAL, B., SANADI, A. Cystic lymphangioma: a differential diagnosis. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 19, n. 1, p. 393-395, Oct. 2015.

KEPPLER-NOREUIL, K. M., *et al.* Clinical delineation and natural history of the PIK3CA-related overgrowth spectrum. **Am J Med Genet A**, v. 16A, n. 7, p. 1713-1733, Jun. 2014.

KEPPLER-NOREUIL, K. M., *et al.* PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. **Am J Med Genet A**, v. 167, n. 2, p. 287-295, Jan. 2015.

KIM, T, *et al.* Alterations of the MEK/ERK, BMP, and Wnt/ β -catenin pathways detected in the blood of individuals with lymphatic malformations. **Plos One**, v. 14, n. 4, p. 1-13, Apr. 2019.

KIRKHAM, E. M., EDWARDS, T. C., WEAVER, E. M., BALAKRISHNAN, K., PERKINS, J. A. The lymphatic malformation function (LMF) instrument. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 153, n. 4, p. 656-662, May. 2015.

KOBIALKA, P., GRAUPERA, M. Revisiting PI3-kinase signalling in angiogenesis. **Vasc Biol**, v. 1, n. 1, p. 125-134, Nov. 2019.

KOLAY, S. K., PARWANI, R., WANJARI, S., SINGHAL, P. Oral lymphangiomas – clinical and histopathological relations: Na immunohistochemically analysed case series of varied clinical presentations. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 22, n. 1, p. 108-111, Dec. 2017.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci**. Basel, v.65, n. 22, p. 3525-3544, Nov. 2008.

KUREK, K. C., *et al.* Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. **Am J Hum Genet**, v. 90, n. 6, p. 1108-1115, Jun. 2012.

LAVOIE, H., GAGNON, J., THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 10, p. 607-632, Oct. 2020.

LAWRENCE, M. S., *et al.* Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. **Nature**, v. 505, n. 1, p. 495–501, Jan. 2014.

LE CRAS T. D., *et al.* Constitutively active PIK3CA mutations are expressed by lymphatic and vascular endothelial cells in capillary lymphatic venous malformation. **Angiogenesis**, v. 23, n. 3, p. 425-442, Apr. 2020.

LEE, J. H., *et al.* De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. **Nat Genet**, v. 44, n. 8, p. 941-945, Jun. 2012.

LIAO, S., PADERA, T. P. Lymphatic function and immune regulation in health and disease. **Lymphat Res Biol**, v. 11, n. 3, p. 136-143, Sep. 2013.

LINDHURST, M. J., *et al.* Mosaic overgrowth with fibroadipose hyperplasia is caused by somatic activating mutations in PIK3CA. **Nat Genet**, v. 44, n. 8, p. 928-933, Jun. 2012.

LIU, N. F., LU, Q., YAN, Z. X. Lymphatic malformation is a common component of Klippel-Trénaunay syndrome. **J Vasc Surg**, v. 52, n. 6, p. 1557-1563, Dec. 2010.

LUKS VL, *et al.* Lymphatic and other vascular malformative/overgrowth disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. **J Pediatr**, v. 166, n. 4, p. 1048-1054, Apr. 2015.

MENDOZA, M. C., ER, E. E., BLENIS, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends Biochem Sci**, v. 36, n. 6, p. 320-328, Jun. 2011.

MOTAHHARY, P., SARRAFPOUR, B., ABDIRAD, A. Bilateral symmetrical lymphangiomas of the gingiva: Case report. **Diagn Pathol**, v. 1, n. 1, p. 9, May., 2006.

NATHAN, N. *et al.* Mosaic disorders of the PI3K/PTEN/AKT/TSC/mTORC1 signaling pathway. **Dermatol Clin**, v. 35, n. 1, p. 51-60, Jan. 2017.

NGUYEN, H. L., BOON, L. M., VIKKULA, M. Vascular anomalies caused by abnormal signaling within endothelial cells: targets for novel therapies. **Semin Intervent Radiol**, v. 34, n. 3, p. 233-238, Sep. 2017.

NIBA, E. *et al.* Crosstalk between PI3kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor. **Cel Phys Biochem**, v. 31, n. 6, p. 905-913, May, 2013.

ORDÓÑEZ, N. G. Immunohistochemical endothelial markers: a review. **Adv Anat Pathol**, v. 19, n. 5, p. 281-295, Sep. 2012.

OSBORN, A. J. *et al.* Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. **Hum Mol Genet**, v. 24, n. 4, p. 926-938, Feb. 2015.

PARK, S., *et al.* A child with lymphangioma due to somatic mutation in *PIK3CA* successfully treated with everolimus. **Ped Neurol**, v. 1, n. 1, p. 1-3, Oct. 2018.

PERKINS, J. A., *et al.* Lymphatic malformations: current cellular and clinical investigations. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 142, n. 6, p. 789-794, Jun. 2010.

PERKINS, J. A. New frontiers in our understanding of lymphatic malformations of the head and neck: natural history and basic research. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 51, n. 1, p. 147-158, Feb. 2018.

PETROVA, T. V., KOH, G. Y. Biological functions of lymphatic vessels. **Science**, v. 369, n. 157, Jul. 2020.

PIACITELLI, A. M. *et al.* Characterization of a severe case of PIK3CA-related overgrowth at autopsy by droplet digital polymerase chain reaction and report of PIK3CA sequencing in 22 patients. **Am J Med Genet A**, v. 176, n. 11, p. 2301-2308, Nov. 2018.

PORTA, C., PAGLINO, C., MOSCA, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Front Oncol**, v. 4, n. 1, p. 64, Apr. 2014.

RIVIÈRE, J. B., *et al.* De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA causes spectrum of related megalencephaly syndromes. **Nat Genet**, v. 44, n. 8, p. 934-940, Jun. 2012.

RODRIGUEZ-LAGUNA, L. R., *et al.* Somatic activating mutations in *PIK3CA* cause generalized lymphatic anomaly. **J Exper Med**, v. 216, n. 2, p. 407-418, Feb. 2018.

RODRIGUEZ-LAGUNA, L. R. *et al.* CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype. **Genet Med**, v. 20, n. 8, p. 882-889, Aug. 2018.

SABIN, F. R. The lymphatic system in human embryos, with a consideration of the morphology of the system as a whole. **American J of Anatomy**, v. 9, n. 1, p. 43-91, 1909.

SAMATAR, A. A., POULIKAKOS, P. I. Targeting RAS-ERK signaling in cancer: promises and challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 12, p. 928-942, Dec. 2014.

SAMUELS, Y., *et al.* High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 554, Apr. 2004.

SEMO, J., NICENBOIM, J., YANIV, K. Development of the lymphatic system: new questions and paradigms. **Development**, v. 143, n.1, p. 924-935, Jan. 2016.

SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. **Biochim Biophys Acta**. Amsterdam, v. 1773, n. 8, p. 1213-1226, Aug. 2007.

SHUMAKER, P. R., ROSA, K. M. D., KRAKOWSKI, A. C. Treatment of lymphangioma circumscriptum using fractional carbon dioxide laser ablation. **Pediatr Dermatol**, v. 30, n. 5, p. 584-586, Sep. 2013.

STANESCU, L, *et al.* Lymphangioma of the oral cavity. **Rom J Morphol Embryol**, v. 47, n. 4, p. 373-377, Jan. 2006.

STEINER, J. E., DROLET, B. A. Classification of vascular anomalies: an update. **Semin Intervent Radiol**, v. 34, n. 3, p. 225-232, Sep. 2017.

SUNIL, S., GOPAKUMAR, D., SREENIVASAN, B. S. Oral lymphangioma – case reports and review of literature. **Contemp Clin Dent**, v. 3, n. 1, p. 116-118, Mar., 2012.

USHA, V. *et al.* Lymphangioma of the tongue – A case report and review of literature. **J Clin Diagn Res**, v. 8, n. 9, p. 12-14, Sep. 2014.

VAHIDNEZHAD, H., YOUSSEFIAN, L., UITTO, J. Klippel-Trenaunay syndrome belongs to the PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). **Exp Dermatol**, v. 25, n. 1, p. 17-19, Jan. 2016.

VAN DAMME, A. *et al.* New and emerging targeted therapies for vascular malformations. **Am J Clin Dermatol**, v. 21, n. 5, p. 657-668, Oct. 2020.

VANHAESEBROECK, B., STEPHENS, L., HAWKINS, P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nature reviews**, v. 13, n. 1, p. 195-203, Mar. 2012.

VIGNOT, S. FAIVRE, S., AGUIRRE, D. RAYMOND, E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. **Ann Oncol**, v. 16, n. 4, p. 525-537, Apr. 2005.

WASSEF, M. *et al.* Vascular anomalies classification: recommendations from the international society for the study of vascular anomalies. **Pediatrics**, v. 136, n. 1, p. 203-214, Jul. 2015.

WERNER, J. A., DUNNE, A. A., MYERS, J. N. Functional anatomy of the lymphatic drainage system of the upper aerodigestive tract and its role in metastasis of squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 25, n. 4, p. 322-332, Apr. 2003.

WIEGAND, S. WICHMANN, G., DIETZ, A. Treatment of lymphatic malformations with the mTOR inhibitor sirolimus: a systematic review. **Lymphat Res Biol**, v. 16, n. 4, p. 330-339, Aug. 2018.

YANG, J., *et al.* Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 26, p. 1-28, Feb. 2019.

YESIL, S. *et al.* Single-center experience with sirolimus therapy for vascular malformations. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 33, n. 3, p. 219-225, Apr. 2016.

YEUNG, K. S. *et al.* Somatic PIK3CA mutations in seven patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum. **Am J Med Genet A**, v. 173, n. 4, p. 978-984, Apr. 2017.

YOON, S.; SEGER, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**. New York, v. 24, n. 1, p. 21-44, Mar. 2006.

YUAN, T. L., CANTLEY, L. C. PI3K pathway alterations in cancer: variation on a theme. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p.5497-5510, Sep. 2008.

ZAWIEJA, D. Lymphatic biology and the microcirculation: past, present and future. **Microcirculation**, v. 12, n. 1, p. 141-150, Jan. 2005.

ZENNER, K. *et al.* Genotype correlates with clinical severity in PIK3CA-associated lymphatic malformations. **JCI Insight**, v. 4, n. 21, p. 1-14, Nov. 2019.

ZHANG, B, MA, L. Update classification and therapy of vascular malformations in pediatric patients. **Pediatr Investig**, v. 2, n.2, p. 119-123, Jun. 2018.

ZHAO, L., VOGT, P. K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. **Oncogene**, v. 27, n. 41, p. 5486-5496, Sep. 2008.

ZHAO, L., VOGT, P. K. Hot-spot mutations in p110alpha of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K): differential interactions with the regulatory subunit p85 and with RAS. **Cell Cycle**, v. 9, n. 3, p. 596-600, Feb. 2010.

ZHOU, F. *et al.* Akt/protein kinase B is required for lymphatic network formation, remodeling and valve development. **Am J Pathol**, v. 177, n. 4, p. 2124-2133, Oct. 2010.

ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação pelo COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE PIK3CA EM LINFANGIOMAS ORAIS

Pesquisador: Carolina Cavalleri Gomes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30531120.4.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.082.465

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de mestrado que objetiva a extração de DNA de amostras coletadas de cirurgia de linfangiomas orais com objetivo de dectar perfil específico de individuo propenso. Utilizará repositório específico para a pesquisa. Atende as solicitações do último parecer.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar alterações moleculares em linfangiomas orais

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

riscos apresentados no TCLE: Este estudo não oferecerá riscos

além daqueles próprios da cirurgia que será submetido(a) e aqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa"

benefícios: "Esta pesquisa ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento dos

linfangiomas orais e isso será muito importante para que melhorar as condutas de tratamento da doença no futuro."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de Mestrado , apensado À plataforma , que utilizará biorepositório, cujo termo de constituição é apresentado. Apresenta documento de autorizacao laboratorio e a declaração de utilização das lâminas do acervo e o compromisso do pesquisador de utilizar o material biológico

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad 51 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31 270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@ppq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 4.082.465

apenas para esta

pesquisa. Há modificações na obtenção do consentimento, deve-se aplicar o Termo de Compromisso de Utilização da Dados e do material biológico do acervo das lâminas e blocos do acervo do laboratório foi anexado a plataforma. Foi anexado TLCE e Termo de assentimento para menores para casos a serem realizados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta lista de pendências respondidas

1. 2020_ProjetoMestrado_IsadoraGomes_Ateracao
2. TCLE_maiores_de_idade
3. TCLE_lâminaseblocos_maiores_de_idade
4. TCLE_lâminaseblocos_destinado_ aos_pais_de_menores_de_idade
5. TALE_lâminaseblocos
6. Termo_Constituição_Biorepositório_Isadora
7. TermoTCUD_Isadora
8. Carta_resposta_pendencias

Recomendações:

sem recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após a avaliação dos dados, SMJ, sou pela sua aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações BÁSICAS DO PROJETO_1521225.pdf	21/05/2020 03:18:21		Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl. 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3439-4592 E-mail: cep@cep.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Processo: 4.002.465

Outros	Carta_resposta_pendencias.pdf	21/05/2020 03:17:46	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_de_idade_1.pdf	21/05/2020 03:14:13	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores_de_idade.doc	21/05/2020 03:05:53	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2020_ProjetoMestrado_IsadoraGomes_Ateracao_1.pdf	21/05/2020 03:04:58	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_laminasebloco_maiores_de_idade.pdf	06/05/2020 20:32:18	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_laminasebloco_destinado_ao_pais_de_menores_de_idade.pdf	06/05/2020 20:32:07	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_laminasebloco.pdf	06/05/2020 20:31:55	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoTCUD_Isadora.pdf	06/05/2020 20:31:24	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termo_Constituicao_Biorepositório_Isadora.pdf	06/05/2020 20:30:38	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_destinado_ao_pais_de_menores_de_idade_linfangiomias_2.pdf	19/03/2020 13:09:18	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_doc_anexado_linfangiomias.pdf	19/03/2020 13:08:32	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Folha de Rosto	Folhadarostto_Isadora.pdf	09/03/2020 13:04:46	Carolina Cavalleri Gomes	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_laboratorio_Isadora.pdf	09/03/2020 13:03:45	Carolina Cavalleri Gomes	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad 51 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31) 3409-4592

E-mail: coep@ppq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.062.465

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorrepositório / Biobanco	Autorizacao_clinica_Isadora.pdf	09/03/2020 13:03:28	Carolina Cavalleri Gomes	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_CPGO_Isadora.pdf	09/03/2020 12:22:05	Carolina Cavalleri Gomes	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 10 de Junho de 2020

Assinado por:

Crissia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad 51 2025

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: cosp@corpq.ufmg.br

ANEXO B – Artigo submetido para publicação no periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*

Assessment of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways activation in oral lymphatic malformations

Isadora Pereira **Gomes**, DDS, MSc^a

Letícia Martins **Guimarães**, DDS, MSc^b

Thaís dos Santos Fontes **Pereira**, DDS, PhD^a

Núbia Pereira **Braga**, DDS, PhD^b

Manoela Domingues **Martins**, DDS, PhD^c

Ricardo Santiago **Gomez**, DDS, PhD^a

Carolina Cavalieri **Gomes***, DDS, PhD^b

^a Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, CEP 31270-901, Brazil

^b Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, CEP 31270-901, Brazil

^c Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, CEP 90035-003, Brazil

*Correspondence should be addressed to:

Dr. Carolina Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil. phone: +55 31 34092895; Email: gomes.carolinac@gmail.com carolinacgomes@ufmg.br

Disclosure: No conflict of interest is declared by the authors

Word count for the abstract: 125

Complete manuscript word count: 1488

Number of references: 27

Number of figures/tables: 3

ABSTRACT

Objective: Lymphatic malformations are characterized by the overgrowth of lymphatic vessels during development. Activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways occur in isolated lymphatic malformation and in those associated with syndromes such as CLOVES and Klippel-Trenaunay. We aimed to assess the activation of these pathways in sporadic oral lymphatic malformations. **Study Design:** A convenience sample of 14 formalin-fixed paraffin-embedded samples of oral lymphatic malformations underwent immunohistochemical reactions for the phosphorylated forms of AKT1 (pAKT-Ser473) and ERK1/2 (pERK1/2-Thr202/Tyr204), markers of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways activation, respectively. **Results:** Positive staining for pAKT1 and pERK1/2 was observed in the endothelial cells in all samples of oral lymphatic malformations evaluated. **Conclusion:** Our results suggest that PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways activation participate in the pathogenesis of oral lymphatic malformations.

INTRODUCTION

Lymphatic malformations, also known as lymphangiomas, are benign lesions originated from embryonic lymphatic sacs that failed to connect to the drainage system. Lymphatic malformations occur mostly in lymphatic rich areas, mainly in the head and neck (45-52%), but also in the axilla, and mediastinum (1–3). Lymphatic malformations are classified into three morphological subtypes: macrocystic, microcystic and combined. On the one hand, macrocystic lesions are large and are habitually located below the level of the mylohyoid muscle. On the other hand, microcystic lesions are smaller and usually found in the oral cavity. Combined lesions are characterized by the fusion of the other two subtypes (3).

Oral lymphatic malformations usually manifest as a translucent plaque with small thin-walled vesicles reminding frog eggs. These lesions more frequently occur in dorsum of the tongue but they can also occur in the lips, buccal mucosa, soft palate and floor of the mouth. (4) The pathogenesis of oral lymphatic malformations is poorly characterized.

Lymphatic malformations most often occur sporadically (isolated), but they can also occur in syndromes such as Klippel-Trenaunay Syndrome (OMIM #149000), CLOVES (Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular Malformations, Epidermal Nevis, Spinal/Skeletal Anomalies/Scoliosis) (OMIM #612918), and CLAPO Syndrome (Capillary vascular malformation of the lower lip, Lymphatic malformations of the head and neck, Asymmetry and Partial or generalized Overgrowth) (OMIM #613089) (5). Recently, somatic activating *PIK3CA* mutations have been reported in isolated and syndrome-associated lymphatic malformations (6). *PIK3CA*, encodes the PI3K catalytic subunit p100 α , and somatic activating mutations lead to the PI3K/AKT pathway signaling activation (6–9). Notably, the activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways play an important role in angiogenesis and have recently been reported in lymphatic malformations (10–14).

The PI3K/AKT and MAPK/ERK are compensatory pathways that mediate cell survival, proliferation, tumor growth, and angiogenesis. Cell surface receptors initiate the signaling processes, then signaling occurs through cytoplasmic kinases and other proteins, culminating with the control of gene expression in the nucleus (15–17). There are many mechanisms of crosstalk between PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways (18). Among these crosstalk mechanisms, there are cross-activation and pathways convergence on substrates, which are represented in **Figure 1**.

The molecular pathogenesis of oral lymphatic malformations remains unclear. Therefore, the present study aimed to assess the activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways in oral lymphatic malformations by the evaluation of the immunoexpression of the phosphorylated forms of ERK1/2 (pERK1/2) and AKT1 (pAKT1), markers of these pathways activation.

MATERIALS AND METHODS

Study design and ethical approval

This retrospective and cross-sectional study evaluated a convenience sample of 14 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens of sporadic oral lymphatic malformations. The specimens were obtained from the oral pathology service of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. This study was approved by the Research Ethics Committee (protocol number 30531120.4.0000.5149) and was accomplished in accordance with the Declaration of Helsinki.

Patients and Samples

The following data of the oral lymphatic malformations patients were obtained from the files: sex, age, and anatomical location. The histopathological diagnosis was confirmed by two oral pathologists (CCG and RSG) by reviewing the sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) retrieved from the files.

Immunohistochemistry

To assess PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways activation, 14 cases of oral lymphatic malformations were subjected to immunohistochemistry for pAKT1 and pERK1/2, following standard protocols. Briefly, tissues were sectioned (3 μ m) and placed on silanized slides (StarFrost, Knittel Glass, Germany). The slides were subsequently deparaffinized in xylene (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and hydrated in descending grades of ethanol (Merck). For antigen retrieval, citrate buffer (pH 6.0) solution (pAKT1) and TRIS-EDTA buffer solution (pH 8.0) (pERK1/2) heated to 90°C in a water bath for 30 minutes were used. Endogenous peroxidase was blocked with hydrogen peroxide/methanol in 1:1 proportion. The slides were then incubated with the primary antibodies: rabbit monoclonal anti-pAKT1 (1:200, s473; Abcam, EP2109Y) and rabbit monoclonal anti-pERK1/2 (1:100; Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology #4376) overnight at 4°C. The detection system used was EnVision (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). The reactions were revealed with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Novocastra, Newcastle, UK) and counter-stained with Mayer's hematoxylin. Negative controls were obtained by the omission of the primary antibody. The epithelium of oral mucosa served as internal controls for the immunohistochemical reactions.

Results interpretation

Three observers (IPG, RSG, and CCG) evaluated the results on a light microscope. The entire tissue sections were evaluated, and nuclear and cytoplasmic staining were considered as positive reaction, regardless of staining intensity. Slides were scanned using a Panoramic

MIDI Digital Slide Scanner (3DHISTECH), and the images were visualized and captured using Case Viewer v.2.3 (3DHISTECH).

RESULTS

Sample characterization

The mean age of the oral lymphatic malformations patients was 19 years (ranging from 6 to 72), the male/female ratio was 1:1, and the tongue was the most affected location. Available clinical information is shown in **Table I**.

Microscopically, all cases had lymphatic vessels with marked dilatation. The endothelial lining is thin, and the dilated spaces contain proteinaceous fluid and lymphocytes. Surrounding connective tissue stroma consists of loose fibrotic tissue with a few inflammatory cells (**Figure 2**).

Immunohistochemistry

The immunohistochemistry reactions for pERK1/2 and pAKT1 of all samples included in the study showed the same staining pattern, and positive staining was observed in endothelial cells. pERK1/2 showed nuclear immunoexpression, while pAKT1 immunostaining was mainly observed in the cytoplasm. pERK1/2 and pAKT1 immunostaining were also observed in epithelial cells of the lining mucosa in all cases (**Figure 2**).

DISCUSSION

Intracellular signaling pathways, such as PI3K/AKT and MAPK/ERK, are often activated by mutations, causing endothelial cell dysfunction. Mutations in such pathways have been reported in lymphatic malformations (6,8,19). There is no significant correlation between specific *PIK3CA* mutations, the macro- or micro-cystic phenotype, or clinical severity in lymphatic malformations (6). While the activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling

pathways has recently been reported in lymphatic malformations (10–14), the involvement of these signaling pathways specifically in oral lymphatic malformations has not been addressed yet. Therefore, we assessed the activation of MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways in oral lymphatic malformations by immunohistochemistry for the phosphorylated forms of ERK1/2 and AKT1. The immunohistochemistry staining for both pERK1/2 and pAKT1 showed positivity of lymphatic endothelial cells in all samples.

The activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK observed in oral lymphatic malformations in the present study was similar to that observed in isolated and syndrome-associated lymphatic malformations harboring *PIK3CA* mutations (12–14). In previous studies, lymphatic endothelial cells from lymphatic malformations demonstrated increased proliferation and expression of pAKT and pERK compared with normal human dermal lymphatic cells, depicting their highly activated angiogenic state (12–14). PI3K signal transduction via the AKT and mTOR kinases has been well documented in tumor growth process and angiogenesis (20), and for lymphatic development in mice (21). ERK phosphorylation has also been shown to be a marker for angiogenic endothelial cells (14). MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways are closely related to each other due to activation by similar extracellular signals and the crosstalk between them (18). Interactions between these pathways are shown in **Figure 1**, and such crosstalk is in agreement with the simultaneous activation of MAPK/ERK and PI3K/AKT in our samples.

Oral lymphatic malformations may not regress or disappear spontaneously (22). However, complications such as tongue's extrusion, obstruction of upper airways and difficulties in chewing and speech can occur depending on their location (4). Although the most conventional treatments are sclerotherapy for macrocystic lymphatic malformations and surgical resection for microcystic lymphatic malformations, the lesions often recur after

treatment (13,23). Additionally, depending on the location of the lesions, surgical treatment may be challenging (4).

It is well known that activating mutations in components of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways occur in several human cancers, and targeted molecular inhibitors of these pathways have been developed to improve treatment of these tumors (24,25). Following the discovery of the pathogenic involvement of these same pathways in vascular malformations, targeted therapies also started to emerge in this context (19). Sirolimus (a mTOR inhibitor) is the most well studied drug in lymphatic malformations (26,27). In addition, inhibitors of *PIK3CA* (Ly294002, Wortmannin) and of mTOR (Rapamycin) have been tested *in vitro*, showing encouraging results in lymphatic endothelial cells from lymphatic malformations (13,14). The activation of both PI3K/AKT and MAPK/ERK in oral lymphatic malformation observed in the present study reveals these pathways play a role in the pathogenesis of these oral lesions. Our results can be the basis for further studies investigating oral lymphatic malformations molecular pathogenesis and targeted therapies as a step preceding surgical removal in challenging cases.

In conclusion, we report activation of PI3K/AKT and MAPK/ERK signaling pathways in endothelial cells of oral lymphatic malformations. Our results suggest that the activation of such signaling pathways plays a role in the pathogenesis of oral lymphatic malformations.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher-Level Education Personnel (CAPES)/Brazil, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil and The National Council of Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil. IPG. receives a FAPEMIG scholarship and LMG. receives a CAPES

scholarship. RSG. and CCG. are research fellows at CNPq. The authors thank the Image Acquisition and Processing Center (CAPI- ICB/UFMG) for the slide scanning service.

REFERENCES

1. Wassef M, Blei F, Adams D, Alomari A, Baselga E, Berenstein A, et al. Vascular anomalies classification: Recommendations from the international society for the study of vascular anomalies. *Pediatrics*. 2015;136(1):e203–14.
2. Elluru RG, Balakrishnan K, Padua HM. Lymphatic malformations: Diagnosis and management. *Semin Pediatr Surg*. 2014;23(4):178–85.
3. Steiner JE, Drolet BA. Classification of Vascular Anomalies: An Update. *Semin Intervent Radiol*. 2017;34(3):225–32.
4. Kolay SK, Parwani R, Wanjari S, Singhal P. Oral lymphangiomas - clinical and histopathological relations: an immunohistochemically analyzed case series of varied clinical presentations. *J oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(1):108–11.
5. ISSVA. Classification of vascular anomalies. 2018. Accessed on 30th April 2021 <www.issva.org/classification>
6. Luks VL, Kamitaki N, Vivero MP, Uller W, Rav R, Bovée JVMG, et al. Lymphatic and other vascular malformative disorders are caused by somatic mutations in PIK3CA. *Pediatrics*. 2015;166(4):1048–54.
7. Kurek KC, Luks VL, Ayturk UM, Alomari AI, Fishman SJ, Spencer SA, et al. Somatic mosaic activating mutations in PIK3CA cause CLOVES syndrome. *Am J Hum Genet*. 2012;90(6):1108–15.

8. Rodriguez-Laguna L, Agra N, Ibañez K, Oliva-Molina G, Gordo G, Khurana N, et al. Somatic activating mutations in PIK3CA cause generalized lymphatic anomaly. *J Exp Med*. 2018;216(2):407–18.
9. Rodriguez-Laguna L, Ibañez K, Gordo G, Garcia-Minaur S, Santos-Simarro F, Agra N, et al. CLAPO syndrome: identification of somatic activating PIK3CA mutations and delineation of the natural history and phenotype. *Genet Med*. 2018;20(8):882–9.
10. Kim T, Tafoya E, Chelliah MP, Lekwuttikarn R, Li J, Sarin KY, et al. Alterations of the MEK/ERK, BMP, and Wnt/ β -catenin pathways detected in the blood of individuals with lymphatic malformations. *PLoS One*. 2019;14(4):e0213872.
11. Glaser K, Dickie P, Neilson D, Osborn A, Dickie BH. Linkage of metabolic defects to activated PIK3CA alleles in endothelial cells derived from lymphatic malformation. *Lymphat Res Biol*. 2018;16(1):43–55.
12. Osborn AJ, Dickie P, Neilson DE, Glaser K, Lynch KA, Gupta A, et al. Activating PIK3CA alleles and lymphangiogenic phenotype of lymphatic endothelial cells isolated from lymphatic malformations. *Hum Mol Genet*. 2015;24(4):926–38.
13. Boscolo E, Coma S, Luks VL, Greene AK, Klagsbrun M, Warman ML, et al. AKT hyper-phosphorylation associated with PI3K mutations in lymphatic endothelial cells from a patient with lymphatic malformation. *Angiogenesis*. 2015;18(2):151–62.
14. Blesinger H, Kaulfuß S, Aung T, Schwoch S, Prantl L, Rößler J, et al. PIK3CA mutations are specifically localized to lymphatic endothelial cells of lymphatic malformations. *PLoS One*. 2018;13(7):1–18.
15. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: The path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(3):195–203.

16. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(10):607–32.
17. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst.* 2015;11(7):1946–54.
18. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(6):320–8.
19. Nguyen HL, Boon LM, Vikkula M. Vascular Anomalies Caused by Abnormal Signaling within Endothelial Cells: Targets for Novel Therapies. *Semin Intervent Radiol.* 2017;34(3):233–8.
20. Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2008;1784(1):150–8.
21. Zhou F, Chang Z, Zhang L, Hong YK, Shen B, Wang B, et al. Akt/protein kinase B is required for lymphatic network formation, remodeling, and valve development. *Am J Pathol.* 2010;177(4):2124–33.
22. Van Damme A, Seront E, Dekeuleneer V, Boon LM, Vikkula M. New and Emerging Targeted Therapies for Vascular Malformations. *Am J Clin Dermatol.* 2020;21(5):657–68.
23. Zhang B, Ma L. Updated classification and therapy of vascular malformations in pediatric patients. *Pediatr Investig.* 2018;2(2):119–23.
24. Yang J, Nie J, Ma X, Wei Y, Peng Y, Wei X. Targeting PI3K in cancer: Mechanisms and advances in clinical trials. *Mol Cancer.* 2019;18(1):1–28.
25. Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: Promises and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(12):928–42.

26. Adams DM. Efficacy and safety of sirolimus in the treatment of complicated vascular anomalies. *Pediatrics*. 2016;137(2):31e20153257.
27. Yesil S, Tanyildiz HG, Bozkurt C, Cakmakci E, Sahin G. Single-center experience with sirolimus therapy for vascular malformations. *Pediatr Hematol Oncol*. 2016;33(3):219–25.

Table I: Clinical data of the 13 cases of oral lymphatic malformations included in the study

SAMPLE #	AGE (years)	SEX	LOCATION
1	11	M	Buccal mucosa
2	26	M	Alveolar ridge
3	34	F	Buccal mucosa
4	35	F	Tongue (ventral side)
5	6	M	Tongue dorsum
6	23	F	Tongue dorsum
7	7	M	Tongue dorsum
8	10	F	Tongue dorsum
9	8	M	Soft palate
10	12	F	Tongue (ventral side)
11	72	F	Right lateral tongue
12	8	M	Palatoglossal arch
13	8	M	Palatoglossal arch
14	7	F	Tongue dorsum

Abbreviations: F, female; M, male.

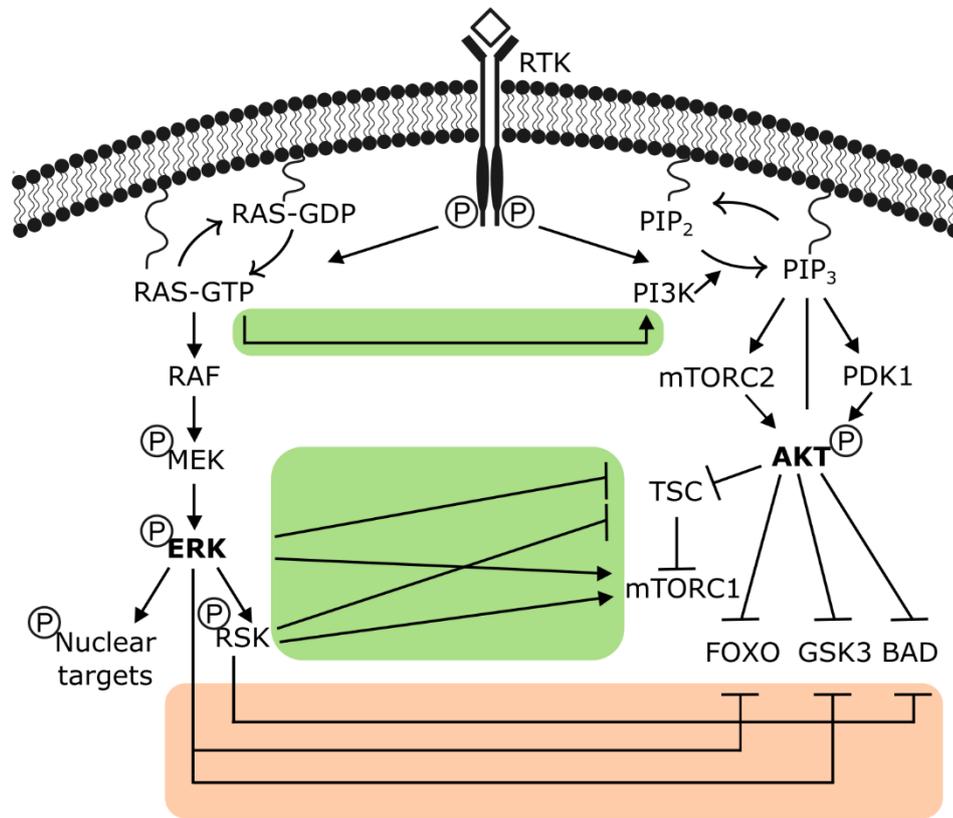


FIGURE LEGENDS

Figure 1. Crosstalk between MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways. Interactions between external signals (e.g. growth factors) and receptor tyrosine kinases (RTKs) can activate both pathways. In MAPK/ERK, the activated RAS-GTP interacts and activates RAF, which phosphorylates and activates MEK, which activates ERK by phosphorylation. ERK then phosphorylates a variety of nuclear and cytoplasmic target proteins. In PI3K/AKT, the external signal stimulates the phosphorylation of PIP₂ by PI3K, converting it into PIP₃. AKT is recruited to the plasma membrane by binding to PIP₃ and is then activated due to phosphorylation by PDK1 and mTORC2 that also bind PIP₃. AKT then inhibits TSC leading to activation of mTORC1, since TSC inhibits mTORC1. AKT leads to cell proliferation and cell survival by inhibiting FOXO, GSK3, and BAD, since these proteins inhibit cell proliferation or induce cell death. Therefore, both MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways play important roles in cell survival, proliferation, and growth. Such pathways interact through both cross-activation (green

rectangles) and pathway convergence (red rectangles). Cross-activation includes activation of PI3K by RAS, inhibition of TSC by ERK and RSK, which also activate mTORC1. In these cases, members of MAPK/ERK pathway regulate upstream components of PI3K/AKT pathway, increasing its activity. In addition, both MAPK/ERK and PI3K/AKT can act directly on the same downstream targets such as FOXO, GSK3, and BAD negatively regulating their functions, characterizing pathway convergence. Although we have focused on interactions through which both pathways act in the same direction, there are other mechanisms of pathway cross-talk such as cross-inhibition and negative feedback loop (18).

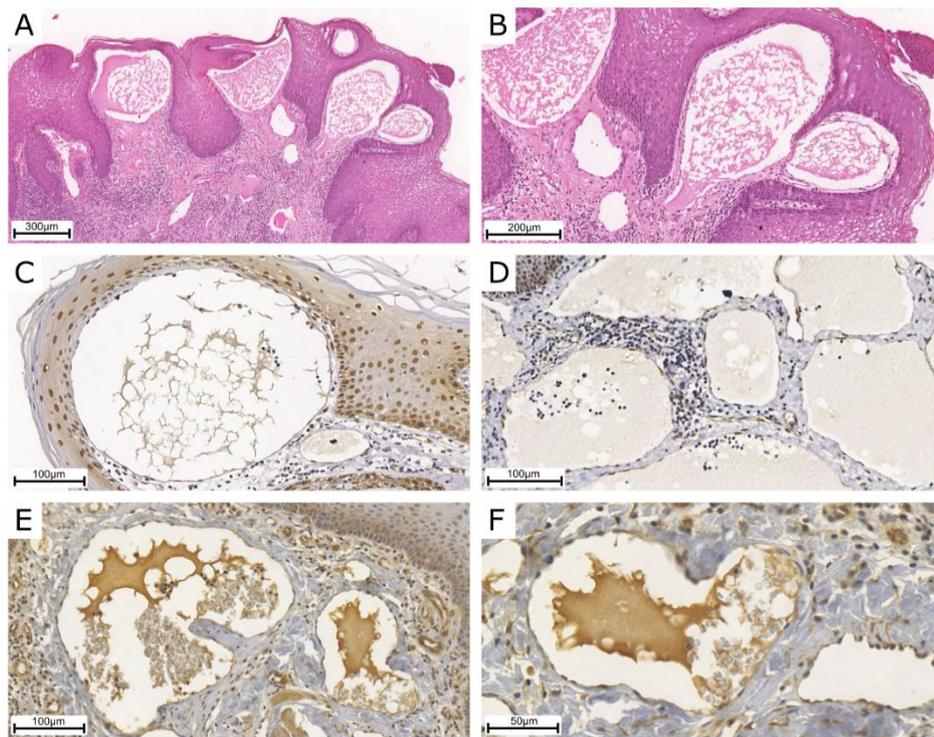


Figure 2. Histopathological features and immunohistochemical expression of pERK1/2 and pAKT1 in oral lymphatic malformations samples. (A, B) Oral lymphatic malformations are characterized by numerous single endothelial lined vessels of variable sizes from subepithelial region till the depth of tissue with lymphatic spaces containing proteinaceous material and occasional inflammatory cells such as lymphocytes; H&E staining (A: original magnification 50x; scale bar 300 μ m. B: original magnification 100x; scale bar 200 μ m). (C, D) Lymphatic endothelial cells showed marked nuclear pERK1 immunoreactivity (original magnification 200x; scale bar 100 μ m). (E, F) Positive cytoplasmic immunoreactivity of pAKT1 was observed in the lymphatic endothelial cells. Positive nuclear immunoreactivity was also detected in focal areas (E: original magnification 200x; scale bar 100 μ m. F: original magnification 400x; scale bar 50 μ m). (C, E) Oral mucosa immunoreactivity served as positive internal control for the reactions.