

FILIPPE JAEGER DE OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DO EGF NA SALIVA E EM
LESÕES DE PACIENTES COM LEUCOPLASIAS
BUCAIS: ESTUDO CASO-CONTROLE**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2014

FILIPPE JAEGER DE OLIVEIRA

**QUANTIFICAÇÃO DO EGF NA SALIVA E EM
LESÕES DE PACIENTES COM LEUCOPLASIAS
BUCAIS: ESTUDO CASO-CONTROLE**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Estomatologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cássia
Ferreira de Aguiar

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

048q
2014
T

Oliveira, Filipe Jaeger de.
Quantificação do EGF na saliva e em lesões de pacientes com leucoplasias bucais: estudo caso controle / Filipe Jaeger de Oliveira. – 2014.

74 f. : il.

Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Gerais, Faculdade de Odontologia.

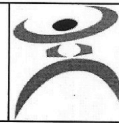
1. Leucoplasia bucal. 2. Saliva. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III Título.

BLACK – D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

**QUANTIFICAÇÃO DO EGF NA SALIVA E EM LESÕES DE
PACIENTES COM LEUCOPLASIAS BUCAIS: ESTUDO CASO-
CONTROLE**

FILIPE JAEGER DE OLIVEIRA

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

Aprovada em 15 de julho de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Tarcilia Aparecida da Silva
UFMG

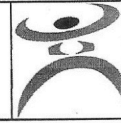
Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Belo Horizonte, 15 de julho de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO FILIPE JAEGER DE OLIVEIRA

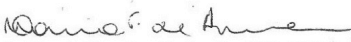
Realizou-se, no dia 15 de julho de 2014, às 08:00 horas, 3418, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *QUANTIFICAÇÃO DO EGF NA SALIVA E EM LESÕES DE PACIENTES COM LEUCOPLASIAS BUCAIS: ESTUDO CASO-CONTROLE*, apresentada por FILIPE JAEGER DE OLIVEIRA, número de registro 2012732946, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Tarcilia Aparecida da Silva (UFMG), Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais).


A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 15 de julho de 2014.


Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar (Doutora)


Prof(a). Tarcilia Aparecida da Silva (Doutor)


Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Doutor)

AGRADECIMENTOS

*Agradeço aos **meus pais** pelo dom da vida, por me ensinarem a vivê-la com dignidade, pelo amor incondicional e por renunciarem seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Ao meu grande irmão **Sebá**, pela amizade, companheirismo e pelas alegrias da vida. À **Manú** pelo carinho e presença constante.*

*Aos meus queridos e amados avós (**Anita, Adma e Geraldo**) por serem verdadeiros pilares, sinônimos de sabedoria e perseverança. Aos tios, tias, primos e primas pelos momentos familiares agradáveis.*

*À **Babi** por acreditar, incentivar e ser meu braço direito durante toda essa trajetória. A toda sua família (**João, Ana, Leleco e Pipi**) pelos anos de convivência, amizade e valores ensinados.*

*À minha orientadora **Maria Cássia**, pela confiança e pelo tempo dedicado à minha formação ética, pessoal e profissional. Aos professores **Marcelo Drummond Naves, Ricardo Alves de Mesquita e Maria Auxiliadora Vieira do Carmo** pelos ensinamentos e exemplos de docência.*

*Ao **Celso Queiroz-Júnior, Vanessa Bernardes, Patrícia Caldeira e Ana Carla Assunção** pela ajuda constante durante todas as etapas da pesquisa. Com vocês todas as dificuldades foram facilmente superadas.*

*Aos mestres da PUC Minas que despertaram o meu interesse pela área e pela vida acadêmica: **Paulo Alencar, Martinho Campolina, Rosana Leal, Franca Jeunon, Ana Maria Abras, Belini Freire Maia, João Batista de Freitas, Márcio Bruno Amaral, Leandro Napier e Carlos Henrique Bettoni**.*

*A todos meus amigos, que sempre entenderam os momentos de ausência, em especial: **Rodrigo Andrade, Lucas Conde, Rodrigo López, Rodrigo Del Debbio, Gustavo Pardini e Ricardo Drummond**. Obrigado pela torcida e por vibrarem comigo a cada vitória.*

*Aos colegas de mestrado que compartilharam as angústias, ansiedades e tornaram essa caminhada mais prazerosa: **Bernardo Dutra, Sérgio Antonucci, Maíza Vieira, Thais Pereira, Wilson Bambirra e Carolina Santa Rosa.** Aos colegas de doutorado **Maurício Castro e Carlos Eduardo** por mostrarem as portas e me ensinarem a abri-las.*

*A todos os colegas da **CTBMF** que contribuíram na minha formação como cirurgião, em especial à equipe do Hospital João XXIII e Maria Amélia Lins: **Gustavo Libânio, Sebastião Cristian Bueno e Roger Lanes.***

*Aos grandes amigos **Lucas Cardinal e Bruno Benevenuto** pelos auxílios e por se tornarem exemplos a serem seguidos.*

*À **FAPEMIG** pelo apoio financeiro.*

A todas as pessoas que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigado.

*Deus nos concedê, a cada dia, uma página
de vida nova no livro do tempo. Aquilo que
colocarmos nela, corre por nossa conta.*

Chico Xavier

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa obteve o apoio financeiro da agência FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) nas modalidades bolsa de mestrado e produtividade em pesquisa (CDS - PPM-00221-13).

PREFÁCIO

Esta dissertação é resultado de uma pesquisa desenvolvida na clínica de Semiologia/Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG), no serviço de Estomatologia do Hospital Municipal Odilon Behrens e no Laboratório de Patologia Bucal da FOUFMG, coordenada pela Professora Doutora Maria Cássia Ferreira de Aguiar, com a cooperação dos pesquisadores Ana Carla Assunção (iniciação científica), Patrícia Carlos Caldeira (Doutorado), Celso Martins Queiroz-Júnior (Pós-doutorado) e Vanessa Fátima Bernardes (Pós-doutorado). Este trabalho está estruturado e dividido nas seguintes partes:

- Resumo e abstract;
- Breve introdução e revisão de literatura, abordando temas relevantes descritos na literatura;
- Objetivo geral e objetivos específicos;
- Metodologia, onde são descritos todos os processos de obtenção dos dados;
- Resultados;
- Discussão;
- Conclusões;
- Referências;
- Anexos e apêndices.

RESUMO

A Leucoplasia bucal (LB) é a principal desordem potencialmente maligna, definida como placa ou mancha branca de risco questionável, que não pode ser diagnosticada clinicamente ou patologicamente como nenhuma outra doença. Diversos fatores como a localização das lesões, hábito tabagista e atipia histológica têm sido associados ao potencial de transformação maligna dessas lesões. O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo de 53 aminoácidos, originalmente isolado de glândulas salivares de camundongos. Algumas evidências indicam que o EGF seja um fator protetor contra agressões aos tecidos. Estudos prévios, demonstraram que os níveis salivares de EGF estão reduzidos em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis salivares de EGF em pacientes com LB e comparar com indivíduos clinicamente saudáveis. Adicionalmente, a expressão tecidual de EGF e do seu receptor (EGFR) foram avaliadas nas lesões através de imunistoquímica e os aspectos clinicopatológicos foram comparados com os níveis salivares de EGF e a imunexpressão no tecido. Os dados foram analisados nos softwares SPSS 21.0 e GraphPad Prism 5 (nível de significância $p < 0,05$). Os níveis salivares de EGF foram dosados na saliva de 32 pacientes casos e 32 pacientes controles, através do ELISA. Observou-se que os níveis salivares de EGF foram menores em pacientes com LB em comparação com o grupo controle, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Não houve associação entre os níveis salivares e expressão imunistoquímica de EGF. Forte imunexpressão do EGF foi associada à lesões múltiplas. Foi observado uma tendência de

lesões localizadas em regiões de alto risco apresentarem marcação imunoistoquímica positiva para o EGF. O presente estudo conclui que não há diferença entre os níveis salivares de EGF entre os indivíduos com LB e indivíduos clinicamente saudáveis. Novos estudos são necessários para elucidar o papel do EGF na progressão do câncer de boca.

Palavras-chave: Leucoplasia bucal, saliva, EGF, EGFR, ELISA, imunoistoquímica.

ABSTRACT

EGF in saliva and tissue samples of oral leukoplakia: a case-control study

Oral leukoplakia (OL) is the main potentially malignant disorder, defined as a white patch or plaque of questionable risk that can not be diagnosed clinically or pathologically as any other disease. Several factors such as the location of the lesions, smoking habits, and histologic atypia have been associated with the malignant transformation of these lesions. The epidermal growth factor (EGF) is a polypeptide of 53 amino acids, originally isolated from the salivary glands of mice. Some evidences indicates that EGF is a protective factor against tissue injuries. Previous studies have demonstrated that salivary EGF levels are reduced in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC). Therefore, the aim of this study was to assess the salivary levels of EGF in patients with OL and compare with clinically healthy individuals. Additionally, the tissue expression of EGF and its receptor (EGFR) were evaluated by immunohistochemistry and clinicopathologic aspects were compared with those of EGF and salivary levels in tissue immunostaining. Data were analyzed in SPSS 21.0 and GraphPad Prism 5 (significance level $p < 0.05$). Salivary EGF levels were measured in the saliva of 32 case and control patients, using ELISA. It was found that EGF salivary levels were lower in patients with OL compared to the control group, although the difference was not statistically significant. There was no association between salivary levels and immunohistochemical expression of EGF. Strong immunoreactivity of EGF was associated with

multiple lesions. It was observed a tendency of lesions located in high risk shows positive imunoexpression of EGF. This study concludes that there is no difference of salivary EGF levels between patients and controls. Further studies are needed to elucidate the role of EGF in the progression of oral cancer.

Keywords: Oral leukoplakia, saliva, EGF, EGFR, ELISA, immunohistochemistry.

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micrômetro
°C	Graus célsius
CA	<i>California</i>
CCEB	Carcinoma de células escamosas de boca
cm	Centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Pesquisa de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	<i>Diaminobenzidine</i> (diaminobenzidina)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> Fator de crescimento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FOUFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HE	Hematoxilina-eosina
HMOB	Hospital Municipal Odilon Behrens

HRP	<i>Enzyme horseradish peroxidase</i>
LB	Leucoplasia bucal
LBs	Leucoplasias bucais
LSAB	<i>Labelled streptavidin biotin</i> (sistema de detecção imunoistoquímica)
mg/ml	Miligrama por mililitro
Minn	<i>Minneapolis</i>
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MO	<i>Missouri</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaPO4	Fosfato de sódio
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	o-fenilenodiamina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pg/ml	Picograma por mililitro
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
rpm	Rotações por minuto
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TRIS-HCL	Hidroximetil amino metano - ácido clorídrico

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

USA

United States of America

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos primários, fabricantes, soluções para recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, diluição, incubação e sistemas de detecção.....	34
Tabela 2 - Avaliação imunoistoquímica da proteína EGFR.....	35
Tabela 3 - Características clinicopatológicas do grupo com leucoplasia bucal.....	38
Tabela 4 - Associação dos aspectos clinicopatológicos e os níveis salivares de EGF.....	40
Tabela 5 - Níveis de EGF nos grupos caso e controle.....	41
Tabela 6 - Frequências de imunexpressão do EGF e EGFR nas amostras de leucoplasia bucal.....	41
Tabela 7 - Marcação nuclear de EGF nas amostras de leucoplasia bucal.....	42
Tabela 8 - Associação dos aspectos clinicopatológicos e imunexpressão de EGF.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Níveis salivares de EGF no grupo caso e controle.....	39
Figura 2 – Imunoexpressão da proteína EGF no epitélio das leucoplasias.....	42
Figura 3 – Imunoexpressão da proteína EGFR no epitélio das leucoplasias...	44

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
REVISÃO DE LITERATURA.....	23
Leucoplasia bucal.....	23
Fator de crescimento epidérmico – EGF.....	24
JUSTIFICATIVA.....	27
OBJETIVOS.....	28
Objetivo geral.....	28
Objetivos específicos.....	28
METODOLOGIA.....	29
Pareamento dos indivíduos para a coleta de saliva.....	30
Coleta e processamento da saliva.....	31
Protocolo da técnica de ELISA.....	31
Protocolo da técnica de imunistoquímica.....	33
Análise da marcação imunistoquímica.....	35
Análise estatística.....	36
RESULTADOS.....	37
Características clínicas e histopatológicas.....	37
Análises clinicopatológicas.....	38
Níveis salivares de EGF entre o grupo caso e controle.....	39
Níveis salivares de EGF e variáveis clinicopatológicas.....	40
Imunolocalização de EGF e EGFR.....	41
EGF.....	41
EGFR.....	43
DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	66
Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	66
Anexo 2 – Dados individuais dos pacientes com Leucoplasia bucal...	67
APÊNDICES.....	68

INTRODUÇÃO

A leucoplasia bucal (LB) é uma desordem potencialmente maligna, definida como placa ou mancha branca de risco questionável, que não pode ser caracterizada clinicamente nem patologicamente como nenhuma outra doença (Warnakulasuriya *et al.*, 2007). Taxas de transformação maligna são variáveis e influenciadas pela idade, aspecto clínico da LB, associação com o tabaco e a presença de displasia epitelial (Warnakulasuriya *et al.*, 2007; Van der Waal 2009). Apesar de todos esses fatores serem considerados na avaliação do risco de transformação maligna, um marcador confiável que possa prever a evolução da LB para o carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) ainda não foi encontrado.

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um polipeptídeo de 53 aminoácidos, originalmente isolado de glândulas salivares de camundongos. Em humanos as principais fontes de EGF são as parótidas e os rins (Balick *et al.*, 2005). Algumas evidências indicam que o EGF é um fator protetor contra agressões aos tecidos e que também contribui para a manutenção da integridade da mucosa gastrointestinal (Berlanga-Acosta *et al.*, 2009). Além disso, esta proteína exerce importante função na manutenção da continuidade anatômica da mucosa bucal e é considerada fator protetor da mesma (Balicki *et al.*, 2005).

Estudos prévios, demonstraram que os níveis salivares de EGF estão reduzidos em pacientes com CCEB (Bernardes *et al.*, 2010; Bernardes *et al.*, 2011). Não se sabe se o mesmo pode acontecer nas lesões epiteliais com potencial de malignidade, e qual a relação destes níveis com a expressão tecidual de EGF e do seu receptor, EGFR. Assim, o objetivo deste trabalho

foi avaliar os níveis salivares de EGF em pacientes com LB e comparar com indivíduos clinicamente saudáveis. Adicionalmente, a expressão tecidual de EGF e EGFR foram avaliadas nas lesões e os aspectos clinicopatológicos foram comparados com os níveis salivares de EGF e a imunexpressão da proteína no tecido.

REVISÃO DE LITERATURA

Leucoplasia bucal (LB)

Atualmente, a OMS define a leucoplasia bucal como “placa ou mancha branca de risco questionável, que não pode ser caracterizada clinicamente nem patologicamente como nenhuma outra doença” (Warnakulasuriya *et al.*, 2007). Clinicamente, as LBs podem se apresentar sob vários aspectos. As leucoplasias homogêneas aparecem como uma placa levemente elevada, fina, uniforme, de coloração branco-acinzentada, podendo apresentar bordas bem definidas ou que se fundem gradualmente à mucosa normal adjacente. As lesões não homogêneas podem ser verrucosas, nodulares ou eritoplásicas (Van der Waal 2009). A leucoplasia verrucosa proliferativa é uma forma específica de leucoplasia, descrita inicialmente por Hansen *et al.* (1985). É caracterizada por acometer preferencialmente pacientes do gênero feminino, apresentar envolvimento multifocal e exibir altas taxas de recorrência e malignização (Cabay *et al.*, 2007; Bagán *et al.*, 2010).

Estima-se que a prevalência da LB seja de 1 a 8%, dependendo da idade e gênero do paciente (Neville *et al.*, 2002). Uma revisão sistemática incluindo trabalhos de várias partes do mundo revelou que a prevalência mundial da LB é 2,6%. O mesmo estudo mostrou que a leucoplasia foi significativamente mais prevalente no gênero masculino (3.22:1) e que não houve diferença entre as áreas geográficas (Petti, 2003).

O principal fator para o surgimento da doença é o uso do tabaco (OMS, 2005). Fatores como presença e grau de displasia, gênero feminino, tempo de duração, paciente não tabagista, localização em língua e soalho bucal,

tamanho maior que 20 mm e leucoplasia não homogênea, parecem estar associados ao pior prognóstico (Hsue *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009).

As taxas de transformação maligna das leucoplasias variam consideravelmente entre os estudos, dependendo dos parâmetros clínicos utilizados e o tempo de acompanhamento. Um estudo prospectivo de 10 anos mostrou uma taxa de transformação maligna de 2 a 3% ao ano (Lee *et al.*, 2000). Outro estudo prospectivo com 166 pacientes, revelou que a taxa acumulada de transformação maligna chega a 50%, após 16 anos de acompanhamento (Schepman *et al.*, 1998).

Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)

O EGF é um polipeptídeo de cadeia única, composto por 53 aminoácidos. Descoberto inicialmente nas glândulas submandibulares de camundongos, foi isolado originalmente a partir da urina baseado na sua capacidade de inibir a secreção gástrica, sendo também denominado urogastrona (Cohen, 1962).

Além do EGF exercer uma grande variedade de efeitos biológicos, também atua na proliferação e diferenciação de células mesenquimais e epiteliais. As atividades biológicas do EGF desencadeiam-se através de sua ligação ao seu receptor de membrana celular (EGFR), onde exerce um efeito mitogênico na maioria dos tecidos epiteliais, fibroblastos e células endoteliais (Berlanga-Acosta *et al.*, 2009).

O EGF está presente nos fluidos biológicos incluindo soro, urina e saliva (Takashi *et al.*, 1986). A maior parte do EGF salivar é derivado das

células acinares das glândulas parótidas, embora as glândulas submandibulares também contribuam para os níveis salivares da proteína (Thesleff *et al.*, 1988). A proporção relativa de EGF na glândula parótida, submandibular e no restante das glândulas é de 6:4:1, respectivamente (Ino *et al.*, 1993).

Algumas evidências indicam que a concentração fisiológica do EGF na saliva estimula a proliferação e migração de células epiteliais para a reparação tecidual quando a mucosa bucal é agredida (Ohshima *et al.*, 2002; Berlanga-Acosta *et al.*, 2009). Além disso, exerce importante função na manutenção da continuidade anatômica da membrana da mucosa bucal e é considerado fator protetor da mesma (Balicki *et al.*, 2005).

Por outro lado, trabalhos recentes utilizando cultura de células de carcinoma de mama, demonstraram que EGF em baixas concentrações estimula a atividade proliferativa, enquanto altas doses da proteína inibem o crescimento celular e mesmo a apoptose (Zhang *et al.*, 2012). Há sugestões para este efeito paradoxo, mas a base molecular para este fenômeno ainda não foi elucidada. Não se sabe se efeito semelhante pode ocorrer nas células epiteliais da mucosa bucal.

Alguns estudos apontam que pacientes fumantes apresentam menores níveis salivares de EGF, o que pode ser associado com os mecanismos patológicos das doenças bucais relacionadas com o uso do tabaco (Wang *et al.*, 1992; Bernardes *et al.*, 2011).

Shirasuna *et al.* (1991), encontraram que a imunomarcação do EGF na mucosa normal e leucoplásica é limitada a uma camada de tecido conjuntivo

subjacente ao epitélio. No mesmo trabalho foi relatado que a intensidade de coloração extracelular parece aumentar com o grau de malignidade do epitélio e foi eventualmente, mais marcante no tecido conjuntivo de carcinoma invasivo. Bernardes *et al.* (2011), ao avaliarem a imunexpressão de EGF em CCEB, encontraram um padrão de marcação de coloração castanha no citoplasma das células neoplásicas.

Em alguns tecidos a proliferação epitelial é associada com a localização nuclear do EGF e o seu receptor EGFR. É geralmente aceito que os efeitos do EGF são mediados pela existência do seu receptor de membrana, no entanto, há evidências acumuladas de que o núcleo da célula representa um segundo local de ação do EGF (Marti *et al.*, 2001).

JUSTIFICATIVA

O EGF salivar pode estar reduzido em leucoplasias bucais da mesma forma que está reduzido nos carcinomas de células escamosas de boca, podendo ser um indicador de fácil aplicação para avaliação e monitoramento das lesões.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Quantificar através da técnica de ELISA os níveis salivares de EGF em pacientes com leucoplasias bucais e comparar com indivíduos clinicamente saudáveis.

Objetivos específicos

- Verificar a associação dos níveis salivares de EGF com as seguintes características clinicopatológicas: gênero, número de lesões leucoplásicas (única ou múltipla); tipo clínico (homogênea ou heterogênea); localização (alto e baixo risco); etiologia (idiopática ou associada ao fumo) e presença de atipia epitelial.
- Verificar a associação dos níveis salivares de EGF com a expressão imunohistoquímica de EGF e EGFR nas leucoplasias.
- Verificar a correlação entre EGF e EGFR teciduais.

METODOLOGIA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número 07330712.5.0000.5149 (anexo). Todos os participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (apêndices).

Trata-se de um estudo caso controle. Foram incluídos no estudo novos indivíduos que tiveram o diagnóstico clínico de LB e indivíduos que estavam em acompanhamento e tinham lesões presentes em boca. O estudo foi realizado na clínica de Semiologia/Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG e no serviço de Estomatologia do Hospital Municipal Odilon Behrens (HMOB). Os fragmentos das lesões foram obtidos através de biópsias incisoriais ou excisionais realizadas para fins de diagnóstico e/ou tratamento, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina. Todos os materiais processados e os laudos histopatológicos foram emitidos pelo Serviço de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG.

Empregando-se uma ficha clínica elaborada pelos pesquisadores, todos os dados demográficos, clínicos e histopatológicos foram coletados (apêndices).

A faixa etária foi dicotomizada de acordo com a média de idade obtida entre os pacientes. De acordo com a localização, as lesões foram classificadas conforme os critérios adotados por Liu & Klein-Szanto, 2000. Foram consideradas leucoplasias de alto risco aquelas localizadas em soalho bucal e língua. As leucoplasias localizadas em outras regiões foram consideradas como lesões de baixo risco. Clinicamente as leucoplasias foram classificadas como homogêneas e não homogêneas (Warnakulasuriya *et al.*,

2007). Foram consideradas leucoplasias homogêneas as placas ou manchas brancas ligeiramente elevadas, finas, com bordas bem definidas ou que se misturavam gradualmente com a mucosa normal adjacente. As leucoplasias não homogêneas se apresentavam de forma nodular, verrucosa ou leucoeritroplásica. As leucoplasias foram classificadas como únicas ou múltiplas. Foram consideradas leucoplasias múltiplas quando duas ou mais lesões estavam presentes. Em relação ao tamanho, as lesões foram classificadas como: menores que 2 cm, entre 2 e 4 cm ou > 4 cm. Para determinar o tamanho das leucoplasias múltiplas, foi considerado a soma do tamanho de cada lesão (Van der Waal, 2009). A displasia epitelial foi classificada conforme o sistema binário proposto por Kujan *et al.* (2006).

Para não haver confundimento com a localização (alto e baixo risco), foi adotada a terminologia sem atipia para as leucoplasias sem atipia epitelial e atipia epitelial leve, e com atipia, para as leucoplasias com atipia moderada e severa.

Pareamento dos indivíduos para a coleta de saliva

A saliva dos indivíduos dos grupos caso (LB) e controle (sem a doença), foram coletadas conforme descrição abaixo. Fizeram parte do grupo controle, indivíduos clinicamente saudáveis, pareados por gênero, idade e tabagismo. O hábito tabagista foi classificado conforme os critérios de Moreno-Lopez *et al.* (2000). Os pacientes foram divididos em três grupos: Grupo 1 - Não fumante ou ex fumante, sendo considerado ex fumante os indivíduos que abandonaram o vício há mais de 2 anos; Grupo 2 – Indivíduos que fumavam até 20 cigarros por dia; Grupo 3 – Indivíduos que fumavam mais de 20 cigarros por dia.

Indivíduos de ambos os grupos que relataram comorbidades como hepatite, HIV/AIDS, infecção aguda, doenças autoimunes, insuficiência cardíaca e doenças renais foram excluídos do estudo.

Coleta e processamento da saliva

A coleta foi realizada preferencialmente pela manhã. Todos os pacientes foram orientados a não ingerir alimentos, bebidas ou fumar por pelo menos uma hora antes da coleta. A coleta da saliva foi realizada com esponjas Salivette[®] colocadas na cavidade bucal durante 5 minutos, sendo retiradas e recolocadas em frasco próprio. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em isopor contendo gelo até o momento do processamento. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos a 4 °C e diluídas em tampão PBS (0,4 mM NaCl e 10 mM NaPO₄) contendo inibidor de proteases (PMSF 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM e 0,01 mg/ml aprotinina) e 0,05% Tween-20. Após o processamento, as amostras foram armazenadas a -20°C em alíquotas de 200 µl até o momento da utilização.

Protocolo da técnica de ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay)

A técnica de ELISA foi empregada para avaliação da proteína EGF na saliva dos indivíduos. Trata-se de um imunoenensaio enzimático do tipo sanduíche que utilizou anticorpo monoclonal de camundongo (EGF), para captura e detecção das proteínas EGF. O anticorpo de captura encontrava-se imobilizado na superfície interna dos poços da placa de microtitulação. Para efetuar a análise, um volume apropriado de amostra foi incubado no poço de revestimento, permitindo que o anticorpo de captura se ligasse ao antígeno.

Então, o antígeno imobilizado foi estimulado pelo anti-soro detector. A quantidade de anticorpo detector ligado ao antígeno foi medido através da ligação a um conjugado de estreptavidina-peroxidase, que posteriormente catalisou a conversão do substrato cromogênico o-fenilenodiamina (OPD) em um produto colorido. O produto colorido da reação foi quantificado por meio de espectrofotometria e relacionado com a quantidade de proteínas existentes na amostra com base em curva padrão. O experimento pode ser resumido abaixo:

1. Diluição do anticorpo de captura para a proteína EGF (DY 236 R&D Systems) e adição de 100 µl aos poços;
2. Lavagem das placas de microtitulação;
3. Adição de 100 µl das amostras nos respectivos poços e preparação de dois poços em cada placa com 100 µl de diluente de amostras para utilizar como substrato branco; iniciou-se a curva padrão com 250 pg/ml para EGF;
4. Cobertura das placas e incubação durante 18 horas, à temperatura ambiente;
5. Lavagem das placas de microtitulação;
6. Adição de 100 µl de anticorpo de detecção e incubação à temperatura ambiente em agitação por uma hora;
7. Lavagem das placas de microtitulação;
8. Adição de 100 µl de conjugado estreptavidina-peroxidase e incubação à temperatura ambiente em agitação durante 30 minutos;
9. Lavagem das placas de microtitulação;

10. Adição de 100 µl de cromógeno (OPD). Incubação das placas no escuro à temperatura ambiente com controle visual;
11. Adição de 5 µl de solução H₂SO₄ a cada poço para interromper a reação;
12. Leitura das placas em absorvância de 450nm em espectrofotômetro (Emax, Molecular Devices, Minneapolis, Minn., USA).

A dosagem da proteína total foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976) (Sigma, Saint Louis, MO, USA) de acordo com a curva BSA padrão (Ferramentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania) e utilizada para normalizar os valores de EGF em cada amostra.

Protocolo da técnica imunistoquímica

Informações referente à técnica e especificações dos anticorpos estão descritos na tabela 1. Os cortes histológicos com espessura de 3 µm, foram montados em lâminas de vidro com carga. Segue abaixo, resumidamente, a sequência do protocolo, de acordo com as recomendações dos fabricantes:

1. Desparafinização em três passagens de xilol e hidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%);
2. Recuperação dos epitopos antigênicos de acordo com a tabela 1;
3. Após o resfriamento, alcançando equilíbrio térmico com o meio ambiente, lavagem em cinco banhos de água destilada;
4. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20mM pH 7,4;
5. Bloqueio da peroxidase endógena conforme descrito na tabela 1. Dois banhos de 6 minutos cada;
6. Incubação do anticorpo primário de acordo com a tabela 1;
7. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;

8. Incubação em anticorpo secundário para amplificação da reação (Sistema LSAB ou Advance, conforme tabela 1), por 30 minutos em temperatura ambiente e meio úmido;
9. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
10. Incubação em solução de complexo terciário contendo peroxidase (Sistema LSAB ou Advance, conforme tabela 1), por 30 minutos, em temperatura ambiente e meio úmido;
11. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
12. Incubação com tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina (DAB – Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e, em seguida, 5 banhos de água destilada;
13. Contracoloração com hematoxilina de Harris por 40 segundos;
14. Rápida passagem em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e 3 vezes a 100%), diafanização em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Tissue-Mount™ (Tissue-Clear® based medium).

A técnica foi realizada manualmente. Controles negativos e positivos com fragmentos de mucosa normal foram incluídos em cada experimento e a marcação positiva no epitélio foi considerada para validar a reação.

Tabela 1 - Anticorpos primários, fabricantes, soluções para recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, diluição, incubação e sistemas de detecção.

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone/Fabricantes</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Bloqueio da peroxidase endógena</i>	<i>Diluição</i>	<i>Incubação</i>	<i>Sistema de detecção</i>
Anti-EGF	Clone EGF-10; Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA), código sc-57088	TRIS-EDTA, pH 8,0, panela de pressão, 96°C, 20'	Água destilada + H ₂ O ₂ 20V (1:1)	1:50	01 h temperatura ambiente	Advance HRP (Dako, code k4068)
Anti-EGFR	Clone 31G7; Invitrogen (Frederick, MD, USA), código 550008	Pepsina, pH 1,8, estufa, 37°C, 10'	Solução de metanol + H ₂ O ₂ 20V (1:1)	1:100	01 h temperatura ambiente	LSAB (Dako, code K0690)

Análise da marcação imunoistoquímica

A imunoexpressão da proteína EGF foi avaliada de acordo com Soini *et al.* (2001), analisando a marcação no citoplasma das células. A intensidade da coloração imunoistoquímica foi avaliada dividindo o padrão de marcação em quatro grupos: 0 = ausente; 1 = fraca; 2 = moderada; 3 = forte; 4 = muito forte. A extensão da marcação foi avaliada da seguinte forma: 0 = ausente; 1 = < 25% das células; 2 = 25-50% das células; 3 = 50-75% das células; 4 = > 75% das células. Uma pontuação somatória foi atribuída levando-se em consideração a extensão e intensidade da marcação, gerando 3 grupos: negativo (-) = 0 ponto; positivo (+) = 1-4 pontos; fortemente positivo (++) = 5-8 pontos.

A expressão imunoistoquímica da proteína EGFR foi avaliada de acordo com Diniz-Freitas *et al.* (2007) e considerada positiva quando presente na membrana celular. A intensidade da coloração imunoistoquímica foi avaliada dividindo o padrão de marcação em três grupos: fraca, moderada e intensa. A extensão foi avaliada conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Avaliação imunoistoquímica da proteína EGFR

<i>Expressão</i>	<i>Extensão</i>	<i>Intensidade</i>
Positiva	> 10% das células	Moderada ou intensa
Negativa	< 10 % das células	Fraca, moderada ou intensa
	> 10% das células	Fraca

A expressão só foi considerada positiva, quando mais que 10% das células foram marcadas, com intensidade moderada ou intensa.

A diferença entre o número de amostras de tecido (n=26) e saliva

(n=32) se deve ao fato de que alguns blocos de parafina dos pacientes em acompanhamento não estarem disponíveis.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada através dos softwares SPSS 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e GraphPad Prisma 5.0. Os resultados foram expressos através da média \pm desvio padrão. O teste Shapiro-Wilk foi realizado para verificar a normalidade para o EGF. Para comparar os níveis salivares da proteína entre o grupo caso e controle, o teste Wilcoxon foi aplicado. Para a análise das variáveis categóricas, o teste qui-quadrado e exato de Fisher foram realizados, quando aplicáveis. O nível de significância adotado para todas as análises foi $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características clínicas e histopatológicas

A amostra total compreendeu 32 indivíduos, sendo 18 (56,2%) do gênero masculino e 14 (43,8%) do gênero feminino. Em relação à faixa etária, 18 (56,2%) indivíduos tinham idade superior a 60 anos e 14 (43,8%) tinham idade menor ou igual a 60 anos. A média de idade foi de 61,8 e 61,3 anos para o grupo caso e grupo controle, respectivamente. Considerando a localização das lesões, 26 (81,2%) se localizavam em regiões de baixo risco e 06 (18,8%) em regiões de alto risco. Em relação ao tamanho das lesões, 19 (59,4%) mediam menos que 2 cm, 06 (18,8%) mediam entre 2 e 4 cm e 07 (21,8%) mediam mais que 4 cm. Do ponto de vista clínico, 25 pacientes (78,1%) apresentaram lesões homogêneas e 07 pacientes (21,9%) lesões não homogêneas. Múltiplas lesões foram encontradas em 65,5% (n=21) dos pacientes e uma única lesão em 34,5% (n=11) dos casos. O hábito tabagista foi relatado em 43,8% dos casos (n=14), enquanto 56,2% (n=18) eram não tabagistas. Dentro do grupo dos tabagistas, 10 (71,4%) fumavam até 20 cigarros por dia e 4 (28,6%) fumavam mais que 20 cigarros por dia. O consumo de álcool foi relatado por 46,9% (n=15) dos pacientes enquanto 17 pacientes (53,1%) não faziam uso de bebidas alcólicas. Histologicamente, 78,1% (n=25) dos casos foram classificados como lesões sem atipia e 21,9% (n=7) como lesões com atipia.

As características clinicopatológicas do grupo com leucoplasia bucal estão representadas na tabela 3 e anexo.

Tabela 3 - Características clinicopatológicas do grupo com leucoplasia bucal.

	N (%)	Valor de P
<i>Gênero</i>		
Feminino	14 (43,8)	> 0,05
Masculino	18 (56,2)	
<i>Idade (anos)</i>		
≤ 60	14 (43,8)	> 0,05
> 60	18 (56,2)	
<i>Localização*</i>		
Alto risco	06 (18,8)	< 0,05
Baixo risco	26 (81,2)	
<i>Aspecto clínico</i>		
Homogênea	25 (78,1)	< 0,05
Não homogênea	07 (21,9)	
<i>Número de lesões</i>		
Múltiplas	21 (65,5)	> 0,05
Única	11 (34,5)	
<i>Tamanho</i>		
< 2 cm	19 (59,4)	> 0,05
2–4 cm	06 (18,8)	
> 4 cm	07 (21,8)	
<i>Hábito tabagista</i>		
Não	18 (56,2)	> 0,05
Sim	14 (43,8)	
<i>Hábito etilista</i>		
Não	17 (53,1)	> 0,05
Sim	15 (46,9)	
<i>Displasia epitelial</i>		
Com atipia	07 (21,9)	< 0,05
Sem atipia	25 (78,1)	

*Alto risco, língua e soalho bucal; baixo risco, outras localizações

Análises clinicopatológicas

No estudo da associação entre as características clínicas e histopatológicas, foram encontradas associações estatisticamente significativas:

- 1- Faixa etária e o número de lesões ($p = 0,008$). Por esta associação observou-se que indivíduos acima dos 60 anos normalmente apresentaram lesões únicas, enquanto pacientes mais jovens apresentaram lesões múltiplas.
- 2- Localização das lesões e hábito tabagista: Todos os pacientes que apresentaram lesões localizadas em regiões de alto risco eram não

fumantes ($p = 0,024$). Em relação ao hábito tabagista, foi observado que os pacientes fumantes normalmente fazem uso de bebidas alcólicas ($p = 0,014$).

3- Tipo clínico da leucoplasia e consumo de álcool: Foi encontrada associação entre o aspecto clínico da leucoplasia e o consumo de álcool. Todos os pacientes que apresentaram lesões não homogêneas não faziam uso de bebidas alcólicas ($p = 0,008$).

Níveis salivares de EGF entre o grupo caso e controle

Os níveis salivares de EGF no grupo caso e controle são mostrados na figura 1.

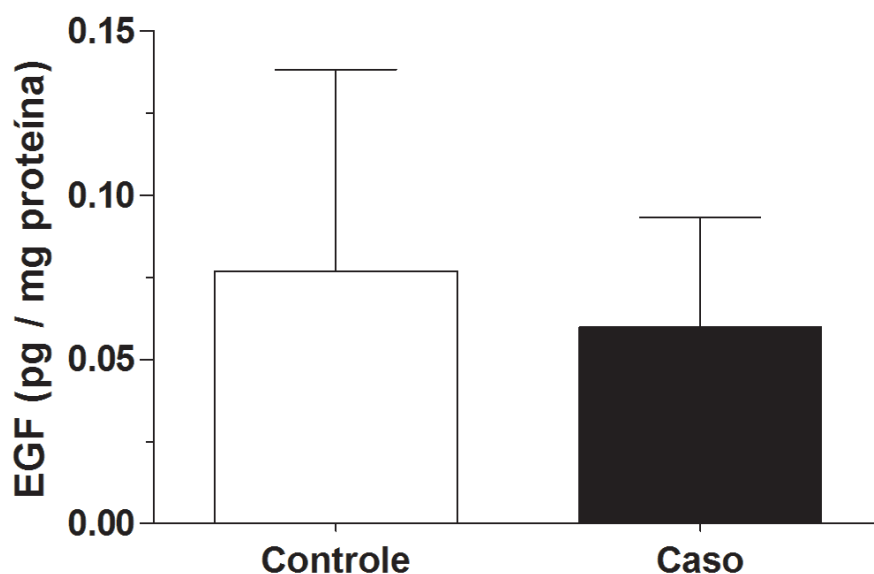


Figura 1 - Níveis salivares de EGF nos grupos caso e controle

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa dos níveis salivares de EGF entre os grupos caso e controle ($0,059 \pm 0,033$; $0,077 \pm 0,061$ pg/mg proteína respectivamente; $p = 0,254$). Também não foi encontrada

diferença estatisticamente significativa entre os valores totais de proteínas entre os grupos estudados.

Níveis salivares de EGF e variáveis clinicopatológicas

Para investigar a relação entre os níveis salivares de EGF com as variáveis clinicopatológicas, o valor médio de EGF foi estabelecido em ambos os grupos. A mediana foi utilizada como o valor de corte para os níveis salivares, categorizando como baixo EGF, valor igual ou menor do que a mediana e alto EGF quando maior que a mediana (= 0,046).

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os níveis salivares de EGF e as características clinicopatológicas (tabela 4). A frequência de pacientes que apresentaram alto ou baixo EGF no grupo caso e controle estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 4 - Associação dos aspectos clinicopatológicos e os níveis salivares de EGF

	<i>Alto EGF</i> N (%)	<i>Baixo EGF</i> N (%)	<i>P</i>
<i>Gênero</i>			
Feminino	8 (57.1)	6 (42.9)	0.476*
Masculino	8 (44.4)	10 (55.6)	
<i>Idade (anos)</i>			
≤ 60	6 (42.9)	8 (57.1)	0.476*
> 60	10 (55.6)	8 (44.4)	
<i>Localização</i>			
Alto risco	2 (33.3)	4 (66.7)	0.654**
Baixo risco	14 (53.8)	12 (46.2)	
<i>Aspecto clínico</i>			
Homogênea	12 (48.0)	13 (52.0)	1.000**
Não homogênea	4 (57.1)	3 (42.9)	
<i>Número de lesões</i>			
Múltiplas	10 (47.6)	11 (52.4)	0.710*
Única	6 (54.5)	5 (45.5)	
<i>Tamanho</i>			
< 2 cm	10 (52.6)	9 (47.4)	0.650*
2–4 cm	2 (33.3)	4 (66.7)	
> 4 cm	4 (57.1)	3 (42.9)	
<i>Hábito tabagista</i>			
Não	11 (61.1)	7 (38.9)	0.154*

Sim	5 (35.7)	9 (64.3)	
<i>Hábito etilista</i>			
Não	10 (58.8)	7 (41.2)	0.288*
Sim	6 (40.0)	9 (60.0)	
<i>Displasia epitelial</i>			
Com atipia	6 (85.7)	1 (14.3)	0.083**
Sem atipia	10 (40.0)	15 (60.0)	

* Teste qui-quadrado; ** Teste exato de Fisher

Tabela 5 – Níveis salivares de EGF nos grupos caso e controle

	<i>Alto EGF</i> N (%)	<i>Baixo EGF</i> N (%)
<i>Caso</i>	16 (50.0)	16 (50.0)
<i>Controle</i>	20 (62.5)	12 (37.5)

Imunolocalização de EGF e EGFR

A imunoistoquímica foi realizada em 26 amostras de leucoplasia bucal. As proteínas avaliadas e as frequências referentes à imunoexpressão estão representadas na tabela 6.

Tabela 6 - Frequências de imunoexpressão do EGF e EGFR nas amostras de leucoplasia bucal.

	N (%)
<i>EGF Total*</i>	
Negativo	18 (69,2)
Positivo	07 (26,9)
Fortemente positivo	01 (03,9)
<i>EGFR</i>	
Negativo	10 (38,5)
Positivo	16 (61,5)

* EGF citoplasmático e EGF nuclear

EGF

A marcação citoplasmática do EGF foi considerada positiva em 07 (26,9%) casos e fortemente positiva em 1 caso (3,9%). A marcação apresentou-se como coloração acastanhada no citoplasma das células (Figura 2). A imunoexpressão foi negativa em 69,2% (n=18).

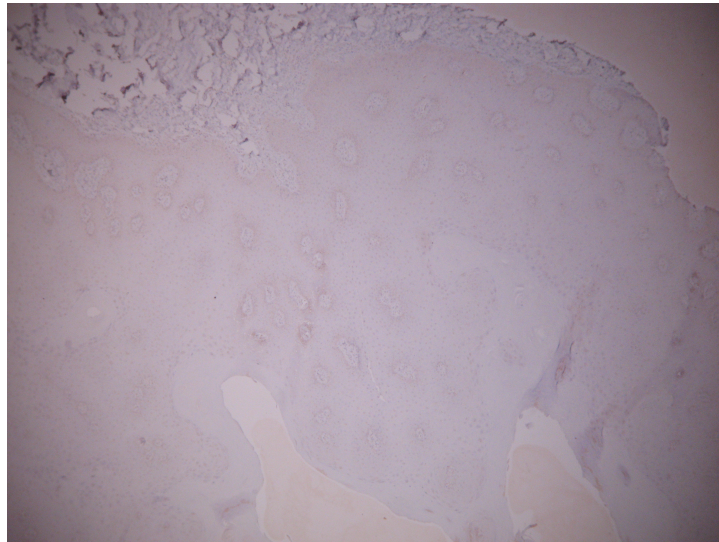


Figura 2 – Imunomarcaco citoplasmática da proteína EGF

Durante a avaliao também foi observado evidente marcao nuclear das células (tabela 7). A marcao nuclear foi considerada negativa em 57,7% (n=15) dos casos, positivo em 34,6% (n=9) dos casos e fortemente positivo em 7,7% (n=2) dos casos.

Tabela 7 - Marcao nuclear de EGF nas amostras de leucoplasia

	N (%)
Negativo	15 (57,7)
Positivo	09 (34,6)
Fortemente positivo	02 (07,7)

Não houve associao entre a imunoexpressão de EGF com gênero, idade, aspectos clínicos, hábitos tabagita/etilista e displasia epitelial (tabela 8).

Considerando a localizao das leucoplasias, foi observado uma tendência de lesões localizadas em regiões de alto risco apresentarem imunoexpressão positiva de EGF quando comparadas com as leucoplasias localizadas em região de baixo risco ($p = 0,051$).

Observou-se associao estatisticamente significativa entre o número

de lesões e imunoexpressão de EGF. A maioria dos pacientes que apresentaram uma única lesão mostraram marcação positiva para o EGF, enquanto os pacientes que apresentaram lesões múltiplas mostraram marcação negativa ($p = 0,003$).

Não foi encontrada associação entre EGF nuclear e EGF salivar nem correlação entre EGF tecidual e EGF nuclear.

Tabela 8 - Associação dos aspectos clinicopatológicos e imunoexpressão de EGF

	<i>Negativo</i> <i>N (%)</i>	<i>Positivo</i> <i>N (%)</i>	<i>P</i>
<i>Gênero</i>			
Feminino	8 (66.7)	4 (33.3)	1.000**
Masculino	10 (71.4)	4 (28.6)	
<i>Idade (anos)</i>			
≤ 60	10 (90.9)	1 (9.1)	0.084**
> 60	8 (53.3)	7 (46.7)	
<i>Localização</i>			
Alto risco	2 (33.3)	4 (66.7)	0.051*
Baixo risco	16 (80.0)	4 (20.0)	
<i>Aspectos clínicos</i>			
Homogênea	14 (66.7)	7 (33.3)	1.000**
Heterogênea	4 (80.0)	1 (20.0)	
<i>Número de lesões</i>			
Múltiplas	16 (88.9)	2 (11.1)	0.003*
Única	2 (25.0)	6 (75.0)	
<i>Hábito tabagista</i>			
Não	10 (66.7)	5 (33.3)	1.000**
Sim	8 (72.7)	3 (27.3)	
<i>Hábito etilista</i>			
Não	8 (66.7)	4 (33.3)	1.000**
Sim	10 (71.4)	4 (28.6)	
<i>Displasia epitelial</i>			
Alto risco	4 (66.7)	2 (33.3)	1.000**
Baixo risco	14 (70.0)	6 (30.0)	

* Teste qui-quadrado; ** Teste exato de Fisher

EGFR

A imunoexpressão de EGFR foi positiva em 16 casos (61,5%) e apresentou-se como coloração acastanhada na membrana citoplasmática das células (Figura 3). A marcação foi negativa em 38,5% (n=10) dos casos.

Não foi observado marcação nuclear e no citoplasma das células.

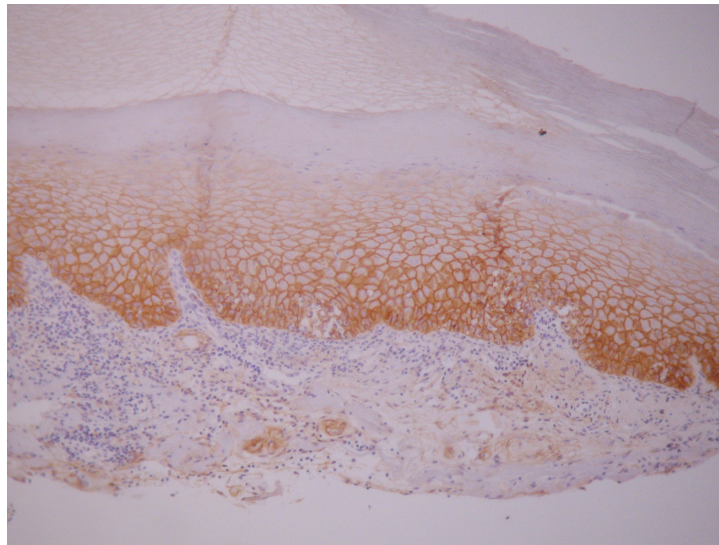


Figura 3 – Imunomarcção de membrana celular da proteína EGFR

Não houve associação entre a imunoexpressão de EGFR com as variáveis clinicopatológicas estudadas nem entre a imunoexpressão de EGFR e EGF tecidual.

DISCUSSÃO

O CCEB pode ser precedido por lesões potencialmente malignas, das quais a principal é a leucoplasia. Parâmetros clínicos e histopatológicos interferem no potencial de transformação maligna desta lesão, mas até o momento não existe um marcador que possa prever com máxima confiança esta evolução. Vários estudos tem buscado identificar biomarcadores que sejam úteis nesta avaliação (Fedele, 2009; Mehrotra *et al.*, 2011; Scully, 2009; Mishra, 2012).

Em estudos prévios do nosso grupo, foi demonstrado que pacientes com CCEB apresentam baixos níveis salivares de EGF, e que a quantidade desta proteína é influenciada por alguns fatores de risco, como uso de tabaco e álcool (Bernardes *et al.*, 2010; Bernardes *et al.*, 2011). A pesquisa de biomarcadores na saliva oferece uma perspectiva promissora. A saliva apresenta diferentes proteínas que podem estar alteradas em diversas doenças locais e sistêmicas (Streckfus & Bigler, 2002). A coleta da saliva apresenta as vantagens de ser um método não invasivo com o mínimo de desconforto para o paciente. Até o momento nenhum estudo verificou a relação entre os níveis salivares de EGF e a LB.

Neste trabalho buscou-se comparar os níveis de EGF salivar em pacientes com leucoplasia bucal e pacientes controle. Uma das dificuldades deste trabalho foi a inexistência na literatura de trabalhos que estabeleçam o nível de normalidade para o EGF. Portanto, para determinar os níveis salivares da proteína, a mediana foi utilizada como medida de tendência central, categorizando o EGF como baixo ou alto, conforme trabalho anterior

realizado pelo grupo de pesquisadores (Bernardes *et al.* 2010; Bernardes *et al.* 2011). Estabelecidos estes níveis, os valores encontrados foram comparados entre os grupos, com as características clinicopatológicas e com a expressão tecidual da proteína.

Outra limitação deste estudo se refere ao tamanho da amostra. Inicialmente, o cálculo amostral foi feito com base nos resultados obtidos em estudos prévios do próprio grupo de pesquisadores (Bernardes *et al.* 2010; Bernardes *et al.* 2011). A diferença encontrada entre os níveis salivares de EGF entre os indivíduos com CCEB e clinicamente saudáveis foi muito pequena, o que gera um número de casos elevado(722), difícil de ser alcançado em um trabalho limitado a um período de 24 meses. Embora o número de casos estudados tenha sido considerável (n=32), considerando apenas a prevalência da doença, a LB é uma doença muito heterogênea, com variações em relação a sua apresentação clínica e características histopatológicas que podem repercutir em seu comportamento (Liu *et al.*, 2010; Warnakulasuriya *et al.*, 2011). Assim, quando as lesões foram analisadas de acordo com estas características, a maioria dos resultados não mostrou diferenças estatisticamente significantes diante do pequeno número de lesões alocadas em alguns grupos. É importante ressaltar, que por mais que o grupo caso tenha sido composto por indivíduos com a mesma doença (LB), esses indivíduos apresentaram de um modo geral lesões completamente diferentes, formando assim um grupo heterogêneo, o que pode ter peso na análise estatística. Apesar de difícil, o delineamento deste mesmo estudo, com a inclusão de maior número de lesões agrupadas de acordo com características específicas (tipo clínico, localização, atipia), pode

ser necessária para a validação do EGF como biomarcador salivar.

A distribuição das LBs por gênero é variável na maioria dos estudos, indo de uma forte predominância do gênero masculino em diferentes partes da Índia e Japão, a aproximadamente 1:1 no restante do mundo (Van der Waal *et al.*, 1997; Petti, 2003). Este estudo não mostrou diferenças na distribuição das lesões por gênero. As diferenças significativas encontradas foram relacionadas ao tipo clínico e localização, com maior número de lesões sendo classificadas como homogêneas e localizadas em regiões de baixo risco.

Não foi encontrada associação entre gênero e os níveis salivares e teciduais de EGF, entretanto diversos estudos apontam que pacientes do gênero feminino apresentam maior risco de transformação maligna das lesões (Silverman *et al.*, 1984; Schepman *et al.*, 1998). Ainda, é relatado maior risco de transformação maligna das LBs em mulheres não fumantes (leucoplasia idiopática). Não se sabe ao certo porque a ausência do hábito tabagista é associado ao risco aumentado de transformação apenas em mulheres (Schepman *et al.*, 1998).

Apesar de não ter sido encontrada associação entre a faixa etária e os níveis salivares e teciduais de EGF, Warnakulasuriya *et al.* (2011) relatou uma maior taxa de transformação maligna em pacientes acima dos 65 anos (6,7%) quando comparados com indivíduos abaixo dessa faixa etária (0,9%). Em contrapartida, Ho *et al.* 2012 não encontrou relação entre idade e risco de transformação maligna das leucoplasias. Kuribayashi *et al.* (2012) encontrou em seu estudo, que pacientes acima de 60 anos estão mais susceptíveis a

recorrência das lesões após remoção cirúrgica. No presente estudo, foi encontrado que os pacientes acima de 60 anos possuem frequentemente lesões únicas, enquanto indivíduos mais jovens apresentam lesões múltiplas ($p = 0,008$).

Estudos prospectivos apontam que as lesões localizadas em regiões de alto risco apresentam maior taxa de transformação maligna quando comparadas as lesões de baixo risco (Kramer *et al.*, 1978; Silverman *et al.*, 1984). No presente estudo, a maioria das lesões (81,2%) foram encontradas em regiões de baixo risco para a transformação maligna ($p < 0,005$) e não houve associação entre a localização das lesões, e os níveis salivares de EGF. Em relação a marcação imunoistoquímica de EGF e a localização das lesões, foi observado uma tendência de marcação negativa em lesões de baixo risco ($p=0,051$). O baixo EGF nessas regiões pode favorecer a progressão das lesões.

Brouns *et al.* (2014) encontraram que o tamanho das lesões (maior que 4 cm) é o único fator preditor para a transformação maligna das leucoplasias. Essa relação também foi encontrada por Holmstrup *et al.* (2006). Em nosso estudo, apenas 07 (21,8%) lesões mediam mais de 4 cm e não foi encontrada associação entre o tamanho das leucoplasias, os níveis salivares e a marcação imunoistoquímica de EGF.

Os aspectos clínicos são um dos principais fatores de risco para transformação maligna das LB`s encontrados na literatura. Estudos prévios mostraram que as leucoplasias não homogêneas apresentam maior risco de transformação maligna quando comparadas as homogêneas (Pindborg *et al.*,

1968; Silverman *et al.*, 1984; Schepman *et al.*, 1998). A leucoplasia não homogênea parece estar relacionada com a presença de displasia epitelial. A alteração clínica representa o resultado do processo de alteração na diferenciação das células epiteliais. Um componente vermelho (leucoeritroplasia) é reconhecido pelo aumento da possibilidade de displasia epitelial ou transformação maligna. Roed-Petersen *et al.* (1971) encontrou que pacientes com leucoplasias não homogêneas são 7 vezes mais propensos à transformação maligna. Clinicamente, o presente estudo encontrou 25 (78,1%) leucoplasias homogêneas e 07 (21,9%) não homogêneas ($p < 0,05$). Não foi encontrada associação entre os aspectos clínicos das leucoplasias e os níveis salivares de EGF.

As leucoplasias bucais podem ser únicas ou múltiplas. Saito *et al.* (1999) encontrou que as leucoplasias múltiplas apresentam maior risco de transformação maligna quando comparadas às leucoplasias únicas, independente do grau de displasia epitelial. O termo campo de cancerização tem sido usado para descrever o fenômeno pelo qual um campo inteiro de tecido sofre alterações malignas ou pré malignas (Slaughter *et al.*, 1953; Shikhani *et al.*, 1986). O presente estudo encontrou 21 (65,5%) lesões múltiplas e 11 (34,5%) lesões únicas, o que reforça a idéia que uma proporção substancial da mucosa bucal está alterada em pacientes com leucoplasias múltiplas e que esses pacientes podem ser predispostos geneticamente para a transformação maligna. Foi encontrada também associação estatisticamente significativa entre o número de lesões e a marcação imunoistoquímica de EGF. A maioria das lesões múltiplas (88,9%) foram negativas para a marcação do EGF enquanto 75% das lesões únicas

foram positivas. O baixo EGF nas lesões múltiplas pode favorecer o aparecimento de novas lesões.

O hábito tabagista é frequentemente associado ao aparecimento das leucoplasias bucais. No presente estudo, 18 (56,2%) pacientes eram não fumantes e 14 (43,8%) faziam uso de tabaco. Foi encontrada associação estatisticamente significativa entre o uso de tabaco e álcool. Normalmente, os pacientes fumantes, também fazem uso de bebidas alcólicas ($p=0,008$). A remoção do hábito pode melhorar o quadro das leucoplasias, inclusive levar ao desaparecimento total em cerca de 44% dos pacientes (Banoczy *et al.*, 1977). Portanto, todos os pacientes tabagistas que participaram do estudo foram encorajados à abandonar o hábito ou vício. O risco associado entre o desenvolvimento do CCEB e o uso de tabaco é aumentado de acordo com a quantidade de cigarros consumidos por dia. Pacientes que consomem 6-20 cigarros por dia tem 3,1% de chances de desenvolver o CCEB enquanto pacientes que consomem mais de 20 cigarros por dia tem 7,96% de chances (Moreno-López *et al.*, 2000). Apesar de não ter sido encontrada significância entre a quantidade de tabaco e os níveis salivares de EGF, foi observado que 75% dos pacientes que consomem mais de 20 cigarros por dia apresentam baixo EGF. Bernardes *et al.* (2011), também encontrou níveis salivares de EGF mais baixos em pacientes fumantes. É interessante ressaltar a relação entre a ausência do hábito tabagista e a localização das lesões em regiões de alto risco ($p= 0,024$). Este destaca a necessidade de se estar atento para as leucoplasias idiopáticas, estabelecendo medidas de acompanhamento vigilante para este tipo de lesão.

Estudos recentes indicam que o álcool potencializa os efeitos do tabaco, aumentando os riscos de aparecimento e transformação das desordens potencialmente malignas. Embora diversos estudos não encontrem o uso de álcool como fator independente para o surgimento das lesões, Maserejian *et al.* (2006) em seu estudo prospectivo, encontrou que pacientes que ingerem 12,5 gramas de álcool por dia tem 22% de risco aumentado e que o álcool é sim, um fator independente para o desenvolvimento das lesões. No presente estudo, os indivíduos não foram pareados por hábito etilista pela dificuldade de mensurar a quantidade de álcool ingerida diariamente ou semanalmente pelo paciente. A associação entre lesões não homogêneas e o uso de álcool pode sugerir que além de potencializar o efeito do tabaco, o álcool possa interferir também diretamente no “turn over” e diferenciação das células epiteliais (Feng & Wang, 2013). Esta suposição merece melhor investigação.

A presença de displasia epitelial sempre foi considerada como sendo preditiva de transformação maligna, e trabalhos relatam que o risco de transformação maligna aumenta com a severidade das alterações displásicas (Schepman *et al.*, 1998). No entanto, as lesões não displásicas podem ocasionalmente sofrer transformação maligna, e nem todas as lesões displásicas evoluem para o CCEB. Os estudos longitudinais que associam as características histopatológicas e as taxas de transformação maligna das LBs permanecem contraditórios (Liu *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2012). A fim de reduzir a variabilidade do grau histopatológico inter e intra observador, um sistema binário foi sugerido por Kujan *et al.* (2006) na avaliação da displasia. Por este sistema as lesões com displasia ausente ou questionável e leve são

consideradas como de baixo risco e displasias moderadas e severas como de alto risco para a transformação maligna. Caldeira *et al.* (2012), sugerem que o sistema binário pode reduzir a variabilidade e melhorar a reprodutibilidade da avaliação de displasia epitelial e que novos estudos sobre a aplicabilidade desse sistema devem ser conduzidos. Liu *et al.* (2010) verificaram a utilidade do novo sistema binário de displasia e encontraram que a displasia de alto risco é um fator significativo para a transformação maligna das LBs. No presente estudo 21,9% (n = 7) foram considerados como com atipia e 78,1% (n = 25) considerados como sem atipia (p < 0,05). Entretanto, não foi encontrada associação entre a presença e ausência de displasia e os níveis salivares e teciduais de EGF.

A marcação imunoistoquímica que deve ser considerada para o EGF é a marcação citoplasmática (Bernardes *et al.*, 2011). Entretanto, durante a avaliação imunoistoquímica, foi observado evidente marcação nuclear das células, sendo considerada positiva em 34,6% e fortemente positiva em 7,7% dos casos. Evidências acumuladas sugerem que o núcleo da célula representa um segundo local de ação do EGF. Essas evidências vem sendo demonstradas através da presença de EGF e EGFR nuclear em diversos tipos de tecidos, incluindo queratinócitos (Pierard-Franchimont *et al.*, 1991). Marti *et al.* (2001), ao estudarem a marcação imunoistoquímica de EGF e EGFR, mostraram que o EGF e o seu receptor não são encontrados somente em associação com a membrana celular, mas também no citoplasma e núcleos de todos os tecidos de tireóide investigados. Este mesmo padrão encontrado nas lesões de LBs indica a necessidade de maiores investigações para elucidar a relação da marcação nuclear de EGF com o

comportamento das lesões. Diferentemente dos trabalhos descritos acima, a localização nuclear foi exclusiva do EGF, e não envolveu o receptor EGFR.

Finalmente, qual o significado do EGF salivar em pacientes com LBs, ainda que sem diferença estatística em relação aos controles? Poderia esta redução estar relacionada a uma menor capacidade de reparo dos tecidos? O EGF é um fator de crescimento, que ao interagir com o receptor EGFR, estimula várias vias relacionadas à carcinogênese, entre elas a da proliferação celular (Ohsima *et al.*, 2002). Em tecidos normais, ao estimular a proliferação celular o EGF contribui também para a manutenção da integridade tecidual e o reparo pós agressões (Noguchi *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1992). Por exemplo, a redução dos níveis de EGF pode ser observada em indivíduos apresentando quadro de úlceras no trato gastrointestinal, sugerindo que neste caso a proteína exerça papel protetor na mucosa desta região (Ino *et al.*, 1993). Em uma primeira análise portanto, os baixos níveis de EGF na saliva de pacientes com CCEB em comparação a pacientes controle foram considerados como indicativos de uma maior susceptibilidade da mucosa destes pacientes para o desenvolvimento tumoral (Bernardes *et al.*, 2010; Bernardes *et al.*, 2011), explicação que também poderia ser considerada no caso das LBs.

Entretanto, trabalhos mais recentes vem trazer novas explicações para o significado dos baixos níveis de EGF. Como fator de crescimento, os efeitos mitogênicos do EGF exibem uma curva dose resposta bifásica, ou não monotônica (curva U invertida). O EGF em baixas concentrações pode exercer efeito antagônico estimulando a atividade mitogênica e proliferativa,

enquanto altas doses de EGF inibem o crescimento celular e mesmo a apoptose (Zhang *et al.*, 2012). A base molecular para este efeito paradoxo do EGF é ainda desconhecida. Entretanto, trabalhos prévios utilizando células A431 (linhagem de carcinoma de células escamosas humano que super-expressa o receptor EGFR) demonstraram inibição do crescimento destas células quando estimuladas por altas concentrações de EGF, via expressão da quinase dependente de ciclina, p21 (WAF1/Cip1) (Jakus & Yeudall, 1996).

Este estudo mostrou não mostrou redução nos níveis salivares de EGF em pacientes com leucoplasias bucais. Associação do EGF tecidual com a multiplicidade das lesões foi demonstrada. A investigação do significado da redução do EGF na saliva e da sua expressão nuclear, além do acompanhamento e monitoramento do EGF salivar dos pacientes deste estudo são importantes na validação do EGF como biomarcador.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

1. Os níveis salivares de EGF dos pacientes com leucoplasias bucais não são diferentes dos níveis salivares dos pacientes controle. Assim, não é possível no momento indicar o EGF salivar como um biomarcador para leucoplasias bucais. Avaliação de amostras maiores e novas mensurações após o tratamento cirúrgico das lesões são importantes para a validação deste resultado.
2. Não houve associação entre as variáveis clínicas estudadas e os níveis salivares de EGF.
3. Em relação ao EGF tecidual e as variáveis clinicopatológicas estudadas, foi encontrada associação apenas com o número de lesões.
4. Não houve associação entre EGFR tecidual e EGF salivar, nem correlação entre EGF e EGFR.

REFERÊNCIAS

1. Bagán J, Scully C, Jimenez Y, Martorell M. Proliferative verrucous leukoplakia: a concise update. **Oral Diseases** 2010;16:328-332.
2. Balicki R, Grabowska SZ, Citko A. Salivary epidermal growth factor in oral cavity cancer. **Oral Oncol** 2005;41:48-55.
3. Banoczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. **J Maxillofac Surg** 1977;5:69-75.
4. Barnes L, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics. Head and neck tumours. **World Health Organization** 2005.
5. Berlanga-Acosta J, Gaviñondo-Cowley J, López-Saura P, González-López T, Castro-Santana M.D., López-Mola E, *et al.* Epidermal growth factor in clinical practice - a review of its biological actions, clinical indications and safety implications. **Int Wound J** 2009;6(5):331-346.
6. Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Silva TA, Aguiar MC. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: a case control study. **J Exp Clin Cancer Res** 2010;29(40):1-7.
7. Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Silva TA, Abreu MH, Aguiar MC. EGF in saliva and tumor samples of oral squamous cell carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2011;19(6):528–533.
8. Bouquot, JE, Whitaker SB. Oral Leukoplakia - Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or “phases”. **Quintessence International** 1994;25(2):133-140.
9. Brouns E, Baart JA, Karagozoglu KH, Aartman HA, Van der Waal I. Malignant

- transformation of oral leukoplakia in a well-defined cohort of 144 patients. **Oral Diseases** 2014;20:19-24.
10. Cabay RJ, Morton TH, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. **J Oral Pathol Med** 2007;36:255-261.
 11. Caldeira PC, Aguiar MC, Mesquita RA. Carmo MA. Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: comparative study of MLH1, p53 and AgNOR. **J Oral Pathol Med** 2011;40:305-311.
 12. Caldeira PC, Abreu MH, Carmo MA. Binary system of grading oral epithelial dysplasia: evidence of a bearing to the scores of an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med** 2012;41:452-453.
 13. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. **J Biol Chem** 1962;237:1555-1562.
 14. Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases** 2007;13:285- 290.
 15. Dresler CM, Gritz ER. Smoking, smoking cessation and the oncologist. **Lung Cancer** 2001;34(3):315-323.
 16. Dutta SK, Orestes M, Vengulekur S, *et al.* Ethanol and human saliva: effect of chronic alcoholism on flow rate, composition, and epidermal growth factor. **Am J Gastroenterol** 1992;87:350-354.
 17. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J Can Dent Assoc** 2002;68(10):617-621.
 18. Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. **Head Neck Oncol**

19. Feng L, Wang L. Effect of 2009;1:5.alcohol and the morphological and structural changes in oral mucosa. **Pak J Med Sci** 2013;29(4):1046-1049.
20. Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumor suppressor genes as “biomarkers” in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. **British J oral Maxillof Surg** 1998;36(4):252-260.
21. Greer RO. Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. **Otolaryngol Clin N Am** 2006;39:249-275.
22. Hansen LS, Olson JA, Silverman S. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1985;60(3):285-296.
23. Ho MW, Risk JM, Woolgar JA, Field EA, *et al.* The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. **Oral Oncology** 2012;48:969-976.
24. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology** 2006;42:461-474.
25. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral Malignant lesions: is a biopsy reliable? **J Oral Pathol Med** 2007;36:262-266.
26. Hsue SS, Wang WC, Chen CH, Lin CC, Lin LM. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **J Oral Pathol Med** 2007;36:25–29.
27. IARC. World cancer report: Mechanisms of tumor development, v351, 2003.
28. Ino M, Ushiro K, Ino C. Kinetics of epidermal growth factor in saliva. **Acta Otolaryngol Suppl** 1993;500:126-130.

29. Jakus J, Yeudall WA. Growth inhibitory concentrations of EGF induce p21 (WAF1/Cip1) and alter cell cycle control in squamous carcinoma cells. **Oncogene** 1996;12:2369-2376.
30. Johnson NW, Warnakulasuriya S, Tavassoli M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. **Eur J Cancer** 1996;5:5-17.
31. Kösevi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med** 2006;35:274-277.
32. Kramer IR, El-Lablan N, Lee KW. The clinical features and risk of malignant transformation in sublingual keratosis. **Br Dent J** 1978;144:171-180.
33. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol** 2006;42:987-993.
34. Kuribayashi Y, Tsushima F, Sato M, Morita KL, Omura K. Recurrence patterns of oral leukoplakia after curative surgical resection: important factors that predict the risk of recurrence and malignancy. **J Oral Pathol Med** 2012;41:682-688.
35. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, *et al.* Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. **Clin Cancer Res** 2000;6:1702-1710.
36. Lee JJ, Hung HC, Cheng SJ, *et al.* Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: Prevalence and risk factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006;101:472-480.
37. Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncol** 2000;36:145-151.

38. Liu W, Wang YF, Zhou HW, *et al.* Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. **BMC Cancer** 2010;10:685-689.
39. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. **J Oral Pathol Med** 2008;37:63-69.
40. Marti U, Ruchti C, Kampf J, *et al.* Nuclear Localization of Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptors in Human Thyroid Tissues. **Thyroid** 2001;11(2):137-145.
41. Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2006;15:774-781.
42. Mehrotra R. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. **Head Neck Oncol** 2011;1:33-39.
43. Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. **Oral Oncol** 2012;48:578-584.
44. Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, González-Navarro A, *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol** 2000;36:170-174.
45. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin** 2002;52(4):195-215.
46. Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. **Am J. Physiol** 1991;160:620-625.

47. O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Modjtahedi H, Eccles SA. The role of c-erbB receptors and ligands in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2002;38(7):627-40.
48. Ohshima M, Sato M, Ishikawa M, Maeno M, Otsuka K. Physiologic levels of epidermal growth factor in saliva stimulate cell migration of an oral epithelial cell line, HO-1-N-1. **Eur J Oral Sci** 2002;110:130-136.
49. Papadimitrakopoulou VA. Chemoprevention of head and neck cancer: an update. **Curr Opin Oncol** 2002;14(3):318-322.
50. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. **Oral Oncol** 2003;39:770-780.
51. Pierard-Franchimont C, Colige A, Arrese EJ, Lapiere CM, Pierard GE. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in nuclei of a subpopulation of keratinocytes and sweat gland cells. **Dermatologica** 1991;183:7-9.
52. Pindborg JJ, Jolst O, Renstrup G, Roed-Petersen B. Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. **J Am Dent Assoc** 1968;76:767-771.
53. Pink R, Simek J, Vandrakova J, Faber E, Michel P. Saliva as a diagnostic medium. **Biomedical Papers Olomouc** 2009;153(2):103-110.
54. Piscopo M, Campisi G, Collela G, Bilancione M, Caccamo S, Liberto CD, *et al.* H3 and H3.3 histone mRNA amounts and ratio in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. **Oral Diseases** 2006;12:130-136.
55. Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular

- markers in oral epithelial dysplasia: review. **J Oral Pathol Med** 2009;38:737-752.
56. Reibel J. Prognosis of oral premalignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med** 2003;14(1):47-62.
57. Ribeiro DC, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Bernardes VF, Abreu MH, Aguiar MC. Immunohistochemical expression of EGFR in oral leukoplakias: Association with clinicopathological features and cellular proliferation. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2011;17(5):739:744.
58. Roed-Petersen B. Cancer development in oral leukoplakia. Follow-up of 331 patients. **Journal of Dental Research** 1971;1(50):711-716.
59. Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notani Y, Totsuka Y, *et al.* High malignant transformation rate of widespread multiple oral leukoplakias. **Oral Diseases** 1999;5:15-19.
60. Schepman KP, Van der Meij EH, Smeele LE, Van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. **Oral Oncol** 1998;34: 270-275.
61. Scully C, Bagan JV. Recent advances in oral oncology 2008; squamous cell carcinoma imaging, treatment, prognostication and treatment outcomes. **Oral Oncol** 2009;45:25-30.
62. Shikhani AH, Matanoski GM, Jones MM, *et al.* Multiple primary malignancies in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1986;112:1172-1179.

63. Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of Epidermal Growth Factor Receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. **Cancer Res** 1994;54:3153-3159.
64. Shirasuna K, Hayashido Y, Sugiyama M, Yoshioka H, Matsuya T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1991;418:349-353.
65. Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. **Cancer** 1984;53:563-568.
66. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. **Cancer** 1953;6:963-968.
67. Smith J, Rattay T, McConkey T, Helliwel T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. **Oral Oncol** 2009;45:647-653.
68. Soini Y, Puhakka A, Kahlos K, Saily M, Paakko P, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology** 2001;39(2):179-186.
69. Soukos NS, Hamblin MR, Keel S, Fabian RL, Deustch TF, Hasan T. Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer *in vivo*. **Cancer Res** 2001;61:4490-4496.
70. Streckfus CF, Bigler RL. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Diseases**

2002;8(2):69-76.

71. Takashi J, Makoto I, Katsumi K, Yokoyama Y, Takeuchi T, Tanaka R. Physiological concentrations of human epidermal growth factor in biological fluids: use of a sensitive enzyme immunoassay. **Clinica Chimica Acta** 1986;158:81-90.
72. Thesleff I., Viinikka L., Saxen L., Lehtonen E., Perheentupa J. The parotid gland is the main source of human salivary epidermal growth factor. **Life Science** 1988;43(1):13-18.
73. Van der Waal I, Schepman KP, Van der Meij HE, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological Review. **Oral Oncol** 1997;33(5):291-301.
74. Van der Waal I, Schepman KP, Van der Meij HE. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. **Oral Oncol** 2000;36(3):264-266.
75. Van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol** 2009;45(4-5):317-323.
76. Wang SL, Milles M, Wu-Wang CY, *et al.* Effect of cigarette smoking on salivary epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human buccal mucosa. **Toxicology** 1992;75:145-157.
77. Warnakulasuriya S, Johnson NW, Van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med** 2007;36:575-580.
78. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med** 2008;37:127-133.

79. Warnakulasuriya S, Kovacevic T, Madden P, *et al.* Factors predicting malignant transformation in oral potentially malignant disorders among patients accrued over a 10-year period in South East England. **J Oral Pathol Med** 2011;40:677-683.
80. Zhang XT, Meng J, Wang Z-Y. A switch role of Src in the biphasic EGF signaling of ER-negative breast cancer cells. **Plos ONE** 2012;7(8):1-8.

ANEXOS

Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Projeto: CAAE –07330712.5.0000.5149

Interessado(a): Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia
Odontológica
Faculdade de Odontologia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de setembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado "Quantificação do EGF na saliva e em lesões de pacientes com leucoplasias bucais: estudo caso-controle" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo 2 - Dados individuais dos pacientes com leucoplasia bucal.

Caso	Idade/gênero*	Localização	Aspecto clínicos	Número de lesões	Tempo de evolução	Tamanho	Tabagismo	Etilismo	Displasia epitelial
1	88/F	Baixo risco	Homogênea	1	6 anos	2-4 cm	Não	Não	Com atipia
2	73/M	Alto risco	Homogênea	2	4 anos	2-4 cm	Não	Não	Sem atipia
3	80/F	Baixo risco	Não homogênea	1	Indeterminado	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
4	58/M	Baixo risco	Homogênea	4	Indeterminado	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
5	70/M	Baixo risco	Homogênea	2	2 meses	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
6	67/F	Alto risco	Homogênea	1	Indeterminado	< 2 cm	Não	Sim	Sem atipia
7	67/M	Baixo risco	Homogênea	1	20 dias	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
8	73/M	Baixo risco	Homogênea	1	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Sim	Sem atipia
9	67/M	Baixo risco	Não homogênea	1	3 anos	> 4 cm	Não	Não	Sem atipia
10	61/F	Alto risco	Não homogênea	2	5 anos	< 2 cm	Não	Não	Com atipia
11	39/M	Baixo risco	Homogênea	2	4 meses	> 4 cm	Sim	Sim	Sem atipia
12	57/F	Baixo risco	Não homogênea	3	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Não	Sem atipia
13	73/F	Baixo risco	Não homogênea	1	Indeterminado	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
14	58/F	Baixo risco	Homogênea	1	1 ano	< 2 cm	Sim	Sim	Com atipia
15	68/F	Baixo risco	Homogênea	3	Indeterminado	2-4 cm	Não	Sim	Sem atipia
16	78/F	Alto risco	Homogênea	1	2 meses	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
17	52/M	Baixo risco	Homogênea	2	3 meses	< 2 cm	Sim	Sim	Sem atipia
18	59/F	Baixo risco	Homogênea	2	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Sim	Sem atipia
19	46/M	Baixo risco	Homogênea	2	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Sim	Sem atipia
20	49/M	Baixo risco	Homogênea	2	Indeterminado	2-4 cm	Sim	Sim	Sem atipia
21	73/M	Baixo risco	Homogênea	2	Indeterminado	< 2 cm	Não	Sim	Sem atipia
22	47/M	Baixo risco	Homogênea	3	Indeterminado	> 4 cm	Sim	Não	Sem atipia
23	30/M	Baixo risco	Homogênea	3	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Sim	Com atipia
24	75/M	Baixo risco	Homogênea	3	Indeterminado	> 4 cm	Sim	Não	Sem atipia
25	61/M	Baixo risco	Homogênea	1	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Não	Com atipia
26	55/M	Baixo risco	Homogênea	3	Indeterminado	> 4 cm	Não	Sim	Sem atipia
27	62/F	Baixo risco	Homogênea	1	Indeterminado	< 2 cm	Sim	Sim	Com atipia
28	61/F	Baixo risco	Homogênea	3	Indeterminado	> 4 cm	Não	Não	Com atipia
29	56/M	Baixo risco	Homogênea	4	Indeterminado	2-4 cm	Sim	Sim	Sem atipia
30	50/F	Baixo risco	Homogênea	2	Indeterminado	> 4 cm	Não	Sim	Sem atipia
31	69/M	Alto risco	Não homogênea	4	Indeterminado	< 2 cm	Não	Não	Sem atipia
32	56/F	Alto risco	Não homogênea	2	14 dias	2-4 cm	Não	Não	Sem atipia

*M, masculino; F, feminino

APÊNDICES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento tem como finalidade convidar você para participar do projeto de pesquisa intitulado “**QUANTIFICAÇÃO DO EGF NA SALIVA E EM LESÕES DE PACIENTES COM LEUCOPLASIAS BUCAIS: ESTUDO CASO-CONTROLE**”. A leucoplasia bucal é uma lesão da boca que pode em algumas situações evoluir para o câncer. Esta evolução depende de várias características da lesão e de hábitos do paciente. Além disso, a redução de uma proteína na saliva, o fator de crescimento epitelial, EGF, pode também estar associado ao risco de desenvolvimento do câncer. Este projeto de pesquisa tem como objetivo quantificar os níveis de EGF em amostras de saliva e identificar esta proteína também em amostras de biópsias de leucoplasias bucais.

Para esse estudo, precisamos coletar amostras de sua saliva. A coleta será realizada antes do tratamento proposto pelo profissional responsável e seis meses após os procedimentos realizados. Este procedimento não causa dor nem interfere com o seu tratamento. Também utilizaremos as amostras da lesão removida de sua boca neste estudo, mas isto não representa um procedimento extra nem interferirá com o diagnóstico final. O uso do material poderá acarretar o desgaste total da amostra, impossibilitando uma nova avaliação no futuro. No entanto, o Laboratório de Patologia Bucal somente irá liberar este material para pesquisa após a confirmação do diagnóstico. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor a doença e num futuro próximo, poderemos tratá-la de uma maneira mais eficaz. Você não terá nenhum custo por participar e poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento se assim o desejar. O seu atendimento e tratamento independe da sua participação nesta pesquisa, estando você livre para aceitar nosso convite.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a coleta de saliva e a utilização dos fragmentos de lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento que necessito.

Nome Completo: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

Pesquisadores: Filipe Jaeger / Maria Cássia Ferreira de Aguiar (Orientadora).

Telefones: (31) 3499-2479 / (31) 9210-2150.

(Assinatura de um dos pesquisadores)

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).
COEP através do telefone: (31) 3409-4592.

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005
Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG – Brasil, CEP: 31270-901

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento tem como finalidade convidar você para participar do projeto de pesquisa intitulado **“QUANTIFICAÇÃO DO EGF NA SALIVA E EM LESÕES DE PACIENTES COM LEUCOPLASIAS BUCAIS: ESTUDO CASO-CONTROLE”**. A leucoplasia bucal é uma lesão da boca que pode em algumas situações evoluir para o câncer. Esta evolução depende de várias características da lesão e de hábitos do paciente. Além disso, a redução de uma proteína na saliva, o fator de crescimento epitelial, EGF, pode também estar associado ao risco de desenvolvimento do câncer. Estudos recentes evidenciam que o fator de crescimento epidérmico (EGF) pode ser um fator protetor contra injúrias aos tecidos e a sua diminuição pode estar associada ao risco de transformação maligna.

Este projeto de pesquisa tem como objetivo quantificar os níveis de EGF em amostras de saliva e identificar esta proteína também em amostras de biópsias de leucoplasias bucais.

Você fará parte do grupo “controle. O grupo controle compreende indivíduos sem a doença, e que fazem parte do estudo com a finalidade de comparação com os nossos resultados.

Para esse estudo, precisamos coletar amostras de saliva, colocando-a em frasco próprio. Este procedimento não causa dor nem interfere com o seu tratamento.

A não participação na pesquisa não o exclui do direito de ser tratado em caso de necessidade por algum motivo. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor a doença e num futuro próximo, poderemos tratá-la de uma maneira mais eficaz.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a coleta de saliva para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento que necessito.

Nome Completo: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

Pesquisadores: Filipe Jaeger / Maria Cássia Ferreira de Aguiar (Orientadora).


Telefones: (31) 3499-2479 / (31) 9210-2150.

(Assinatura de um dos pesquisadores)

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).

COEP através do telefone: (31) 3409-4592.

Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005
Campus Pampulha, Belo Horizonte – MG – Brasil, CEP: 31270-901

	Departamento de Odontologia Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial da FOUFG Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha – Sala 3202 Belo Horizonte - MG - CEP: 31270-90 Telefone: (31) 3409-2479	Número do Exame Histológico:
		Número de Controle da Pesquisa
		Data da Coleta:
O PREENCHIMENTO COMPLETO DA FICHA É OBRIGATÓRIO		
DADOS DO PACIENTE		
Paciente Caso: <input type="checkbox"/> Paciente Retorno com lesão: <input type="checkbox"/> Paciente Retorno sem lesão: <input type="checkbox"/> Paciente Controle <input type="checkbox"/>		
Data do último retorno: ___/___/___		
Diagnóstico prévio de Leucoplasia? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Data do Diagnóstico: ___/___/___ Tempo que recebeu o diagnóstico: _____ dias		
Nome completo:		Profissão:
Gênero:	Idade:	Cor: <input type="checkbox"/> Leucoderma <input type="checkbox"/> Feoderma <input type="checkbox"/> Melanoderma
Endereço:		Telefone residencial: Telefone celular: E-mail:
Tabagismo:		Tempo de Fumante: _____ Número médio de cigarros/dia: _____
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Tipo de Cigarro que fuma: _____
<input type="checkbox"/> Ex-Tabagista	Tempo como Fumante: _____	Tempo que parou de fumar: _____
	Tipo de Cigarro que fumava: _____	Número médio de cigarros/dia que fumava: _____
Bebida alcóolica:		Frequência: _____ Quantidade: _____
<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		Tipo de Bebida: _____
DADOS DO REMETENTE		
<input type="checkbox"/> Departamento de Odontologia da UFMG	Número de Registro na Instituição Remetente: _____	
<input type="checkbox"/> Departamento de Odontologia da PUC Minas	Disciplina: _____	
<input type="checkbox"/> Serviço de Estomatologia do HMOB		
Nome do Professor/Profissional:		
Nome completo do Aluno:		
DADOS DO MATERIAL COLETADO		
Tipo(s) de Material(s):		
Saliva: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não		
Tecido Mole: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Biópsia Incisional <input type="checkbox"/> Biópsia Excisional		

Características Gerais da Lesão:

Número de Lesões: _____ (Ausente = 0)

Sintomas: Sim Não **Informação adicional:**

Tipo/Aspecto da Leucoplasia:

Heterogênea

Mancha Placa Verrucosa Outra (especificar): _____

Tempo de evolução: _____ dias Indeterminado

Manifestação: Primária Secundária Recorrente

Localização da(s) lesão(ões) - Detalhar

Tamanho da(s) lesão(ões) em mm:

Informações adicionais:

Hipóteses diagnósticas:

MACROSCOPIA

Data: ____/____/____ Responsável: _____

MICROSCOPIA:

Revisão das Lâminas de HE? Sim Não

Diagnóstico: _____

Displasia: Sim Não

Grau de Displasia: Leve Moderada Severa Carcinoma *in situ*

Patologista

PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À DISSERTAÇÃO

- **17th International Congress on Oral Pathology and Medicine (IAOP) – 25 a 30/05/2014**
- Co-autoria no pôster intitulado: EGF in saliva and tissue samples of oral leukoplakia. Autores: Jaeger F, Assunção AC, Caldeira PC, Bernardes VF, Queiroz-Junior CM, Aguiar MC*
- Local: Istambul – Turquia

- **XII Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG – 08 a 10/05/2014**
- Apresentação do pôster intitulado: Quantificação do EGF na saliva de pacientes com leucoplasias bucais: estudo caso-controle. Autores: Filipe Jaeger*, Ana Carla Assunção, Patrícia Carlos Caldeira, Vanessa Fátima Bernardes, Celso Martins Queiroz-Junior, Maria Cássia Ferreira de Aguiar
- Local: Belo Horizonte – MG

- **Submissão de artigo científico em periódico internacional**
- Jaeger F, Assunção AC, Caldeira PC, Bernardes VF, Queiroz-Junior CM, Aguiar MC. Is the salivary epidermal growth factor a biomarker for oral leukoplakia?
- Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology - 2014

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NÃO RELACIONADA À DISSERTAÇÃO

- **Participação em banca de Monografia do curso de Especialização em Estomatologia – 06/06/2014**
- Título: Considerações no tratamento de Ameloblastomas – Revisão de literatura
- Aluno: Fábio Luis Libânio Guimarães
- Orientador: Marcelo Drummond Naves

- **Participação em banca de Monografia do curso de Especialização em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial - 26/08/2013**
- Título: Restauração dentoalveolar imediata: revisão de literatura e relato de casos
- Aluno: Luiz Felipe Silva Novy
- Orientador: Bruno Pereira Campanha

- **Submissão de artigo científico em periódico internacional**
- Jaeger F, Capistrano HM, Caldeira PC, Carmo MV, Mesquita RA, Aguiar MC. Oral Spindle Cell Lipoma in a Rare Location: Differential Diagnosis
- Pathologica – 2013

- **Co-autoria de artigo científico submetido em periódico internacional**
- Gonçalves AS, Arantes DC, Bernardes VF, Jaeger F, Silva JM, Silva TA, Aguiar MC, Batista AC. Immunosuppressive mediators of oral squamous cell carcinoma in tumour samples and saliva.
- Human Immunology - 2014