

**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/mTOR,
CICLO CELULAR E APOPTOSE EM PACIENTES
PORTADORES DE ESTOMATITES ASSOCIADAS AO
USO DE EVEROLIMO**

MATHEUS HENRIQUE ALVES DE LIMA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências.**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves

**Co-Orientadores: Dra. Glauca Noeli Maroso
Hajj, Dr. Vladmir Claudio C.
de Lima**

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lima, Matheus Henrique Alves de
Análise das proteínas da via PI3K/mTOR, ciclo celular e apoptose em pacientes portadores de estomatites associadas ao uso de everolimo / Matheus Henrique Alves de Lima - São Paulo, 2019.
59p.
Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Fábio de Abreu Alves

Descritores: 1. Estomatite/Stomatitis. 2. Everolimo/Everolimus. 3. Apoptose/Apoptosis. 4. Ciclo Celular/Cell Cycle. 5. Estudos prospectivos/Prospective Studies. 6. Imunofluorescência/Fluorescent Antibody Technique. 7. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 8. Proteína mTOR/mTOR Protein

DEDICATÓRIA

Dedico, primeiramente, aos meus pais, Givanildo e Myrna, por estarem sempre ao meu lado, lutando comigo, me apoiando em todos os momentos e decisões, não me deixando desanimar e nunca medindo esforços para que meus sonhos fossem realizados. Dedico também a minha irmã, Mariana, e as minhas amadas avós, Maria José e Rosalva. Por fim, e não menos importante, a todos que ajudaram na construção deste sonho. Esta vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus. Pois, Ele, com sua destra, me sustentou, guardou e me fez com que nunca desanimasse durante todo este período. A Ele seja dado todo louvor, honra e glória.

Agradeço imensamente aos meus mestres e orientadores por toda confiança e por esta oportunidade que me foi dada. Ao Dr. Fabio, à Dra. Glaucia e ao Dr. Vladimir, muito obrigado por tudo!

Aos membros do departamento de estomatologia, oncologia clínica e laboratório de biologia tumoral e biomarcadores do A.C.Camargo Cancer Center, muito obrigado por toda atenção cedida, colaboração, ajuda e ensinamentos durante este período.

Aos membros do departamento de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center, em especial a Dra. Maria Dirlei Begnami, Severino, Fatinha, Si, Rômulo e Marina, muito obrigado por todo auxílio e ajuda que nos foram disponibilizados durante este estudo. Vocês foram essenciais para a concretização desta dissertação.

Aos membros da pós-graduação e biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center, em especial à Suely, Cássia, Karla, Cintia, Luciana e Deborah. Obrigado!

À Dra. Graziella Chagas Jaguar e à Dra. Camila Gallo, obrigado por todas as sugestões e por sua disponibilidade a partir do momento em que aceitaram fazer parte da banca de qualificação desta dissertação.

Ao Dr. Vinicius Calsavara por toda sua disponibilidade e atenção desde a formulação do banco de dados até a entrega dos resultados estatísticos finais aqui presentes nesta dissertação. Obrigado!

Aos colegas do laboratório de biologia tumoral e biomarcadores, principalmente, às grandes amigas: Danielle, Fernanda Lupinacci, Fernanda Ferreira, Barbara, Denise e Júlia, muito obrigado! Todos vocês foram peças chaves no meu aprendizado e me ajudaram a construir este sonho. Levarei para sempre os bons momentos.

Aos amigos que foram feitos durante esta jornada, em especial: Marianna, Erica, Monize, Alexcia, Emne, Bianca e Juliana, muito obrigado! Saibam que uma pausa no meio da tarde para um café e uma conversa, ou até mesmo um rápido momento de descontração, foram reanimadores para seguir em frente em um dia difícil. Muito obrigado!

À Prof. Sonia Maria Soares Ferreira, por despertar em mim a sede do conhecimento, da pesquisa e do amor a estomatologia, não somente com o olhar clínico (profissional-paciente) mas com o olhar do coração. Muito obrigado por tudo desde o início.

Aos meus grandes amigos de infância, alguns presentes em São Paulo, outros a quilômetros de distância em Maceió, muito obrigado! Obrigado por entender a minha ausência em momentos especiais (noivados, aniversários, formaturas e etc). Obrigado também, apesar da distância física, por estarmos sempre perto e conectados. Vocês são demais e são para sempre!

Aos meus pais, a minha irmã, as minhas avós e aos meus familiares que vibram comigo mais uma etapa concluída não tenho palavras para agradecer. Amo muito vocês! Muito obrigado por tudo! Minha gratidão será eterna!

Aos pacientes envolvidos neste estudo. Pois, sem eles e sua disponibilidade, não seria possível a conclusão desta dissertação. Muito obrigado!

E, por fim, a CAPES pela concessão da bolsa. Obrigado!

RESUMO

Lima MHA. **Análise das proteínas da via PI3K/mTOR, ciclo celular e apoptose em pacientes portadores de estomatites associadas ao uso de everolimo.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O Everolimo é um fármaco antitumoral que inibe a atividade da via mTOR (*mammalian target of rapamycin* - alvo da rapamicina em mamíferos) por meio da sua interação com o receptor intracelular. A relação desta via com o crescimento e proliferação de células tumorais e a neoangiogênese em tumores sólidos é bem estabelecida. Portanto, o everolimo tem sido utilizado, principalmente, para o controle do câncer de mama, rim e neuroendócrino em estádios avançados. Estudos recentes têm evidenciado o desenvolvimento de lesões orais, semelhantes a ulcerações da estomatite aftosa recorrente. De acordo com a literatura, a nomenclatura mais adequada para estas lesões é Estomatite Associada aos Inibidores de mTOR (EAlm). Contudo, a etiologia da EAlm ainda não foi devidamente compreendida. **Objetivos:** Realizar o levantamento do perfil epidemiológico de pacientes que usaram everolimo e identificar possíveis alterações, através da análise das proteínas da via PI3K/mTOR, ciclo celular e apoptose, que possam estar associadas com o desenvolvimento destas lesões em cavidade oral. **Metodologia:** Inicialmente foram coletadas e analisadas informações dos prontuários dos pacientes que fizeram uso de everolimo e que estavam em acompanhamento com o núcleo de oncologia clínica do A.C.Camargo Cancer Center. Em uma segunda parte foi realizado um estudo prospectivo, onde foram avaliados 12 pacientes com diagnóstico de câncer de mama, rim e neuroendócrino, que usaram everolimo. Estes pacientes foram avaliados em dois momentos: antes de iniciar e quatorze dias após o início do everolimo. Os pacientes com EAlm foram submetidos a biópsia para análise histológica e realização de painéis imunohistoquímicos

e imunofluorescência. Paralelamente, ensaios de viabilidade e morte celular, migração e proliferação e análise das proteínas da via PI3K/mTOR através do *Western-Blot* com Queratinócitos Orais Displásicos (QOD) em cultura celular foram realizados em triplicatas. As frequências foram comparadas pelo teste exato de Fisher ou teste de McNemar. Os testes de log-rank e Wilcoxon foram empregados para comparar o tempo ao desenvolvimento das EAlm. ANOVA multivariada foi usada para comparar os resultados de experimentos *in vitro*. O SPSS e o Image J foram os softwares utilizados para a realização das análises estatísticas. **Resultados:** Dados de 129 prontuários de pacientes que fizeram uso do everolimo foram avaliados. Destes 129, 97 pacientes eram do sexo feminino e 32 do sexo masculino. A idade média foi de 57,02 anos de idade. A população estudada, em sua maioria, era constituída por mulheres com câncer de mama em estádios clínicos avançados (IV). A prevalência das estomatites associadas ao uso de everolimo foi de 33,3%. Pacientes com câncer de mama em uso de everolimo associado ao exemestano tiveram um risco aumentado em 2,34 vezes em desenvolver EAlm, quando comparados aos pacientes com câncer de rim e neuroendócrino e em uso exclusivo de everolimo. Em relação ao estudo prospectivo, foram acompanhados 12 pacientes nos momentos previamente descritos. Destes 12, 11 eram do sexo feminino e 1 do sexo masculino. A idade média foi de 59,09 anos. Destes 12, 09 desenvolveram EAlm. O tempo médio para o surgimento da primeira lesão foi de 21 dias. Foram realizados 3 procedimentos de biopsia das lesões e em seguida os espécimes foram encaminhados para análise histológica e imunohistoquímica. Os cortes histológicos revelaram fragmento de tecido epitelial com área de ulceração e intenso infiltrado inflamatório para todos os espécimes. Alterações significativas não foram observadas no estudo imunohistoquímico. Por fim, os experimentos *in vitro* demonstraram que a associação do everolimo com exemestano reduziu a viabilidade e inibiu a capacidade de migração celular (cicatrização) de QOD em comparação a QOD tratados apenas com everolimo ou exemestano. E, não foram observadas alterações na análise das proteínas desta via estudada.

Conclusão: Sendo assim, observamos que pacientes em uso de everolimo associado ao exemestano possuem uma maior predisposição ao desenvolvimento de EAlm e que os estudos *in vitro* sugerem um maior dano ao epitélio oral quando há associação destas drogas.

Palavras-chaves: Estomatite. Everolimo. Apoptose. Ciclo Celular. Estudos Prospectivos. Imunofluorescência. Imuno-Histoquímica. Proteína mTOR

SUMMARY

Lima MHA. **[Analysis of the proteins of the PI3K/mTOR pathway, cell cycle and apoptosis in patients with everolimus-associated stomatitis]**. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Everolimus is an antitumor drug that inhibits the activity of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway through its interaction with the intracellular receptor. The relationship of this pathway with the growth and proliferation of tumor cells and neoangiogenesis in solid tumors is well established. Therefore, everolimus has been used mainly for the control of advanced breast, kidney and neuroendocrine cancers. Recent studies have shown the development of oral lesions, similar to ulcerations of recurrent aphthous stomatitis. According to the literature, the most suitable nomenclature for these lesions is mTOR inhibitor-associated stomatitis (mIAS). The etiology of mIAS has not yet been properly understood.

Objectives: To describe the epidemiological profile of patients who used everolimus and to identify possible alterations, through the analysis of PI3K/mTOR pathway proteins, cell cycle and apoptosis, which may be associated with the development of mIAS. **Methodology:** Initially, medical records from patients who used everolimus and were followed up with the clinical oncology of the A.C.Camargo Cancer Center were analyzed. In a second part, a prospective study was conducted with 12 patients with breast, kidney and neuroendocrine cancer who used everolimus. These patients were evaluated in two moments: before starting and fourteen days after the onset of everolimus. The patients with mIAS underwent biopsy for histological, immunohistochemical and immunofluorescence analysis. In parallel, dysplastic oral keratinocytes (DOK) were cultured and assays of cell viability, migration and proliferation were conducted, and PI3K/mTOR pathway proteins were analyzed through Western Blot in triplicates. Frequencies were compared by Fisher's exact test or McNemar's test. The

log-rank and Wilcoxon tests were used to compare the time to the develop mIAS. Multivariate ANOVA compared the results of the in vitro experiments. SPSS and Image J performed the statistical analyzes. **Results:** Data from 129 medical records were analyzed. Of these, 97 patients were female and 32 were male. The mean age was 57.02 years. Most patients were women with advanced breast cancer (stage IV) and the prevalence of mIAS was 33.3%. Breast cancer patients treated with everolimus plus exemestane had a 2.34-fold increased risk of developing mIAS, when compared to patients with kidney and neuroendocrine cancer (treated exclusively with everolimus). In relation to the 12 patients of the prospective study, 11 were females and 1 was male. The mean age was 59.09 years and 9 of the patients developed mIAS. The first lesions appeared in a mean time of 21 days. Three biopsies were performed on the lesions and the specimens were submitted to histological and immunohistochemical analysis. All sections revealed epithelial tissue with ulcerated area and intense inflammatory infiltrate. No significant changes were observed in the immunohistochemical analysis. In vitro experiments showed that DOK treated with everolimus plus exemestane reduced cell viability and inhibited cell migration (wound healing) compared to those treated with everolimus or exemestane alone. No changes were observed in the analysis of the proteins of this pathway. **Conclusion:** Everolimus plus exemestane increases the chances of patients to develop mIAS and the in vitro experiments suggest a greater damage to the oral epithelium when there is an association of these drugs.

Keywords: Stomatitis. Everolimus. Apoptosis. Cell Cycle. Prospective Studies. Fluorescent Antibody Technique. Immunohistochemistry. mTOR Protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A via mTOR.....	4
Figura 2	Ação do everolimo e exemestano na via mTOR (BOLERO-2).	10
Figura 3	Efeitos colaterais	28
Figura 4	Curva de risco	31
Figura 5	Apresentação clínica das EAlm	33
Figura 6	Painéis histológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos dos espécimes biopsiados	35
Figura 7	Painel de imunofluorescência pelo método de TUNNEL.....	37
Figura 8	Curvas de tratamento.....	39
Figura 9	Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	40
Figura 10	Painel do ensaio de migração celular	41
Figura 11	Ensaio de migração celular	42

Figura 12 Avaliação dos efeitos de rapamicina e exemestano sobre os receptores 4E-BP, p70S6K1 e ciclina D1 por *Western blot*..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados clínicos dos 129 pacientes que utilizaram everolimo. 26

Tabela 2 Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com EAlm.....
27

Tabela 3 Associação entre a presença de estomatites e as variáveis do
estudo 29

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

4E-BPs	eIF4E-binding proteins
5'UTR	Untranslated region
AGC	Quinase da família da proteína G
AKT	Proteína quinase A
BSA	Proteína albumina bovina
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAI_m	Estomatite associada aos inibidores de mTOR
EDTA	1,2-diaminoetano
eEF2	Elongation factor 2
eEF2K	Elongation factor 2 kinase
EGTA	Ácido egtálico
eIF4A	Eukaryotic translation initiation factor 4A
eIF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EUA	Estados Unidos da América
EVE	Everolimo
EXE	Exemestano
FKBP12	Proteína de ligação FKBP
GAP	Guanine triphosphatase Activating Protein
GRheb	Ras enriched in brain
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mSIN1	Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> - alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
NaCl	Cloreto de sódio
NCI	National Cancer Institute

p70S6K	p70 S6 kinase
PBS	Tampão fosfato-salino
PCB	Placebo
PDK1	3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PI3K	fosfatidylinositol 3-kinase
PIP3	fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfatos
PRAS40	40 kDa proline-rich Akt substrate
PROTOR	Protein observed with RICTOR
QOD	Queratinócitos orais displásicos
RAPTOR	Regulatory associated protein of mTOR
RICTOR	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
TBS	Buffer-salino
TBS-T	Tris buffer-salino
TNM	Tumor, nodes & methastasis
Tris-NaCl	Tri-cloreto de sódio
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
α	Alfa
β	Beta

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A via mTOR	2
1.2	Inibidores de mTOR	5
1.3	Estomatites associadas aos inibidores de mTOR	7
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	Caracterização do estudo.....	13
3.2	Seleção dos pacientes	13
3.3	Critérios de inclusão	13
3.4	Critérios de exclusão	14
3.5	Recrutamentos	14
3.6	Levantamento epidemiológico	15
3.7	Biópsias.....	15
3.7.1	Protocolo para imunohistoquímica	16
3.7.2	Protocolo para imunofluorescência	16
3.8	Cultura celular	18
3.8.1	Viabilidade celular por MTT	19
3.8.2	Migração celular	20
3.8.3	Western Blotting	22
3.9	Análise estatística.....	24
4	RESULTADOS.....	25
4.1	Levantamento epidemiológico	25
4.2	Estudo prospectivo	31
4.3	Análise histológica, histoquímica, imunohistoquímica e	

	imunofluorescência.....	33
4.4	Cultura celular	38
4.4.1	Viabilidade celular por MTT	38
4.4.2	Migração celular	41
4.4.3	Western Blotting	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	52
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética-CEP

Anexo 2 Parecer de Aprovação de Emenda do Comitê de Ética

Anexo 3 Artigo Publicado

Anexo 4 Estudo Piloto

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Apêndice 2 Ficha de Coleta de Dados Clínico

1 INTRODUÇÃO

Segundo estimativas do National Cancer Institute (NCI), para o ano de 2019, 1.762.594 novos casos de câncer serão diagnosticados nos Estados Unidos da América (EUA) (SIEGEL et al. 2019). No Brasil, para o ano de 2018, foram estimados, aproximadamente, 635 mil novos casos de câncer. Destes, cerca de 330 mil corresponderam a novos casos de câncer em indivíduos do sexo masculino e 310 mil corresponderam a novos casos de câncer em indivíduos do sexo feminino. Sendo a neoplasia maligna da mama feminina a mais comum entre as mulheres (29,5%) e a neoplasia maligna da próstata a mais comum entre os homens (31,7%) (Ministério da Saúde 2018).

Inicialmente, a cura é o principal objetivo do tratamento oncológico. Contudo, para tumores em estádios clínicos avançados, o controle da doença torna-se o principal objetivo. Desta forma, o desenvolvimento de drogas antineoplásicas e o advento das terapias-alvo têm melhorado sensivelmente as taxas de sobrevida para estes pacientes (LEBWOHL et al. 2011, 2013).

Dentre estas novas drogas, o everolimo, um inibidor seletivo de mTOR (*mammalian target of rapamycin* - alvo da rapamicina em mamíferos), que tem apresentados resultados promissores para tumores de mama, rim e neuroendócrino em estádios clínicos avançados. Porém, efeitos colaterais relacionados a esta droga são comuns.

1.1 A VIA MTOR

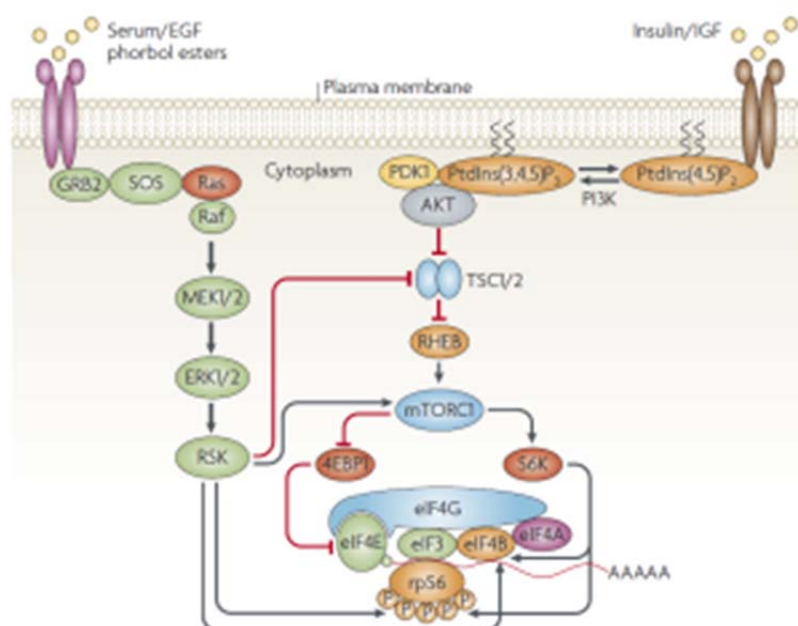
A via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR tem sido considerada uma via regulatória fundamental nos processos de tradução que envolvem proliferação, migração, invasão, crescimento, diferenciação, sobrevivência e metabolismo celular (CORRADETTI e GUAN 2006; MENG et al. 2006; KOUL 2008; WONG et al. 2010). A via mTOR está inserida dentro do complexo da via PI3K/AKT/mTOR e pode formar dois novos complexos com funções diferentes: mTORC1 e mTORC2. As proteínas “Regulatory associated protein of mTOR” (RAPTOR) e “40 kDa proline-rich Akt substrate” (PRAS40) são específicas de mTORC1. Já as proteínas “rapamycin-insensitive companion of mTOR” (RICTOR), “mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1” (mSIN1) e “protein observed with RICTOR” (PROTOR) são específicas de mTORC2. Enquanto mTORC2 é responsável pela fosforilação de alguns membros do grupo de quinases AGC, como AKT (S473), e tem sido relacionado ao controle do citoesqueleto, mTORC1 é um complexo bem caracterizado como um regulador da tradução (ZONCU et al. 2011).

A via melhor caracterizada que leva à ativação de mTORC1 é a que começa com a ativação da quinase de lipídeos “phosphatidylinositol 3-kinase” (PI3K), que gera fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfatos (PIP3). PIP3 recruta “3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1” (PDK1) e AKT para a membrana plasmática, facilitando a fosforilação da treonina 308 de AKT pela PDK1. Após sua ativação, AKT fosforila a proteína TSC2, que junto

com a proteína TSC1, formam o “tuberous sclerosis complex” (TSC). A fosforilação de TSC2 inibe a atividade de “guanine triphosphatase activating protein” (GAP) para a proteína pequena G Rheb (“Ras enriched in brain”). Como a atividade de mTOR é fortemente estimulada por Rheb•GTP, é necessária a inativação de TSC2 para a ativação de mTORC1.

Os principais alvos da via mTORC1 são as proteínas “eIF4E-binding proteins” (4E-BPs) e a “p70 S6 kinase” (p70S6K). Em sua forma hipofosforilada, as proteínas 4E-BPs unem o fator de início da tradução eIF4E, necessário para a formação do complexo eIF4F, inibindo assim o início da tradução. Por outro lado, a forma fosforilada de 4E-BP, diminui a afinidade por eIF4E, permitindo assim a formação de eIF4F e o início da tradução (RICHTER e SONENBERG 2005; MAMANE et al. 2006).

Além disso, mTORC1 também fosforila diretamente S6K, o que leva a sua ativação. O principal alvo de S6K é a proteína ribossomal S6 (rpS6), no entanto, o papel desse evento sobre o controle da tradução não está bem esclarecido (RUVINSKY e MEYUHAS 2006). Outros substratos de S6K têm influência direta sobre o controle da síntese de proteínas, como por exemplo, o fator de início de tradução eIF4B. Quando fosforilado, eIF4B estimula a atividade de helicase de eIF4A, importante para o “scanning” da 5'UTR (“untranslated region”) do mRNA durante o início da tradução (RAUGHT et al. 2004). Outro substrato da S6K é a “elongation factor 2 kinase” (eEF2K) que, quando fosforilada inativa-se, permitindo a desfosforilação e consequente ativação de eEF2, o que estimula a fase de alongação (WANG 2001).



Fonte: ANJUM e BLENIS (2008).

Figura 1 – A via mTOR. PI3K ativada por RTKs, fosforila PIP2 para produzir PIP3, que serve como um sinal para a ancoragem na membrana de Akt/PKB e PDK1 (quinase fosfatidilinositol-dependente 1). PDK1 fosforila Akt no resíduo Thr308 e a ativa. A fosfatase de lipídeos PTEN desfosforila PIP3, impedindo a ativação de Akt. Após sua ativação, Akt fosforila a proteína TSC1 e 2, que formam o *tuberous sclerosis complex* (TSC). A fosforilação de TSC2 inibe a sua atividade de *guanine triphosphate* (GTP)ase activating protein (GAP) para a proteína pequena G Rheb (*Ras enriched in brain*). Rheb por sua vez, promove a ativação de mTOR e sua sinalização para os alvos 70 kDa proteína ribossomal S6 quinase (S6K) e *eIF4E-binding protein-1* (4EBP1). A via de sinalização de Ras/ERK1/2 também ativa a maquinaria de tradução através de um mecanismo dependente de RSK. A proteína quinase RSK fosforila TSC2 e raptor, ativando mTORC1 e rpS6, uma proteína da subunidade 40S dos ribossomos, o fator de início de tradução eIF4B para promover a tradução cap-dependente.

Com isso, estudos recentes têm mostrado que desregulações e mutações relacionadas a esta via estão diretamente associadas ao comportamento tumoral de determinadas neoplasias malignas, como por exemplo: mama, ovário, próstata, colón, tireoide, linfomas e melanomas (CORTOT et al. 2006). E a fim de estabelecer um controle destas neoplasias

malignas, novas drogas inibidoras da via mTOR vêm sendo desenvolvidas, dentre elas: o everolimo.

1.2 INIBIDORES DE MTOR - EVEROLIMO

O everolimo (RAD001, Afinitor®, Novartis) é um fármaco pertencente à classe dos análogos da rapamicina que possui a capacidade de inibir a via mTOR através da sua alta afinidade com o receptor intracelular FKBP12, formando um complexo que impede a atividade desta via (NOVARTIS 2012). Estudos recentes sugerem que mutações em genes supressores de tumor associados à via mTOR aumentam o risco de desenvolvimento de neoplasias malignas do pâncreas. Por outro lado, experimentos pré-clínicos comprovaram a ação antineoplásica do everolimo, através da inibição desta via, em células pancreáticas humanas (WIEDENMANN et al. 2011).

A partir destes ensaios pré-clínicos, um estudo de fase II demonstrou que o everolimo combinado com o octreotido para tratamento de tumores com diferenciação neuroendócrina em estágio clínico avançado obteve resultados satisfatórios, porém, não demonstraram resultados estatisticamente significantes relacionados ao aumento da taxa de sobrevida. Contudo, outro estudo (fase III) demonstrou um aumento na taxa de sobrevida em 18 meses de pacientes com tumores neuroendócrinos de pâncreas em uso de everolimo (34%), quando comparado ao grupo placebo (9%) (NGUYEN et al. 2012).

Além do tratamento de tumores com diferenciação neuroendócrina, outros estudos também demonstraram a eficácia do everolimo no tratamento de carcinomas de células renais. Um estudo fase II realizado com 41 pacientes, em uso de 10mg/dia de everolimo como primeira ou segunda linha de tratamento, foi demonstrada a eficácia do uso do everolimo, porém, enfatizada a necessidade de novos estudos devido a heterogeneidade dos resultados obtidos (AMATO et al. 2009). Por outro lado, em um estudo realizado a nível internacional com pacientes com diagnóstico de tumores renais, nos quais a terapia padrão (quimioterapia) foi ineficaz, o everolimo mostrou prolongar a sobrevida de 1,9 a 4 meses (KUDO 2011).

Um estudo clínico fase II demonstrou que a associação do tamoxifeno com o everolimo resultou em um aumento da taxa de sobrevida de 4,5 para 8,6 meses, redução do risco de óbito em 55%, bem como, uma diminuição nos efeitos colaterais relacionados ao uso da droga (ZAGOURI et al. 2012). Por outro lado, um estudo clínico randomizado fase III (BOLERO-2), realizado com 724 pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna da mama com receptor hormonal positivo, pós-menopausa, com status de cura ou progressão de doença após tratamento prévio com terapia adjuvante, demonstrou uma maior efetividade e aumento nas taxas de sobrevida quando realizada a associação do everolimo com o exemestano (6,9 meses) se comparada a associação do everolimo com o placebo (2,8 meses) (BASELGA et al. 2012). Estudo este considerado um grande avanço no tratamento dos tumores de mama.

Porém, apesar da eficácia e do sucesso da terapêutica com everolimo, efeitos colaterais relacionados ao uso desta droga são bastante comuns. Dentre eles destacam-se: náusea, vômito, diarreia, fadiga, cansaço, ressecamento e *rash* cutâneo, prurido, dor generalizada em membros superiores e inferiores, mielossupressão, pneumonite e as estomatites (DUTCHER 2004; DE VIRGILIO e LOEWITH 2006; FAIVRE et al. 2006; WITZIG e KAUFMANN 2006; RIZELL et al. 2008).

1.3 ESTOMATITES ASSOCIADAS AOS INIBIDORES DE MTOR (EAIM)

Descritas inicialmente por SONIS et al. (2010), as Estomatites Associadas aos Inibidores de mTOR (EAlm) são clinicamente caracterizadas como lesões ulceradas, únicas ou múltiplas, recoberta (s) por uma pseudomembrana de fibrina e circundada por um halo eritematoso, semelhantes a ulcerações aftosas, localizadas principalmente em mucosas móveis (língua, lábios e mucosa jugal), que surgem comumente nas duas primeiras semanas do uso da medicação. Estas lesões não podem ser diagnosticadas como mucosites orais, uma vez que não são induzidas por agentes quimioterápicos ou por radiação (SONIS et al. 2010).

Consideradas um dos principais efeitos adversos, as EAlm podem influenciar a continuação do uso do everolimo, devido as queixas álgicas em cavidade oral, que impedem ao paciente de alimentar-se, e como consequência, levando a um déficit nutricional e queda do estado geral

(SONIS et al. 2010; DE OLIVEIRA et al. 2011; FERTÉ et al. 2011; BOERS-DOETS et al. 2012, 2013; NICOLATOU-GALITIS et al. 2013; NCI 2016).

Estudos clínicos recentes têm exposto a associação do desenvolvimento das Estomatites Associadas aos Inibidores de mTOR (EAlm) em pacientes diagnosticados com tumores malignos de mama, rim e neuroendócrino avançados em uso de everolimo, exclusivamente ou associados a outras drogas como ao exemestano, um inibidor esteroide da aromatase (DE OLIVEIRA et al. 2011; BARNETT 2012; BASELGA et al. 2012; BEAVER e PARK 2012; BOERS-DOETS et al. 2012, 2013; NICOLATOU-GALITIS et al. 2013; NCI 2016; KALOGIROU et al. 2015). Em experimentos in vitro em células tumorais de mama, a combinação de inibidores de aromatase com inibidores de mTOR, diminui radicalmente a proliferação e aumenta a morte celular (BOULAY et al. 2005).

De acordo com o estudo de MARTINS et al. (2013), no qual foi realizada uma revisão de literatura e o levantamento de 44 estudos, com um total de 2.822 pacientes, observou-se que a prevalência das EAlm foi de aproximadamente 53%, para todos os inibidores, e de 44,3% para o everolimo, exclusivamente.

O auxílio e reestabelecimento da mucosa oral são realizados através da prescrição e administração de soluções orais tópicas contendo corticosteroides, podendo estar associados a antissépticos bucais e anestésicos tópicos (DE OLIVEIRA et al. 2011; CUMMINS e PAVLAKIS 2013; DIVERS e O'SHAUGHNESSY 2015).

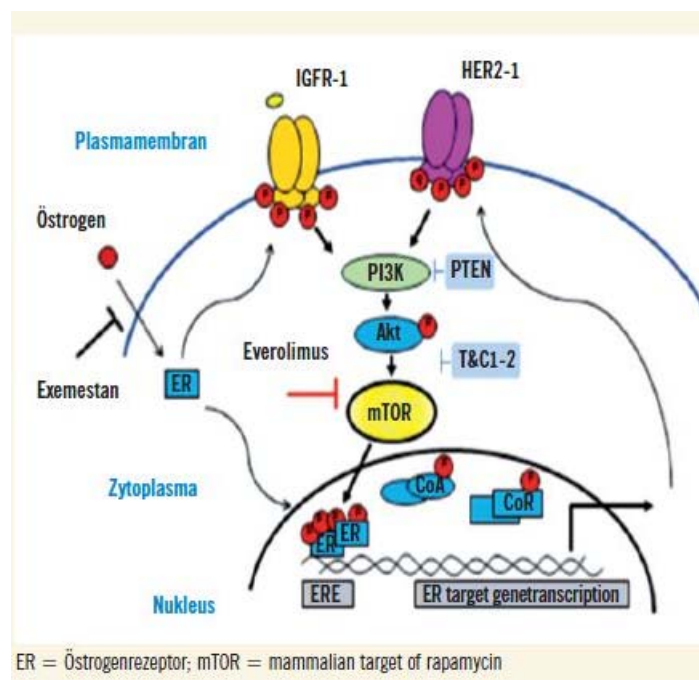
Estudos recentes, a fim de avaliar os efeitos do everolimo em uma matriz organotípica da mucosa oral, tratada com 500ng/mL de everolimo por 24 e 48 horas, demonstraram um aumento no número de células em apoptose, bem como uma desorganização na estrutura do epitélio oral, diminuição da proliferação celular e aumento das citosinas inflamatórias. Concluindo que o everolimo é capaz de causar danos no epitélio oral, independente da microbiota (SONIS et al. 2017).

Outro estudo avaliou o efeito combinatório do uso do everolimo associado ao exemestano (BOLERO-2), onde 724 pacientes, divididos em dois grupos (exemestano 25mg associado ao everolimo 10mg e exemestano 25mg associado ao placebo), foram avaliados. Com isso, conclui-se que o grupo EXE + EVE desenvolveu mais EAlm, quando comparado ao grupo EXE + PCB (67% E 12%, respectivamente) (RUGO et al. 2014).

Contudo, apesar da realização de estudos prévios, até o presente momento, a possível etiologia para as EAlm não foi estabelecida (SONIS et al. 2010; DE OLIVEIRA et al. 2011; FERTÉ et al. 2011; BOERS-DOETS et al. 2012, 2013; NICOLATOU-GALITIS et al. 2013; KALOGIROU et al. 2015).

Sendo assim, a partir da observação clínica dos pesquisadores (maior número de EAlm em pacientes portadores de neoplasia maligna da mama em uso de everolimo associado ao exemestano), estudos clínicos que demonstraram que as EAlm são um efeito colateral comum ao uso do everolimo e o mecanismo semelhantes de ativação da tradução da via de mTOR e o receptor de estrógeno na célula, é biologicamente plausível suspeitar que a combinação destas drogas possam exacerbar alterações a

nível celular, como apoptose e alterações nos receptores PI3K/mTOR e no ciclo celular (Figura 2), facilitando o desenvolvimento destas lesões em cavidade oral.



Fonte: MOSER e KAHLHAMMER (2011)

Figura 2 - Ação da associação do everolimo e exemestano na via mTOR (BOLERO-2). Esquema representativo do mecanismo de ação do bloqueio da via mTOR realizado pelo everolimo e do bloqueio hormonal de estrogênio realizado pelo exemestano demonstrado no *trial* BOLERO-2.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações que possam estar relacionadas ao desenvolvimento das Estomatites Associadas aos Inibidores de mTOR (EAlm).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1 Realizar o levantamento epidemiológico destas lesões em pacientes em tratamento e/ou tratados com everolimo, no período deste estudo, do A.C.Camargo Cancer Center;
- 2 Realizar análises histopatológicas, imunohistoquímicas e de imunofluorescência dos espécimes provenientes de biópsia, no período deste estudo, do A.C.Camargo Cancer Center, em pacientes portadores destas lesões orais;
- 3 Identificar, através da análise das proteínas da via PI3K/mTOR, alterações que possam estar relacionadas ao desenvolvimento das EAlm, em queratinócitos orais displásicos (QOD) tratados em cultura celular com rapamicina e exemestano;

- 4 Avaliar a viabilidade celular de queratinócitos orais displásicos (QOD) tratados em cultura celular com rapamicina e exemestano, por meio do ensaio de MTT.
- 5 Avaliar a capacidade de migração de queratinócitos orais displásicos (QOD) tratados em cultura celular com rapamicina e exemestano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi apreciado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center sob o protocolo de aprovação de número 2221/16. (Anexo 1)

3.1 CARACTERIZAÇÕES DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo retrospectivo e prospectivo que avaliou pacientes em uso de terapia alvo com everolimo.

3.2 SELEÇÕES DOS PACIENTES

A amostra foi constituída de pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna de mama, rim e/ou neuroendócrina em acompanhamento com o Departamento de Oncologia Clínica do A.C.Camargo Cancer Center em uso ou com proposta terapêutica de usar everolimo.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes com diagnóstico de neoplasia maligna de mama, rim e neuroendócrina com proposta de iniciar tratamento com everolimo;
- Maiores de 18 anos;

3.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Pacientes em que o quadro clínico não fosse favorável para participação e/ou prosseguimento no estudo;
- Pacientes com lesões orais de origem inflamatória e/ou infecciosa associadas ao tratamento quimioterápico;
- Pacientes diagnosticados com doenças autoimunes que possam acometer a mucosa oral;
- Pacientes pós-transplante;
- Pacientes com histórico prévio de tratamento radioterápico em cavidade oral;
- Pacientes menores de 18 anos;

3.5 RECRUTAMENTOS

Após preenchimento dos critérios de inclusão e exclusão no estudo, os pacientes foram recrutados e orientados quanto:

- A caracterização do estudo;
- Possível realização de procedimento cirúrgico de pequeno porte (biópsia) em cavidade oral, para aqueles que desenvolveram estomatites associadas ao uso do everolimo;
- Assinatura do termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice).

3.6 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

O levantamento do perfil epidemiológico dos pacientes foi realizado através da seleção, avaliação e extração de informações contidas nos prontuários de pacientes, em acompanhamento com o núcleo de oncologia clínica do A.C.Camargo Cancer Center, com histórico pregresso ou em uso atual de everolimo, durante o período deste estudo.

Dados epidemiológicos, tais como: sexo, idade, diagnóstico da neoplasia, estadiamento (TNM), tratamentos oncológicos prévios, data do início do everolimo, dose da medicação em uso e data do surgimento das primeiras lesões em cavidade oral foram coletados e armazenados em um banco de dados em Excel para Microsoft® e, posteriormente, transferidos para o software SPSS 23, para a realização das análises estatísticas.

3.7 BIÓPSIAS

No paciente que apresentou quadro clínico de estomatite associada ao uso de everolimo foi realizado procedimento de biópsia perioral, a fim de coletar um área de epitélio oral sem alterações e da lesão propriamente dita, com anestesia local infiltrativa. Posteriormente, o espécime foi encaminhado ao departamento de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center para análise histológica, a fim de avaliar e definir o padrão histológico arquitetural desta lesão, além do estabelecimento e confirmação diagnóstica de estomatite associada ao uso de everolimo; análise

histoquímica para exclusão de possíveis processos infecciosos; análise imunohistoquímica para receptor de estrógeno (alfa e beta) e progesterona, proliferação celular (KI-67), , CD3 (linfócitos B), CD20 (linfócitos T) e CD68 (macrófagos); imunofluorescência através do método de TUNNEL para avaliar os níveis de apoptose no epitélio lesional.

3.7.1 PROTOCOLO PARA IMUNOHISTOQUÍMICA

As colorações imunohistoquímicas para os marcadores: receptor de estrógeno α e β , progesterona, KI-67 (proliferação celular), CD3 (linfócitos B), CD20 (linfócitos T) e CD68 (macrófagos) foram realizadas em uma máquina Ventana automatizada – Benchmark ULTRA system – Roche diagnostics® com o kit Ultraview Universal DAB Detection – Roche® – seguindo as recomendações do fabricante.

3.7.2 PROTOCOLO PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA

Após a confecção das lâminas dos espécimes biopsiados, foi realizada a imunofluorescência pelo método de TUNNEL, seguindo as recomendações do fabricante através da utilização do APOPTAG KIT – Merck ® e disposto abaixo:

1. Desparafinização do tecido;
2. Pré-tratamento do tecido:
 - a. Aplicar a proteína de digestão enzimática ou proteínase K por 15 minutos em temperatura ambiente;
 - b. Lavar com água destilada;

3. Extinguir a peroxidase endógena
 - a. Extinguir em 3% em Peróxido de hidrogênio diluído em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente;
 - b. Lavar duas vezes com PBS ou água por 5 minutos;
4. Aplicar a solução de equilíbrio por 10 segundos;
5. Aplicar a enzima TDT de trabalho em uma câmara úmida a 37 graus por 1 hora;
6. Aplicar tampão de parada e lavagem;
 - a. Colocar as lâminas na solução, agitar por 15 segundos e deixar incubado por 10 minutos em temperatura ambiente;
 - b. Aquecer a anti-digoxigenina e remover da alíquota a quantidade suficiente para a amostra;
7. Aplicar a anti-digoxigenina
 - a. Lavar 3 vezes com PBS por 1 minuto;
 - b. Remover os excessos;
 - c. Aplicar a anti-digoxigenina na lâmina;
 - d. Incubar em câmara úmida por 30 minutos
8. Lavar com PBS 4 vezes por 2 minutos em temperatura ambiente;
9. Aplicar o substrato da peroxidase para cobrir toda a lâmina; esperar corar por média de 3-6 minutos em temperatura ambiente.
10. Lavar 3 vezes com água destilada por um minuto
11. Aplicar o contraste
 - a. Aplicar 0,05% de verde de metil por 10 minutos em temperatura ambiente;

- b. Lavar 3 vezes com água destilada por 30 segundos em temperatura cada espécime;
 - c. Lavar 3 vezes com butanol 100%;
12. Montagem das lâminas
 13. Ver em microscópio.

3.8 CULTURA CELULAR

A seguinte linhagem celular de queratinócitos orais displásicos (QOD): "*Human Caucasian dysplastic oral keratinocyte*" (Sigma-Aldrich ® - cat. 94122104), proveniente do dorso de língua de um homem caucasiano de 57 anos, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Fabio Daumas do departamento de patologia bucal da Universidade de São Paulo (USP).

Estas células foram mantidas em meio DMEM High Glucose (Thermo Fisher Scientific) acrescido de 10% soro fetal bovino (SFB - Thermo Fisher Scientific), 1% piruvato de sódio (Thermo Fisher Scientific), 2mM de glutamina, 5µg/mL de hidrocortisona e 40 µg/mL Garamicina (Hipolabor Farmacêutica) em estufa úmida a 37 °C e 5% de CO₂.

A partir desta cultura de células, foram realizados experimentos para avaliar a viabilidade celular, capacidade de migração/reparação e análise dos receptores da via PI3K/mTOR de QOD tratados com rapamicina, exemestano e associação de ambas as drogas, como propostos nos protocolos a seguir.

3.8.1 Viabilidade celular por MTT - *Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]*

O teste do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, clivam o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de *formazan* reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

Para isso, 10.000 células de QOD foram plaqueadas em placas de 96-wells (Corning), em triplicatas, e decorridas 24 horas, tratadas com as seguintes condições: 1) veículo (DMSO - Dimetilsulfóxido) (controle); 2) Rapamicina - 5nM; Exemestano - 30µM; Rapamicina e Exemestano (5nM e 30µM, respectivamente) seguindo o protocolo abaixo:

- 1 Preparo das células em meio de cultura, plaqueamento em placa de 96-wells e incubação por 24 horas;
- 2 Tratar as células com a medicação necessária e incubar por 24 horas;
- 3 Adicionar de 20µl de 5 mg/mL de MTT;
- 4 Incubar por 3 horas e 30 minutos a 37°C em estufa com 5% de CO₂;
- 5 Remover o meio;
- 6 Adicionar 150µl de solvente de MTT;

- 7 Cobrir placa com papel alumínio e agitar durante 15 minutos em um *orbital shaker* e ler a absorbância.

Em seguida, foram lidas as absorbâncias através de em um comprimento de onda de 590nm com filtro de referência em 620nm, a fim de avaliar viabilidade celular dos QOD após o tratamento com estas diferentes condições propostas.

Os resultados obtidos foram armazenados em um banco de dados em Excel para Microsoft® e, posteriormente, transferidos para o software GraphPad Prism para a realização das análises estatísticas e elaboração dos gráficos.

3.8.2 Migração celular - *Scratching Assay*

A motilidade celular é uma característica essencial de células vivas e está diretamente relacionada a processos patológicos e inflamatórios. De acordo com a literatura, existem inúmeros métodos capazes de avaliar este processo de migração, dentre eles: o “*scratching assay*” realizado seguindo o protocolo abaixo:

- 1 Plaqueamento de 50.000 células de QOD em placas de 24-wells (Corning), em duplicata;
- 2 Decorridas 24 horas, foi realizado um único “risco” no centro da placa com o auxílio de ponteiros de 200µL;
- 3 Após a realização destes “riscos”, as células foram lavadas com solução de PBS, a fim de eliminar possíveis restos celulares provenientes do trauma mecânico nesta placa. Em seguida foi

adicionado 200 μ L de meio de cultura específico e realizado tratamento com doses de 5nM de rapamicina e 15 μ M de exemestano, nas seguintes condições: controle (veículo - DMSO), rapamicina exclusivamente, exemestano exclusivamente e ambas as drogas associadas;

- 4 Decorridas 24 horas após o tratamento, estas células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e coradas com hematoxilina para posterior quantificação.

A quantificação foi realizada através de tomadas fotomicrográficas, obtidas a partir de um microscópio de luz transmitida, em 03 (três) diferentes regiões (terço superior, médio e inferior), por condição de tratamento, de cada poço da placa, em que foram medidas as áreas, em pixels, e comparadas em relação ao controle, a fim de avaliar a capacidade de migração celular de QOD tratados com everolimo, exemestano ou a combinação dos dois através do software IMAGE J.

Os resultados obtidos foram armazenados em um banco de dados em Excel para Microsoft® e, posteriormente, transferidos para o software GraphPad Prism para a realização das análises estatísticas e elaboração dos gráficos.

3.8.3 Western Blotting

A técnica foi utilizada para a identificação e avaliação dos níveis de proteínas envolvidas na via PI3K/mTOR. E também utilizada para avaliação dos níveis de fosforilação das proteínas estudadas, que em muitos dos casos se relacionam com o estado de ativação e/ou com a função da proteína correspondente.

- 1 Plaqueamento de 100.000 células de QOD em placas de 35x10mm (Corning) e incubadas por 24 horas;
- 2 Realizado tratamento com doses de 5nM de rapamicina e 15µM de exemestano, nas seguintes condições: controle (veículo - DMSO), soro fetal bovino 10%, rapamicina exclusivamente, exemestano exclusivamente e ambas as drogas associadas, com acréscimo ou não de SFB, por períodos de 15 minutos e 06 horas;
- 3 Em seguida, as células foram lisadas com o tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% NP40® - Sigma Aldrich; 0,5% deoxicolato de sódio - Sigma Aldrich; Inibidor de fosfatase - Thermo Fisher Scientific; inibidor de protease - Roche), os lisados foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado. A quantificação das proteínas foi feita através do método de Bradford, utilizando-se o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate® (Bio-Rad).
- 4 Foi adicionado tampão redutor concentrado (4x: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% SDS (Merck); 1 mM EDTA pH 8,5; 5% β-mercaptoetanol

(Merck); 20% glicerol; traços de azul de bromofenol) às amostras e as mesmas foram aquecidas por 5 minutos a 95°C.

- 5 A seguir, as amostras foram aplicadas em gel de SDS-PAGE e corridas em tampão de corrida (25 mM Tris; 191 mM Glicina (Sigma Aldrich); 0,1% SDS) com voltagem constante, a saber, 65 V durante 25 minutos e 120 V durante 1,5 horas.
- 6 Após a corrida, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (Amersham) a 100 V durante 1 hora em tampão de transferência (25 mM Tris; 191mM Glicina; 0,1% SDS; 20% Metanol) e procedeu-se com o bloqueio da membrana em solução contendo 5% leite em pó diluído em 0,1% TBS-T (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Tween® (Sigma Aldrich)) por 1 hora.
- 7 Após o bloqueio, foi colocado o anticorpo primário de escolha overnight e após esse período adicionou-se o anticorpo secundário acoplado a peroxidase por 1 hora (Amersham) e a membrana foi revelada com kit de quimioluminescência (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate) em um fotodocumentador automático.

Neste estudo, foram utilizados os seguintes anticorpos (diluídos em TBS-T contendo 5% BSA) referentes às proteínas: 4EBP total e fosforilado (Santa Cruz; 1:1000), p70S6K1 total e fosforilado (Santa Cruz; 1:1000), Ciclina D1 (Cell Signaling; 1:500) e ERK1/2 (Cell Signaling, 1:1000).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados clínicos, análises estatísticas de média, mediana, desvio padrão e proporção da amostra avaliada foram realizadas. Além disso, foi realizada uma análise comparativa entre os grupos utilizando, quando apropriado, o teste exato de Fischer ou Qui-quadrado (variáveis dicotômicas), teste Mann-Whitney U ou Teste t (variáveis contínuas) e teste de Wilcoxon rank (variáveis ordinais) através do software SPSS versão 23.

Para os dados provenientes dos experimentos laboratoriais, as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism através da realização do teste one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Para ambos, foi considerado um intervalo de confiança de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

A partir dos dados coletados entre Março de 2016 e Fevereiro de 2018, armazenados em um banco de dados em Excel para Microsoft® e posteriormente transferido para software o SPSS 23, as tabelas de frequências foram geradas e analisadas.

Foram avaliadas informações de 129 pacientes que fizeram ou estavam em uso de everolimo durante a coleta dos dados. Com isso, pode-se observar uma amostra constituída predominantemente por indivíduos do sexo feminino (97 pacientes, 75,2%), apresentando idade média de 57,02 anos ($\pm 13,3$ anos) e com a predominância de diagnóstico de tumores de mama (76 pacientes, 58,9%) em estádios clínicos avançados, grau III e IV (120 pacientes, 93%) e tratados previamente com terapia combinada, cirurgia associado à QT ou cirurgia associado a RT ou QT associado a RT (102, 79,1%) (Tabela 2).

Tabela 1 - Dados clínicos dos 129 pacientes que utilizaram everolimo.

Variáveis	N (%)
<u>Sexo</u>	
- Feminino	97 (75,2%)
- Masculino	32 (24,8%)
<u>Idade</u>	
- Média	57.02 (±13.3)
- Mediana	59
<u>Tumor</u>	
- Mama	76 (58,9%)
- Rim	18 (14%)
- Neuroendocrino	35 (27,1%)
<u>Estadiamento clínico*</u>	
- I e II	8 (6,2%)
- III	12 (9,2%)
- IV	109 (83,8%)
- Informação ausente	1 (0,8%)
<u>Metástases - Sítios</u>	
- Linfonodos	4 (3,1)
- Ossos	16 (12,4)
- Pulmões	5 (3,9)
- Fígado	12 (9,3)
- Múltiplas	88 (68,2)
- Ausentes	3 (2,3)
- Informações ausentes	1 (0,8)

* O estadiamento clínico foi definido ao momento do início do uso do everolimo.

Destes 129, 43 pacientes (33,3%) desenvolveram lesões orais associadas ao uso de everolimo, porém, apenas 18 pacientes foram propriamente diagnosticados com EAlm. As lesões variaram de 0,5cm a 1,5cm, e a mediana em dias para o desenvolvimento da primeira lesão oral foi de 17,5 dias após o início do tratamento com a droga. A língua foi o sítio mais acometido (32%) e afetou predominantemente, paciente com diagnóstico de tumores de mama em uso de everolimo associado ao exemestano (Tabela 3).

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes diagnosticados com EAlm.

ID	Diagnóstico (Tumor)	Uso da droga (Dias)	Local(is)	EAlm (Número)	Tamanho (em CM)
E01	Mama	16	Assoalho	1	-
E02	Mama	15	Ápice e mucosa jugal	2	-
E03	Neuroendócrino	26	Borda de língua	1	0.3
E04	Mama	56	Mucosa labial	1	0,5
E05	Mama	19	Mucosa labial	1	0,5
E06	Mama	12	Borda de língua	1	0.5
E07	Mama	05	Ápice	1	-
E08	Mama	12	Borda de língua	2	-
E09	Mama	13	Ápice e mucosa jugal	2	0.5
E10	Mama	20	Mucosa Jugal e assoalho	-	-
E11	Mama	5	Mucosa jugal e labial	-	-
E12	Neuroendócrino	15	Mucosa jugal, labial e assoalho	-	-
E13	Mama	14	Mucosa jugal, ápice e assoalho	3	1.5
E14	Mama	15	Mucosa jugal e borda de língua	2	0.5 cm
E16	Rim	90	Mucosa jugal e labial	3	1 cm
E17	Mama	51	Palato	1	0.5 cm
E18	Mama	17	Palato	1	0.5 cm

* Lacunas não preenchidas significam ausência da informação no prontuário.

Os efeitos colaterais referentes ao uso do everolimo também foram avaliados e EAlm foi o efeito colateral mais prevalente na população estudada (33,3%), seguido por pneumonite e *rash* cutâneo respectivamente, 26% e 11%.

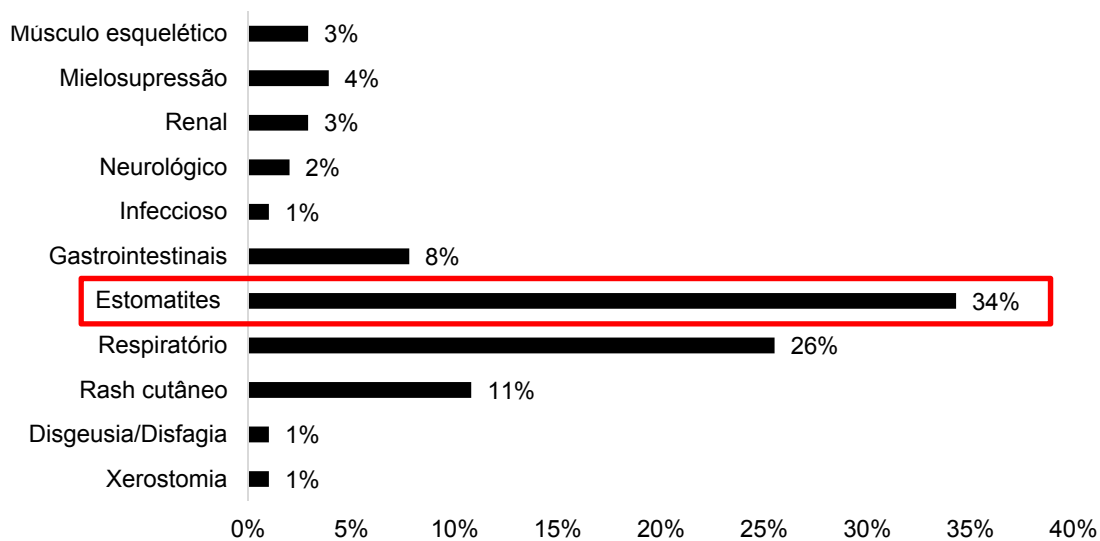
EFEITOS COLATERAIS

Figura 3 – Efeitos colaterais relacionados ao uso do everolimo. Figura descritiva dos efeitos colaterais relacionados ao uso de everolimo nos pacientes avaliados durante o estudo retrospectivo.

Após a análise da distribuição das frequências dos dados obtidos, testes estatísticos para determinar possíveis associações entre as variáveis estudadas e o desenvolvimento de estomatites associadas ao uso de everolimo foram realizados (Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado de Pearson considerando $P \leq 0,05$ como resultado estatisticamente significativo) (Tabela 4).

Tabela 3 - Associação entre a presença de estomatites e as variáveis do estudo.

<i>Variáveis</i>	<i>Estomatites</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
	<i>N (%)</i>	<i>N (%)</i>	
Gênero			0.025
Masculino	5 (11.6)	27 (31.4)	
Feminino	38 (88.4)	59 (68.6)	
Diagnóstico			0.019
Mama	32 (74.4)	44 (51,2)	
Não-Mama	11 (25.6)	42 (48.8)	
Idade			0.561
20-39 anos	6 (14)	10 (11.6)	
40-59 anos	14 (32.6)	39 (45.3)	
60-79 anos	21 (48.8)	34 (39.5)	
80-99 anos	2 (4.7)	3 (3.5)	
T (Tumor)			0.696
T1	2 (8.3)	6 (14.6)	
T2	9 (37.5)	10 (24.4)	
T3	6 (25)	12 (29.3)	
T4	3 (12.5)	3 (7.3)	
Tx	4 (16.7)	14 (21.5)	
N (Linfonodos)			0.612
N0	6 (25)	12 (28.6)	
N1	11 (45.8)	11 (26.2)	
N2	2 (8.3)	5 (11.9)	
N3	1 (4.2)	4 (9.5)	
Nx	4 (16.7)	10 (23.8)	
M (Metástases)			0.416
M0	6 (25)	16 (38.1)	
M1	13 (54.2)	18 (42.9)	
M2	1 (4.2)	0 (0)	
Mx	4 (16.7)	8 (19)	
Metástases			0.944
Linfonodos	1 (2.3)	3 (3.5)	
Ossos	7 (16.3)	9 (10.6)	
Pulmões	2 (4.7)	3 (3.5)	
Fígado	4 (9.3)	8 (9.4)	
Múltiplas	28 (65.1)	60 (70.6)	
Ausente	1 (2.3)	2 (2.4)	
Estadio clínico			0.779
I	0 (0)	1 (1.2)	
II	3 (7)	4 (4.7)	
III	5 (11.6)	7 (8.2)	
IV	35 (81.4)	73 (85.9)	
Dose do everolimo			0.024
5mg	16 (37.2)	15 (17.4)	
10mg	27 (62.8)	71 (82.6)	
Alteração da dose			0.001
Sim	17 (39.5)	11 (12.8)	
Não	26 (60.5)	75 (87.2)	
Suspensão da dose			1.000
Sim	28 (65.1)	55 (64)	
Não	15 (34.9)	31 (36)	

Com isso, foi possível observar associação significativa entre o desenvolvimento das EAlm com as seguintes variáveis: sexo feminino ($p = 0,025$; Teste exato de Fisher), pacientes diagnosticados com tumores de mama ($p = 0,019$; Teste exato de Fisher), dose inicial de 10mg por dia através da administração via oral ($p = 0,024$; Qui-quadrado de Pearson) e a necessidade de alteração de 10mg para 5mg diariamente ($p = 0,001$; Qui-quadrado de Pearson).

Além disso, o risco cumulativo do desenvolvimento de estomatites também foi calculado, onde foi observado que pacientes com diagnóstico de neoplasias malignas da mama possuem um risco aumentado em 2,34 vezes para o desenvolvimento das EAlm, quando comparados a pacientes com diagnóstico de tumores renais e com diferenciação neuroendócrina ($p=0,015$; Teste de Log-Rank) (Figura 4).

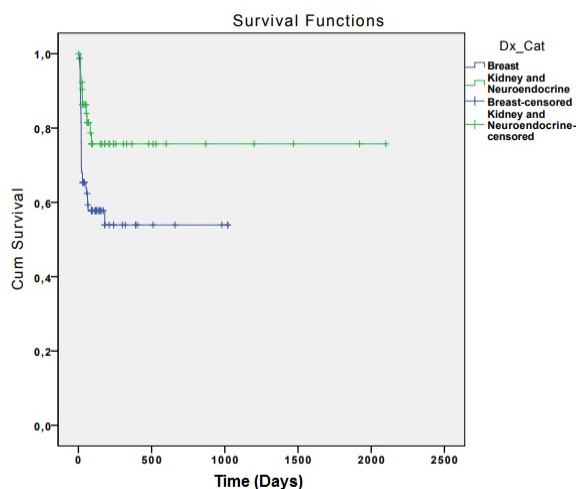


Figura 4 - Curva de risco acumulado. Curva de risco acumulado do desenvolvimento de EAlm em relação ao diagnóstico de base ($p = 0,015$; Teste de Log-Rank).

Assim, através da análise dos dados clínicos, concluímos que pacientes com diagnóstico de tumores de mama (tratados com a associação do everolimo com exemestano) estão mais propensos ao desenvolvimento de lesões orais, se comparados ao grupo de pacientes com diagnóstico de tumores renais e neuroendócrinos (tratados exclusivamente com everolimo).

4.2 ESTUDO PROSPECTIVO

Durante o período do estudo, doze (12) pacientes, consecutivos, que estavam com proposta de iniciar o tratamento com everolimo foram recrutados e aceitaram participar do estudo.

Destes doze, onze (11) pacientes eram mulheres, a média de idade foi de 59,09 anos, diagnosticadas com tumores de mama em estádios clínicos avançados (EC III e IV - 83,33%) em uso diário de everolimo associado ao exemestano. Por outro lado, apenas 01 (um) paciente, do sexo masculino, 68 anos, com diagnóstico de tumor renal em estágio clínico avançado, iniciou o uso exclusivo de everolimo, durante o estudo. Outros dois pacientes tiveram proposta de iniciar o uso da droga, porém, um deles foi a óbito por progressão de doença, prévio ao início do tratamento com everolimo, e o segundo foi optado a realização de outra abordagem terapêutica.

Dos pacientes em uso de everolimo, nove (75%) desenvolveram lesões orais associadas à droga. Destes 09 (nove), 08 (oito) eram do sexo

feminino com diagnóstico de neoplasia maligna da mama e 01 (um) era do sexo masculino com diagnóstico de neoplasia maligna do rim.

A mediana, obtida através do início do uso do everolimo (denominado D0) ao desenvolvimento/diagnóstico da primeira lesão oral (denominado Dx), foi de 21 dias.

O sítio mais acometido foi a mucosa labial, seguido da borda de língua e palato. E, outros sintomas, como xerostomia e ardência bucal, foram relatados pelos pacientes após o início do uso do everolimo.

Depois de realizado o diagnóstico, o procedimento de biópsia excisional da lesão foi proposto aos pacientes. Porém, apenas três dos nove aceitaram ser submetidos a exérese da lesão. Os demais optaram por não realizar por impossibilidade clínica (uso de anticoagulantes), fatores estéticos e receio ao procedimento.

Em seguida, os espécimes foram encaminhados ao departamento de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center e, o bloco, ao laboratório de biologia tumoral e biomarcadores do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center para análise histológica, histoquímica, imunohistoquímica e de imunofluorescência.



Figura 5 - Apresentação clínica das EAlm. Úlceras recobertas por pseudomembrana amarelada e envoltas por um halo eritematoso, localizadas em mucosa labial inferior e borda posterior de língua a direita, diagnosticadas como EAlm.

4.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA, HISTOQUÍMICA, IMUNOHISTOQUÍMICA E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A fim de avaliar e definir o padrão histológico arquitetural, através da análise histopatológica (H&E) e analisar uma possível presença de receptores de estrógeno (α e β) e progesterona, através da análise imunohistoquímica, nas estomatites associadas ao uso de everolimo, os espécimes provenientes das biopsias excisionais destas lesões foram encaminhadas ao departamento de anatomia patológica do A.C.Camargo Cancer Center.

Os três pacientes submetidos à biopsia obtiveram o mesmo resultado através da análise histopatológica, cujo laudo foi de “*processo inflamatório crônico com área de úlcera*”.

Além da análise histopatológica (H&E), análises histoquímicas (PAS e Grocott-Gomori - a fim de excluir possíveis processos infecciosos) e imunohistoquímicas foram realizadas (KI-67, receptor de estrógeno e progesterona, CD3, CD20 e CD68) e podem ser observados na figura abaixo.

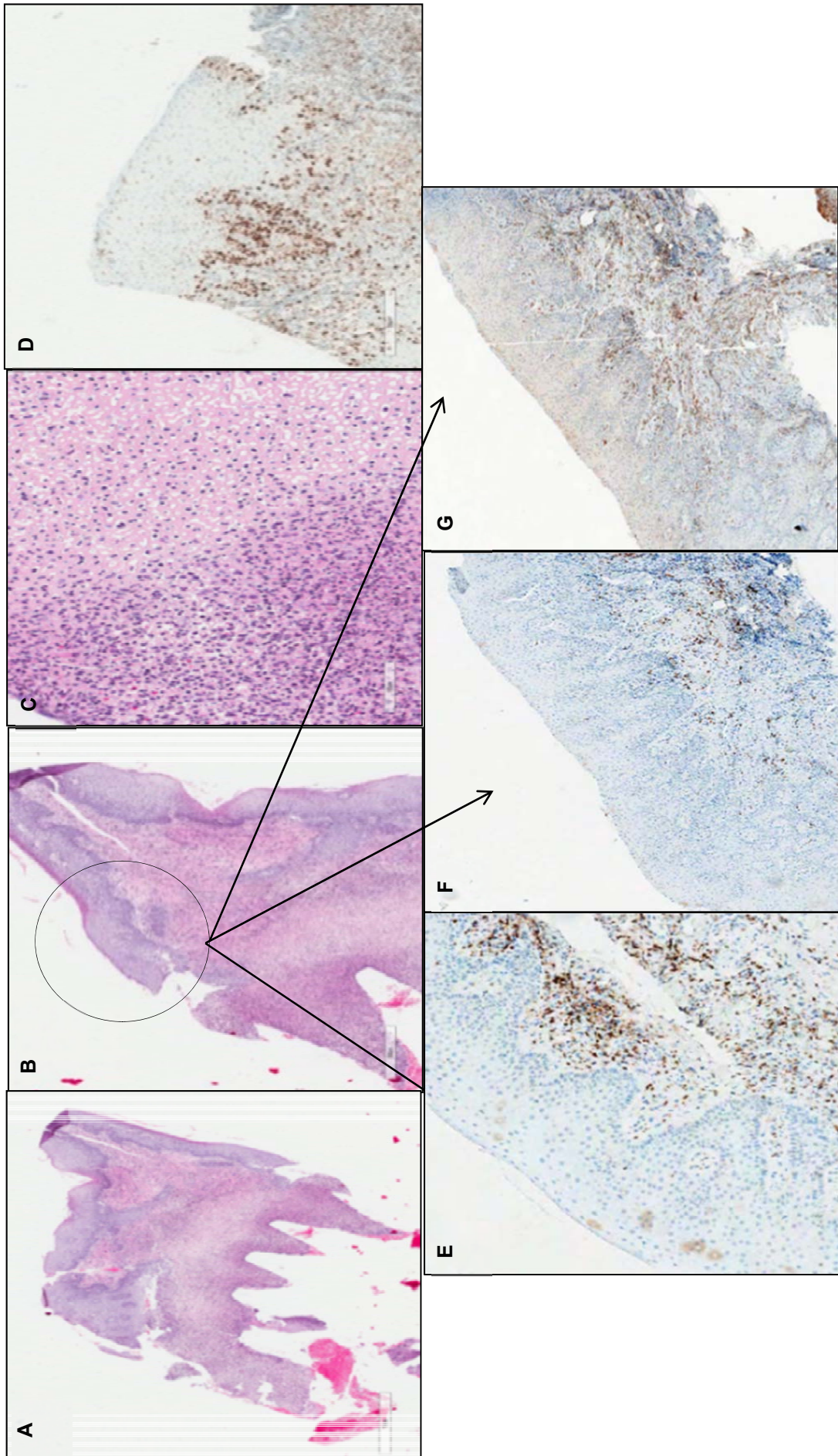


Figura 6 – Painéis histológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos dos espécimes biopsiados. **A:** Espécime de biopsia em borda direita de língua, corado com Hematoxilina-Eosina (HE), em menor aumento. **B:** Área de úlcera em espécime de biopsia em borda direita de língua, corado com HE, aumento de 4x (500um). **C:** Infiltrado inflamatório crônico rico em linfócitos, corado com HE, aumento de 20x (100um). **D:** Painel imunohistoquímico para KI67; aumento de 8x (300um). **E, F e G:** Painel imunohistoquímico para CD3, CD20 e CD68.

Em relação às colorações de PAS e Grocott-Gomori e os receptores de estrógeno α , β e progesterona, os resultados foram negativos. Assim, excluindo a possibilidade de lesão infecciosa, bem como, relacionadas a algum fator hormonal de estrógeno, tanto α quanto β , e progesterona.

Vale ressaltar, no entanto, que o ensaio de imunohistoquímico utilizado para a detecção dos receptores de estrógeno α e β foi padronizado para tumores de mama, que podem expressar altos níveis destas duas proteínas. Neste caso, a ausência de marcação na imunohistoquímica não exclui que possa haver a expressão destes receptores nos queratinócitos orais em níveis menores, que não seriam detectados neste ensaio.

Por outro lado, podemos observar uma marcação positiva restrita a camada basal do epitélio para KI-67 (proliferação celular) e no estroma da lesão para CD3, CD20 e CD68 (linfócitos e macrófagos). Uma vez que, estes achados corroboram com a descrição histológica (H&E) por tratar-se de um processo inflamatório agudo.

E por fim, a fim de avaliar a presença de células em apoptose, novos cortes foram realizados a partir dos blocos de parafina dos espécimes, e desparafinizados em estufa a 45°C e, em seguida, realizada a imunofluorescência pelo método de TUNNEL.

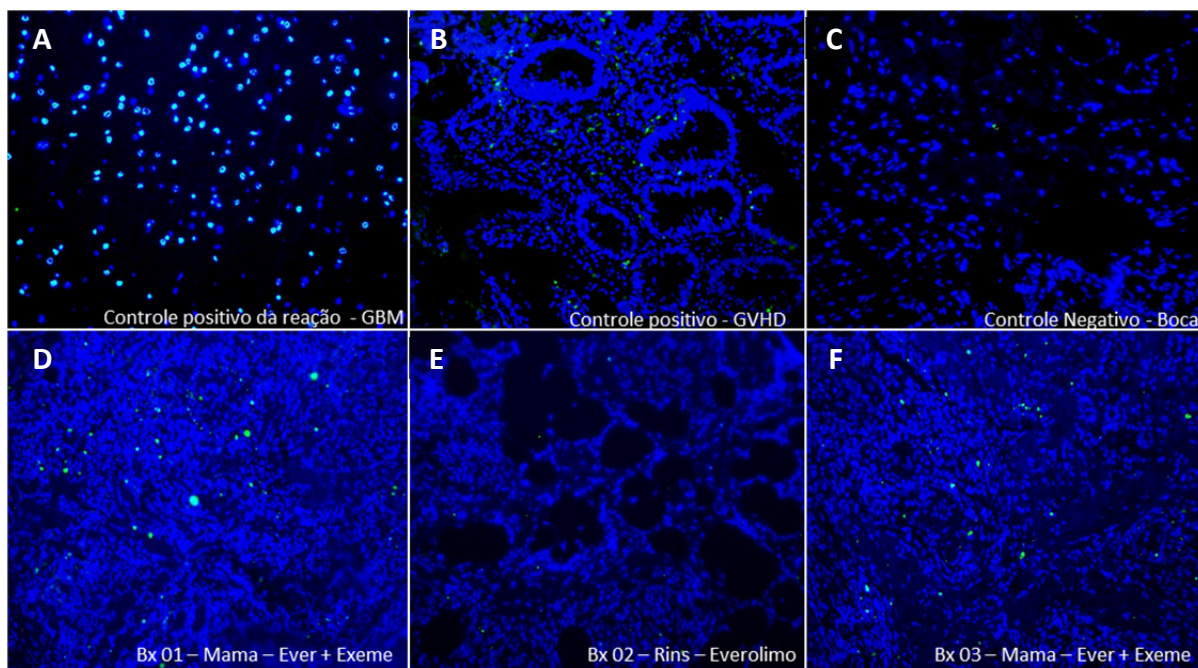


Figura 7 – Painel de imunofluorescência pelo método de TUNNEL. **A:** Controle da reação. **B:** Controle positivo do experimento - marcação positiva de células em apoptose, confirmadas através da análise histopatológica, em uma lesão de doença do enxerto contra o hospedeiro em esôfago. **C:** Controle negativo - epitélio oral saudável. **D:** Marcação positiva (em verde) para células em apoptose em uma EAM de uma paciente com neoplasia maligna da mama em uso de everolimo associado ao exemestano. **E:** Marcação negativa para células em apoptose em uma EAM de um paciente com neoplasia maligna do rim em uso exclusivo de everolimo. **F:** Marcação positiva (em verde) para células em apoptose em uma EAM de uma paciente com neoplasia maligna da mama em uso de everolimo associado ao exemestano

Com isso, de acordo com a figura acima (Figura 7), observamos a marcação positiva de células em apoptose (em verde) no epitélio lesional das pacientes diagnosticadas com neoplasia maligna da mama, em uso de everolimo associado ao exemestano. Enquanto observamos uma marcação negativa no epitélio lesional do paciente diagnosticado com neoplasia maligna de rim, em uso exclusivo de everolimo.

Assim, esta análise sugere-nos que a associação do everolimo com o

exemestano pode contribuir para o aumento da apoptose em células do epitélio oral, favorecendo o desenvolvimento destas lesões.

4.4 CULTURA CELULAR

4.4.1 Viabilidade celular por MTT - *Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]*

Para confirmar os achados obtidos através dos espécimes de biópsia dos pacientes, utilizamos modelos celulares de queratinócitos orais displásicos em cultura e realizamos experimentos de viabilidade celular *in vitro* por metabolização de MTT.

A fim de definir uma dose padrão da droga alvo inibidora da via mTOR (rapamicina) e do inibidor da aromatase (exemestano) para o tratamento de QOD em cultura celular e posterior realização dos experimentos, diferentes concentrações de rapamicina e exemestano foram testadas e a mais próxima aos 50% de células viáveis foi elegida com dose padrão para o tratamento, como pode ser observado nas figuras 8A e 8B.

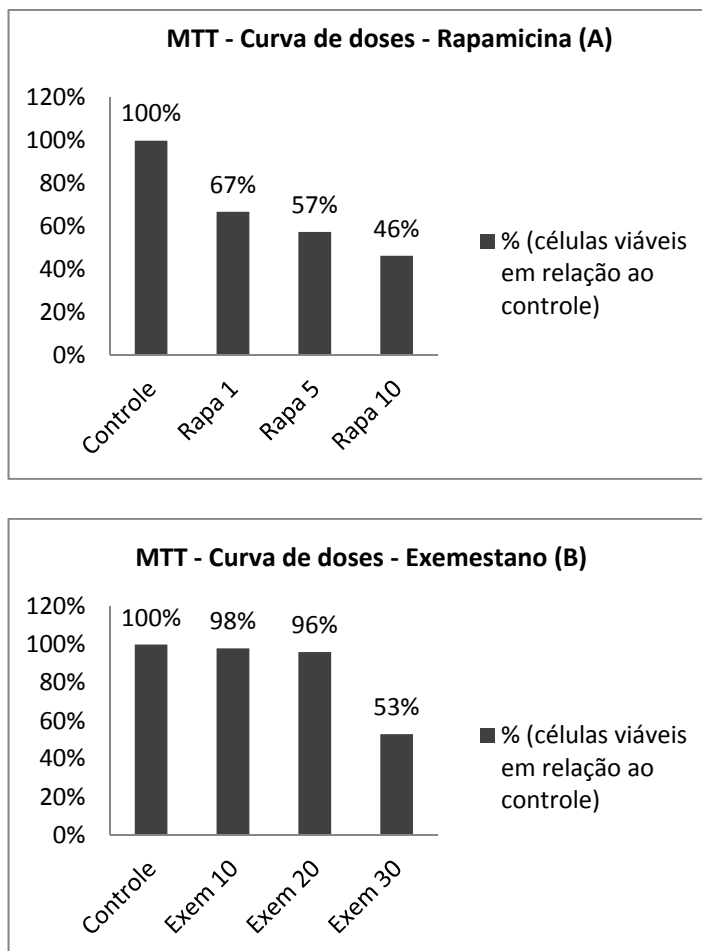


Figura 8 – Curvas de tratamento (A e B). Resultados das curvas de tratamento com diferentes concentrações de doses de rapamicina e exemestano para posterior realização do ensaio de viabilidade celular de QOD em cultura celular em triplicatas.

Com isso, obtivemos que as doses de 5nM de rapamicina e 30 μ M de exemestano são as doses ideais para a realização do ensaio de viabilidade celular.

Em seguida, QOD foram tratados nas seguintes condições: controle, rapamicina (5nM), exemestano (30 μ M) e ambas as drogas combinadas. Este experimento foi realizado em triplicata para validação dos resultados expostos na figura abaixo (Figura 9).

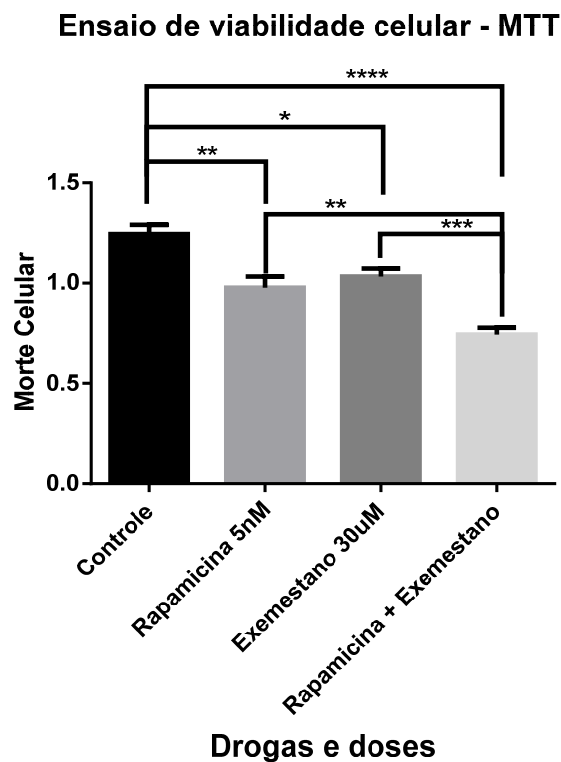


Figura 9 – Ensaio de viabilidade celular (MTT). A combinação da rapamicina com o exemestano induz uma maior morte celular quando comparada ao grupo controle. ($p = *$. One-way ANOVA test with Tukey's post-test; $*$ = 0,0139; $**$ = 0.0017; $***$ = 0.0007; $****$ - $p < 0.0001$).

Os dados sugerem que a combinação da rapamicina com o exemestano induz maior taxa de morte celular quando comparada ao grupo controle, bem como com as células tratadas com exemestano ou rapamicina apenas. Assim, sugere-nos que o efeito combinado destas drogas reduz a viabilidade das células do epitélio oral, o que pode estar relacionada ao desenvolvimento de EAlm.

4.4.2 Migração celular - *Scratching Assay*:

A fim de avaliar a motilidade dos queratinócitos orais displásicos (QOD) frente ao tratamento com rapamicina e exemestano, ensaios de migração celular foram realizados.

Os QOD foram tratados nas seguintes condições: controle, rapamicina (5nM), exemestano (15 μ M) e ambas as drogas combinadas. Este experimento foi realizado em triplicata para validação dos resultados expostos nas Figuras 10 e 11.

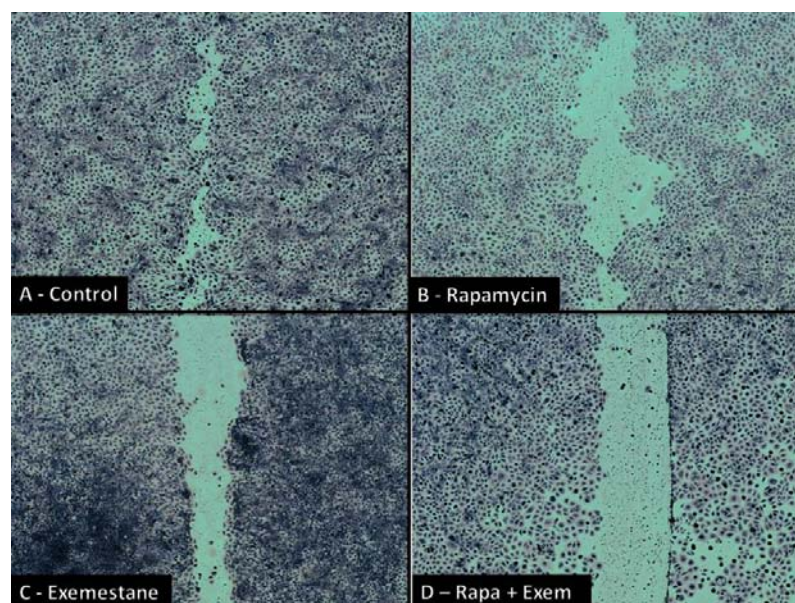


Figura 10 – Painel do ensaio de migração celular. **A.** QOD, em cultura celular, grupo controle (sem tratamento), 24 horas após confecção do risco no fundo da placa com ponteira de 200 μ L **B.** QOD, em cultura celular, tratados com rapamicina, 24 horas após confecção do risco no fundo da placa com ponteira de 200 μ L **C.** QOD, em cultura celular, tratados com exemestano, 24 horas após confecção do risco no fundo da placa com ponteira de 200 μ L **D.** QOD, em cultura celular, tratados com rapamicina associado ao exemestano, 24 horas após confecção do risco no fundo da placa com ponteira de 200 μ L.

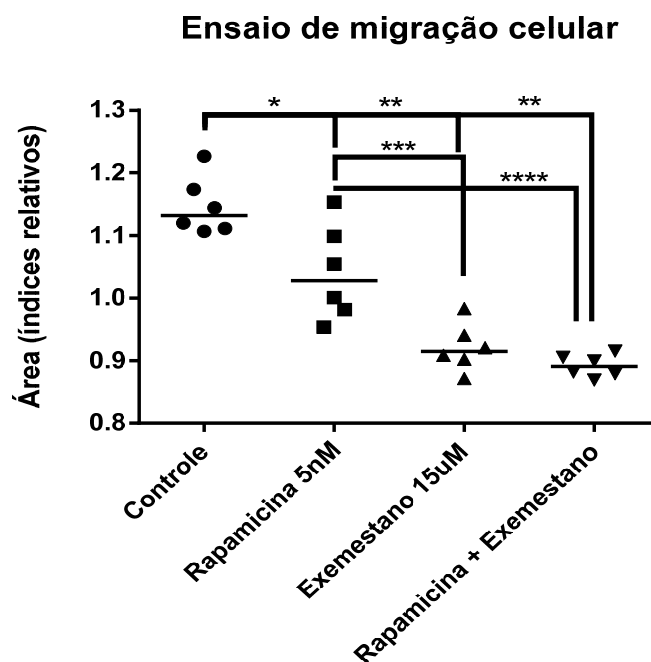


Figura 11 – Ensaio de migração celular. A combinação da rapamicina com o exemestano induz a diminuição da motilidade celular quando comparada ao grupo controle.. ($p = *$. One-way ANOVA test with Tukey's post-test; $* = 0,0063$; $** < 0,0001$; $*** = 0.0023$; $**** - p = 0.0002$).

Com isso, os dados sugerem que a combinação da rapamicina com o exemestano induz a diminuição da motilidade celular quando comparada ao grupo controle, bem como com as células tratadas com exemestano ou rapamicina apenas. Sugerindo-nos que o efeito combinatório destas drogas reduz a capacidade de migração das células do epitélio oral, o que está ligada ao processo de reparação tecidual, podendo estar relacionada ao desenvolvimento de EAlm,

4.4.3 Western Blotting

Para avaliar o mecanismo envolvido no efeito combinatório de rapamicina e exemestano sobre a migração e viabilidade celular,

investigamos vias de transdução de sinal que respondem à ativação de mTOR e receptores de estrógeno. Para isso, avaliamos a fosforilação dos alvos de mTOR (4E-BP e p70S6K1) e expressão de proteínas cujos genes são alvo de regulação transcricional pelos receptores de estrógeno (ciclina D1).

Queratinócitos orais displásicos (QOD) foram tratados com ambas as drogas e a expressão proteica foi avaliada pela técnica de *Western Blotting*.

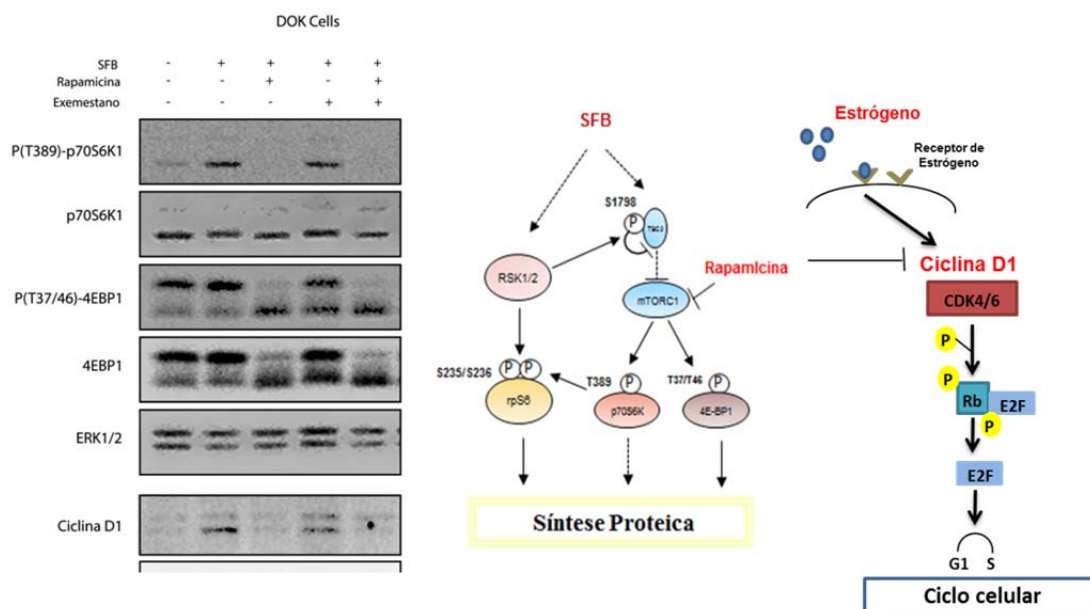


Figura 12 – Avaliação dos efeitos de rapamicina e exemestano sobre os receptores 4E-BP, p70S6K1 e ciclina D1 por *Western blot*. Extratos de QOD foram incubados com rapamicina e exemestano por 24 horas a 37 °C. A presença dos receptores foi analisada por *Western Blot* utilizando anticorpos específicos contra as proteínas 4E-BP, p70S6K1 e ciclina D1. Como controle de carregamento, foram utilizados anticorpos contra as proteínas ERK1/2.

Observamos que o tratamento das células com rapamicina levou a inibição da fosforilação dos receptores 4E-BP e p70S6K1, como esperado, mas também de ciclina D1. Por outro lado, o exemestano não inibiu a expressão de ciclina D1. Além disso, a combinação da rapamicina com o exemestano também não promoveu alterações nas proteínas observadas, quando comparado ao tratamento com rapamicina sozinho. Deste modo, com este ensaio não pudemos determinar os mecanismos moleculares associados à perda de viabilidade celular e migração causada pelo tratamento combinado de exemestano e rapamicina.

5 DISCUSSÃO

Descritas inicialmente por SONIS et al. (2010) as EAlm são clinicamente caracterizadas como lesões ulceradas, únicas ou múltiplas, recobertas por uma pseudomembrana de fibrina, localizada, principalmente, em mucosas não queratinizadas, semelhantes a ulcerações aftosas, que desenvolvem-se nas primeiras duas semanas de tratamento com a droga e que não podem ser diagnosticadas como mucosite oral, pois, estas lesões não são provenientes do tratamento quimioterápico e/ou radioterápico.

Consideradas como um dos principais efeitos colaterais relacionados ao uso do everolimo, as estomatites associadas aos inibidores de mTOR são mandatórias quanto a continuidade ou necessidade de redução do uso da medicação. Uma vez que, devido à dificuldade de alimentação, e conseqüente, queda do estado geral e o desenvolvimento de déficit nutricional, estas lesões impedem a continuidade do tratamento (SONIS et al. 2010; DE OLIVEIRA et al. 2011; FERTÉ et al. 2011; BOERS-DOETS et al. 2012, 2013; NICOLATOU-GALITIS et al. 2013).

Um estudo realizado a partir de uma revisão de 44 estudos (n = 2822 pacientes) em relação ao desenvolvimento das EAlm e os inibidores de mTOR, demonstrou uma incidência de 44,3% destas lesões orais em pacientes em uso de everolimo, não havendo predileção pelo sexo. Seguida por uma incidência de 60.8% e 54.6%, em pacientes em uso temsirolimo e

ridaforolimo, respectivamente. Sendo necessária a suspensão (18,4%) e redução da dose (7,1%) nesta população estudada (MARTINS et al. 2013).

O presente estudo demonstra, a partir de informações obtidas dos prontuários de 129 pacientes, uma prevalência de 33,3% de EAlm, com uma maior predileção por mulheres de meia idade ($p = 0,025$), diagnosticadas com neoplasia maligna da mama ($p = 0,019$).

O desenvolvimento destas lesões orais com características clínicas e localização - sendo a língua o principal sitio acometido (32%) - é semelhante aos dados encontrados na literatura. E a mediana para o desenvolvimento da (s) primeira (s) lesão (ões) foi de 17,5 dias, porém, este dado pode ser justificado devido ao fato das visitas ao oncologista serem realizadas quinzenalmente ou a cada três semanas.

Com relação à necessidade da alteração da dose diária e/ou suspensão do everolimo, 17 pacientes (39,5%) necessitaram alterar a dose da droga (de 10mg/dia para 5mg/dia) devido ao quadro de EAlm, sendo este dado estatisticamente significativo para a necessidade de ajuste da medicação e o manejo deste efeito colateral ($p = 0,001$). Por outro lado, quanto a necessidade de suspensão do uso do everolimo, 28 pacientes (65,1%) necessitaram suspender o uso ($p = 1,0$).

Até o momento, não foram encontrados dados na literatura que correlacionem uma maior predisposição ao desenvolvimento de EAlm e pacientes diagnosticadas com neoplasia maligna da mama em uso de terapia combinada (everolimo associado ao exemestano). Exceto o que foi proposto por nosso grupo, o qual demonstrou que pacientes com neoplasia

maligna da mama em terapia combinada possuem um risco aumentado de 2,29 mais chances de desenvolverem EAlm (DE LIMA et al. 2018). Enquanto, no presente estudo, após ampliação da população estudada, este risco foi alterado para 2,34 ($p = 0,015$).

Por outro lado, FERTÉ et al. (2011) a partir da observação clínica de 79 pacientes pertencentes a estudos fase I e II em uso exclusivo de everolimo ou em terapia combinada (everolimo + cisplatina ou etoposídeo ou vinorellbine ou erlotinib ou paclitaxel), demonstrou uma maior predisposição ao desenvolvimento de EAlm em pacientes em uso de terapias combinadas, se comparado aqueles pacientes que realizaram tratamento exclusivo com everolimo (78% versus 57%, respectivamente). Com isso, é pressuposto que possa haver um sinergismo na citotoxicidade destas drogas e isto ser um fator contribuinte para o desenvolvimento das EAlm.

SONIS et al. (2017) a fim de avaliar os efeitos do everolimo em uma matriz organotípica, mimetizando a mucosa oral, demonstrou um aumento dos níveis de apoptose, uma desorganização na estrutura do epitélio oral, diminuição da proliferação celular e aumento das citosinas inflamatórias, neste epitélio tratado com doses de 500ng/mL de everolimo por períodos de 24 e 48 hora. Entretanto, a etologia destas lesões ainda é desconhecida.

Sendo assim, a fim de avaliar uma possível etiologia para as EAlm, espécimes provenientes de três biopsias realizadas em pacientes distintos foram analisados. Inicialmente, estes espécimes foram corados com H&E, cujo o laudo foi de processo inflamatório crônico com área de úlcera. Achado este semelhante ao exposto na literatura para ulcerações aftosas, uma vez

que, não foram realizados estudos que expusessem uma análise histológica das EAlm (NEVILLE et al. 2009).

Outras colorações, como: PAS e Grocott-Gomori, também foram realizadas, a fim de excluir processos infecciosos como diagnóstico diferencial das EAlm. Estudos recentes ressaltam que é de suma importância considerar o histórico progresso de outras lesões orais, como lesões herpéticas e ulcerações aftosas recorrentes, para estabelecimento do correto diagnóstico diferencial para as EAlm geral (SONIS et al. 2010; DE OLIVEIRA et al. 2011; FERTÉ et al. 2011; NICOLATOU-GALITIS et al. 2013).

Análises imunohistoquímicas para avaliação da proliferação celular (KI67) e a presença de receptores de estrógeno e progesterona no epitélio oral foram realizadas. De acordo com o estudo realizado por VÄLIMAA et al. (2004), receptores de estrógeno do subtipo β foram encontrados no epitélio oral e em glândulas salivares e receptores para estrógeno do subtipo α não foram encontrados. Resultados semelhantes para os receptores de estrógeno α foram encontrados neste estudo. Porém, receptores de estrógeno β e progesterona não foram encontrados nos epitélios lesionais biopsiados (painéis imunohistoquímicos negativos).

Já em relação aos índices de proliferação celular no epitélio lesional, as colorações para KI67 foram positivas apenas na camada basal, onde é fisiologicamente comprovada e esclarecida a atividade de proliferação celular nesta região (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2008).

Estudos recentes evidenciaram a presença de células apoptóticas em ulcerações aftosas recorrentes através de uma análise comparativa entre o grupo controle (fragmentos de mucosa oral saudável) e as células positivamente marcadas pelo método de TUNNEL (AL-SAMADI et al. 2015). O mesmo foi observado em nosso estudo. Onde, a partir de uma análise comparativa foram observadas células com marcação positiva para apoptose através do mesmo método, principalmente nos espécimes provenientes de pacientes em uso de terapia combinada (everolimo com exemestano).

Ensaio de cultura celular realizando o tratamento de inibidores de mTOR, associado ou não ao exemestano, em queratinócitos orais ainda não foram realizados, de acordo com a literatura. Porém, o presente estudo evidenciou um maior índice de apoptose celular nos QOD tratados através da associação do inibidor de mTOR com o exemestano. Dado este, que pode corroborar com a colocação de FERTÉ et al. (2011) onde também possa haver uma ação sinérgica na associação destas drogas, aumentando os níveis de apoptose celular e podendo levar ao desenvolvimento das EAlm.

Com relação aos índices de proliferação celular (ensaio de migração), na literatura, também não foram encontrados estudos que realizaram experimentos semelhantes aos que propomos. Nosso estudo evidenciou uma diminuição deste índice em QOD a partir do tratamento exclusivo com exemestano e uma maior diminuição quando tratados de forma combinada (everolimo associado ao exemestano). O período de escolha para a

interpretação destes resultados foi de acordo com o que está proposto na literatura, em que afirma que os QOD iniciam seu processo de proliferação celular 24h depois que plaqueadas (DONG et al. 2015).

O mecanismo de ação da combinação destas duas drogas nos queratinócitos orais ainda não foi completamente esclarecido. Por um lado, relatos a literatura indicam que queratinócitos da pele podem ser estimulados por 17beta-estradiol (E2), o que leva a um aumento de proliferação dependente de ciclina D2 (KANDA e WATANABE 2004). De fato, são conhecidos os efeitos do estradiol sobre a renegeração e espessura da pele (ASHCROFT et al. 1997).

Este hormônio pode ter origem endócrina ou parácrina, já que foi demonstrada a presença de aromatase em queratinócitos orais normais e tumorais (CHENG et al. 2006). De fato, os inibidores de aromatase foram capazes de inibir vias de sinalização celular em culturas celulares de queratinócitos da pele (POMARI et al. 2015). Deste modo, acreditamos que o examestano possa estar atuando nos queratinócitos orais inibindo a produção parácrina de estrógeno, que atuaria como fator promotor de crescimento nos queratinócitos.

Embora o receptor de estrógeno não tenha sido identificado na mucosa oral pelos ensaios realizados neste trabalho, é necessário ressaltar que o ensaio de imunohistoquímica utilizado foi padronizado para células de mama, que expressam altos níveis de receptores de estrógeno. Deste modo, não se pode excluir a expressão do receptor de estrógeno em níveis mais baixos do que os apresentados pelas células de mama.

Assim, a combinação de exemestano com everolimo poderá levar à inibição combinada dos alvos da via de mTOR e da transcrição gênica deflagrada pelo receptor de estrógeno em queratinócitos orais. Com isso, neste estudo buscamos elucidar esta hipótese através de ensaios de western blotting. Foram avaliadas proteínas alvo da via de mTOR (p70S6K e 4E-BP) e genes alvo de regulação transcricional mediada pelo receptor de estrógeno (Ciclina D1). Nestes experimentos, pudemos observar que o inibidor de mTOR foi capaz de inibir tanto a fosforilação de p70S6K e 4E-BP quanto a expressão de Ciclina D1. Por outro lado, o exemestano não teve efeito em nenhuma das vias. Deste modo, através destes experimentos não pudemos identificar os mecanismos de ação combinada de ambas as drogas, sendo então necessários estudos posteriores que possam avaliar outros alvos moleculares.

6 CONCLUSÕES

Sendo assim, de acordo com este estudo, podemos concluir que:

- As estomatites são um dos principais efeitos colaterais relacionados ao uso do everolimo na população estudada;
- Pacientes tratados com everolimo associado ao exemestano apresentam maior predisposição ao desenvolvimento de estomatite;
- A associação de everolimo com exemestano potencializa a apoptose e diminui a motilidade celular em queratinócitos orais displásicos em cultura celular;
- Através da imunohistoquímica, foi possível observar um maior número de células apoptóticas nos espécimes de pacientes em tratamento de everolimo com exemestano.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Samadi A, Drozd A, Salem A, Hietanen J, Häyrynen-Immonen R, Konttinen YT. Epithelial Cell Apoptosis in Recurrent Aphthous Ulcers. **J Dent Res** 2015; 94:928-35.

Amato RJ, Jac J, Giessinger S, Saxena S, Willis JP. A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. **Cancer** 2009; 115:2438-46.

Ashcroft GS, Dodsworth J, Van Boxtel E, et al. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. **Nat Med** 1997; 3:1209-15.

Barnett CM. Everolimus: targeted therapy on the horizon for the treatment of breast cancer. **Pharmacotherapy** 2012; 32:383-96.

Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:520-9.

Beaver JA, Park BH. The BOLERO-2 trial: the addition of everolimus to exemestane in the treatment of postmenopausal hormone receptor-positive advanced breast cancer. **Future Oncol** 2012; 8:651-7.

Boers-Doets CB, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al. Oral adverse events associated with tyrosine kinase and mammalian target of rapamycin inhibitors in renal cell carcinoma: a structured literature review. **Oncologist** 2012; 17:135-44.

Boers-Doets CB, Raber-Durlacher JE, Treister NS, et al. Mammalian target of rapamycin inhibitor-associated stomatitis. **Future Oncol** 2013; 9:1883-92.

Boulay A, Rudloff J, Ye J, et al. Dual inhibition of mTOR and estrogen receptor signaling in vitro induces cell death in models of breast cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5319-28.

Cheng Y-SL, Mues G, Wood D, Ding J. Aromatase expression in normal human oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. **Arch Oral Biol** 2006; 51:612-20.

Corradetti MN, Guan K-L. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? **Oncogene** 2006; 25:6347-60.

Cortot A, Armand J-P, Soria J-C. [PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors]. **Bull Cancer** 2006; 93:19-26.

Cummins M, Pavlakis N. The use of targeted therapies in pancreatic neuroendocrine tumours: patient assessment, treatment administration, and management of adverse events. **Ther Adv Med Oncol** 2013; 5:286-300.

De Lima M, Hajj G, De Lima V, Alves F. Breast cancer patients have increased risk of developing mTOR inhibitor-associated stomatitis. **Oral Dis** 2018; 24:207-9.

De Oliveira MA, Martins E, Martins F, Wang Q, et al. Clinical presentation and management of mTOR inhibitor-associated stomatitis. **Oral Oncol** 2011; 47:998-1003.

De Virgilio C, Loewith R. The TOR signalling network from yeast to man. **Int J Biochem Cell Biol** 2006; 38:1476-81.

Divers J, O'Shaughnessy J. Stomatitis associated with use of mTOR inhibitors: implications for patients with invasive breast cancer. **Clin J Oncol Nurs** 2015; 19:468-74.

Dong Y, Zhao Q, Ma X, et al. Establishment of a new OSCC cell line derived from OLK and identification of malignant transformation-related proteins by differential proteomics approach. **Sci Rep** 2015; 5:12668.

Dutcher JP. Mammalian target of rapamycin inhibition. **Clin Cancer Res** 2004; 10:6382S-7S.

Faivre S, Kroemer G, Raymond E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. **Nat Rev Drug Discov** 2006; 5:671-88.

Ferté C, Paci A, Zizi M, et al. Natural history, management and pharmacokinetics of Everolimus-induced-oral ulcers: Insights into compliance issues. **Eur J Cancer** 2011; 47:2249-55.

Junqueira L, Carneiro J. **Histologia básica: texto e atlas**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Tecido epitelial; p.66-90.

Kalogirou E-M, Tosios KI, Piperi EP, Sklavounou A. mTOR inhibitor-associated stomatitis (mIAS) in three patients with cancer treated with everolimus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2015; 119:e13-9.

Kanda N, Watanabe S. 17 β -estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing Cyclin D2 expression. **J Invest Dermatol** 2004; 123:319-28.

Koul D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:1321-5.

Kudo M. mTOR inhibitor for the treatment of hepatocellular carcinoma. **Dig Dis** 2011; 29:310-5.

Lebwohl D, Thomas G, Lane HA, et al. Research and innovation in the development of everolimus for oncology. **Expert Opin Drug Discov** 2011; 6:323-38.

Lebwohl D, Anak Ö, Sahmoud T, et al. Development of everolimus, a novel oral mTOR inhibitor, across a spectrum of diseases. **Ann N Y Acad Sci** 2013; 1291:14-32.

Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N. mTOR, translation initiation and cancer. **Oncogene** 2006; 25:6416-22.

Martins F, De Oliveira MA, Wang Q, et al. A review of oral toxicity associated with mTOR inhibitor therapy in cancer patients. **Oral Oncol** 2013; 49:293-8.

Meng Q, Xia C, Fang J, Rojanasakul Y, Jiang B-H. Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway. **Cell Signal** 2006; 18:2262-71.

Moser J, Kahlhammer G. **BOLERO-2-Studie: mTOR-Inhibitor Everolimus in Kombination mit Exemestan beim hormonrezeptorpositiven metastasierten Mammakarzinom.** Kongress SO 04.11.2011. Available from: <URL:<https://bit.ly/2VhLyV2>> [2018 set 12]

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2018: incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2018.

[NCI] National Cancer Institute. **PDQ Supportive and Palliative Care Editorial Board. Oral Complications of Chemotherapy and Head/Neck Radiation (PDQ®): Health Professional Version**. 2016 Dec 16. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): NCI; 2002-. Available from: <URL:<https://bit.ly/2EwlizQ>> [2018 dez 15]

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. **Patologia oral e maxilofacial**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. Ulcerações aftosas menores; p.334-6.

Nguyen SA, Walker D, Gillespie MB, Gutkind JS, Day TA. mTOR inhibitors and its role in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **Curr Treat Options Oncol** 2012; 13:71-81.

Nicolatou-Galitis O, Nikolaidi A, Athanassiadis I, Papadopoulou E, Sonis S. Oral ulcers in patients with advanced breast cancer receiving everolimus: a case series report on clinical presentation and management. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2013; 116:e110-e6.

Novartis. Afinitor; (everolimus) [prescribing information]. Available from: <URL:<http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf>> [2018 nov 16]

Pomari E, Valle LD, Pertile P, Colombo L, Thornton MJ. Intracrine sex steroid synthesis and signaling in human epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts. **FASEB J** 2015; 29:508-24.

Raught B, Peiretti F, Gingras A-C, et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. **EMBO J** 2004; 23:1761-9.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature** 2005; 433:477-80.

Rizell M, Andersson M, Cahlin C, Hafström L, Olausson M, Lindnér P. Effects of the mTOR inhibitor sirolimus in patients with hepatocellular and cholangiocellular cancer. **Int J Clin Oncol** 2008; 13:66-70.

Rugo HS, Pritchard KI, Gnant M, et al. Incidence and time course of everolimus-related adverse events in postmenopausal women with hormone receptor-positive advanced breast cancer: insights from BOLERO-2. **Ann Oncol** 2014; 25:808-15.

Ruvinsky I, Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. **Trends Biochem Sci** 2006; 31:342-8.

Schwartz JL, Muscat JE, Baker V, et al. Oral cytology assessment by flow cytometry of DNA adducts, aneuploidy, proliferation and apoptosis shows differences between smokers and non-smokers. **Oral Oncol** 2003; 39:842-54.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. **CA Cancer J Clin** 2019; 69:7-34.

Sonis S, Treister N, Chawla S, Demetri G, Haluska F. Preliminary characterization of oral lesions associated with inhibitors of mammalian target of rapamycin in cancer patients. **Cancer** 2010; 116:210-5.

Sonis S, Andreotta P, Lyng G. On the pathogenesis of mTOR inhibitor-associated stomatitis (mIAS)-studies using an organotypic model of the oral mucosa. **Oral Dis** 2017; 23:347-52.

Välilä H, Savolainen S, Soukka T, et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. **J Endocrinol** 2004; 180:55-62.

Wang X. Eukaryotic initiation factor 2B: identification of multiple phosphorylation sites in the epsilon-subunit and their functions in vivo. **EMBO J** 2001; 20:4349-59.

Wiedenmann B, Pavel M, Kos-Kudla B. From targets to treatments: a review of molecular targets in pancreatic neuroendocrine tumors. **Neuroendocrinology** 2011; 94:177-90.

Witzig TE, Kaufmann SH. Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin pathway in hematologic malignancies. **Curr Treat Options Oncol** 2006; 7:285-94.

Wong K-K, Engelman JA, Cantley LC. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 2010; 20:87-90.

Zagouri F, Sergentanis TN, Chrysikos D, Filipits M, Bartsch R. mTOR inhibitors in breast cancer: a systematic review. **Gynecol Oncol** 2012; 127:662-72.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2011; 12:21-35.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **09/08/2016**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **21/06/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2221/16** intitulado: “**Análise das proteínas da via PI3K/mTOR, ciclo celular e apoptose em pacientes portadores de estomatites associadas ao uso de everolimo**”.

Pesquisador responsável: Dr. Fábio de Abreu Alves
Aluno: Matheus Henrique Alves de Lima (Mestrado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 15 de Agosto de 2016.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Cairés Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Parecer de Aprovação de Emenda do Comitê de Ética



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 30 de janeiro de 2017.

Ao
Dr. Fabio de Abreu Alves
Aluno: Matheus Henrique Alves de Lima

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 2221/16
“Análise das proteínas da via PI3K/mTOR, ciclo celular e apoptose em pacientes portadores de estomatites associadas ao uso do everolimo”.


Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **24/01/2017**, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Emenda ao projeto em documento datado de 18 de novembro de 2016;
- Projeto com alteração na metodologia, devido à falha no projeto piloto, datado de 17 de novembro de 2016;
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 03 de 17 de novembro de 2016.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Breast cancer patients have increased risk of developing mTOR inhibitor-associated stomatitis

MHA de Lima¹ | GNM Hajj² | VCC de Lima³ | FA Alves¹ 

¹Stomatology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

²International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

³Medical Oncology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence

Fábio Abreu Alves, Stomatology Department, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, SP, Brazil.
Email: falves@accamargo.org.br

A total of 115 patients who used everolimus were evaluated. The mean age was 57 (± 13.3) years old, and 87 patients were women (75.6%). mTOR inhibitor-associated stomatitis (mIAS) was observed in 36 patients (31.3%). The lesions ranged from 0.5 cm to 1.5 cm, and the tongue was the main site affected. In addition, 21 patients (58.3%) required a dose reduction of everolimus due to mIAS. Patients who had breast cancer presented 2.29-fold higher risk for developing mIAS when compared to patients with kidney or neuroendocrine tumors. This study emphasizes the high prevalence of mIAS in patients using everolimus, in particular, in patients with breast cancer.

KEYWORDS

everolimus, mTOR inhibitors, mTOR inhibitors associated stomatitis, stomatitis

1 | INTRODUCTION

mTOR inhibitor-associated stomatitis (mIAS) has been described in 44.3% of the patients using everolimus to treat breast, kidney, and neuroendocrine malignancies (Martins et al., 2013). Clinically, such lesions are characterized as ulcerated, aphthous-like lesions, located mainly in non-keratinized mucosa. Furthermore, mIAS is a signal of dose-limiting toxicity of everolimus (de Oliveira et al., 2011; Sonis, Treister, Chawla, Demetri, & Haluska, 2010). The present study aimed to describe a population of cancer patients treated with everolimus and characterize clinical and demographical data associated with mIAS development.

2 | MATERIAL AND METHODS

Patients treated at the AC Camargo Cancer Center who used everolimus to avoid tumor progression (HER2-negative breast cancer and advanced kidney and neuroendocrine tumors) between March 2016 and May 2017 were evaluated. The protocol consisted of everolimus (10 mg po qd) plus exemestane (25 mg po qd) for breast cancer and everolimus alone (5–10 mg po qd) for kidney and neuroendocrine tumors. The AC Camargo Cancer Center ethics committee approved the study (2221/16).

Clinical data and mIAS features were recorded from the patients' charts. Descriptive and statistical analyses were performed using Fisher's exact test. McNemar's test was used to compare mIAS rate between clinically relevant categories. Log-rank and Wilcoxon sum tests were used to calculate time to mIAS development. All tests were performed with SPSS Statistics v24 (IBM®) software. Tests were deemed statistically significant if $p < .05$.

3 | RESULTS

A total of 115 patients were treated with everolimus during the period of the study. The mean age was 57 (± 13.3) years old, 87 patients were women (75.6%), and breast cancer was the most prevalent neoplasia (68 patients—59.2%), followed by neuroendocrine tumors (32 patients—27.8%) and kidney cancer (15 patients—13%). Advanced clinical staging (III and IV) was observed in 109 patients (94.7%).

mTOR inhibitor-associated stomatitis was observed in 36 patients (31.3%), of which there were 32 women and four men. Breast cancer was present in 26 patients (72.2%), with five patients each having kidney cancer (13.9%) and neuroendocrine cancer (13.9%). mIAS was more frequently found in women patients ($p = .03$) and patients with breast cancer ($p = .04$). Furthermore, patients with breast cancer presented 2.29-fold higher risk for developing mIAS when compared to

Anexo 4 - Estudo Piloto

ESTUDO PILOTO - PROPOSTA INICIAL

A fim de padronizar a metodologia proposta, antes de iniciar as coletas dos pacientes, foi realizado um projeto piloto pelos pesquisadores do estudo, no qual foram coletadas amostras provenientes da mucosa oral de indivíduos saudáveis a fim de testar, quantificar e padronizar este método, utilizando a metodologia proposta por SCHWARTZ et al. (2003) - utilizando diferentes coletores de células orais (A - Citobrush; B - Biopsy Brush; C - Swab e D - Espátula de madeira - Abaixador de língua).

Inicialmente, cada indivíduo realizou um bochecho com solução salina (PBS 1x) gelada a fim de diminuir a quantidade de resíduos, colônias bacterianas e células descamativas da mucosa oral. A seguir, foram realizados raspados, no mínimo, dez movimentos circulares, utilizando diferentes tipos de coletores nos sítios anatômicos propostos. Após a coleta, o experimentador desprezou o primeiro raspado, pois, de acordo com o protocolo proposto, 70% destas células são células descamativas do epitélio oral. Com isso, novos raspados foram realizados e acondicionados em um tubo cilíndrico em solução de PBS gelada, centrifugadas a 900 RPM a 23°C, removido o sobrenadante, realizada a lavagem do *pellet*, ao menos por duas vezes, com PBS e realizada a suspensão das mesmas em 50uL de PBS para posterior realização dos experimentos com o material coletado.

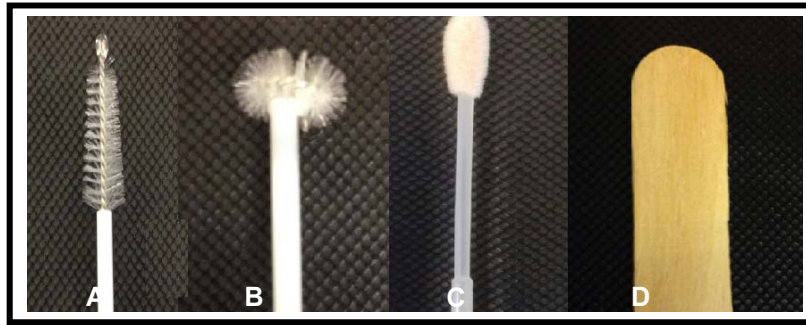


Figura - Coletores de células orais. A - Citobrush; B - Biopsy Brush; C - Swab e D - Espátula de madeira - Abaixador de língua).

Depois de realizadas as coletas e seguido o protocolo, foram realizadas as quantificações das proteínas presentes nestas amostras, a fim de testar a viabilidade da mesma para a realização dos experimentos propostos. Estas análises foram realizadas através da quantificação de proteínas, seguindo o método de Bradford, utilizando o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate ® (Bio-Rad).

Em uma placa de *96- Wells* (Corning) foram adicionadas, em triplicatas, diferentes concentrações da proteína albumina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) para obtenção de uma curva-padrão. A fim de dosar as amostras, 20 uL dos extratos provenientes do raspado bucal foram aplicados nos poços, também em triplicatas, e em seguida lidas as absorbâncias em um comprimento de onda de 595nm através do *Microplate Reader S/N Absorbance Report*, BIO-RAD®.

ESTUDO PILOTO - RESULTADOS

Inicialmente, tinha-se como proposta deste estudo a realização de raspados citológicos provenientes da mucosa oral de pacientes do A.C. Camargo Cancer Center com proposta de tratamento com everolimo. Para isso, os pesquisadores, prévio ao início destas coletas, realizaram um estudo piloto, como proposto na metodologia deste estudo.

Depois de realizadas as coletas, em indivíduos saudáveis e voluntários, foram realizadas as quantificações das proteínas presentes nestas amostras, a fim de testar a viabilidade das mesmas para a realização dos experimentos propostos.

Tabela - Concentração final das proteínas da amostra em ug/uL e quantidade de proteína (ug) em 30uL.

<i>Amostras - Coletores</i>		<i>[] ug/ul</i>	<i><u>Quantidade de total de proteínas da amostra (ug/30uL).</u></i>
Experimento 01	Citobrush	0,129199	3,60
	Biopsy Brush	0,143411	4,20
	Swab	0,162791	4,80
	Espatula de madeira	0,05857	1,50
Experimento 02	Citobrush	0,170019	5,10
	Biopsy Brush	0,151762	4,50
	Swab	0,259065	7,50
Experimento 03	Citobrush	0,393543	11,70
	Biopsy Brush	0,377401	11,10

Com isso, observando os dados do quadro acima (tabela 4), pudemos concluir que, após a quantificação das proteínas pelo método descrito anteriormente, a quantidade de proteína obtida era insuficiente para a realização dos experimentos, caracterizando a falha no protocolo proposto através do projeto piloto. Assim, para compensar a falha no projeto piloto, utilizamos células do epitélio oral (queratinócitos orais displásicos) para a realização de experimentos *in vitro*.

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Convido-o a participar da pesquisa: ***ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/mTOR, CICLO CELULAR E APOPTOSE EM PACIENTES PORTADORES DE ESTOMATITES ASSOCIADAS AO USO DE EVEROLIMO.***

Objetivo: O(a) Sr(a) está sendo convidado a participar deste estudo por estar para iniciar o tratamento com medicamento Everolimo, em acompanhamento junto a oncologia clínica do A.C. Camargo Cancer Center. O objetivo desta pesquisa é analisar e identificar possíveis alterações que comprovem o desenvolvimento destas “aftas” em boca.

Justificativa: O tratamento com esta medicação pode desenvolver “aftas” como efeito colateral. A origem destas “aftas” ainda é desconhecida. Sendo assim, estamos desenvolvendo esta pesquisa para tentarmos identificar uma possível causa para estas “aftas” e promover, futuramente, melhores condições de conforto ao paciente em uso desta medicação (Everolimo) que possa desenvolver estas “aftas” em boca.

Procedimento: Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, será realizado o preenchimento de uma ficha, a qual será preenchida com informações contidas no prontuário e o(a) Sr(a) será examinado em dois momentos: ao iniciar e quatorze dias após o início da medicação Everolimo. Caso o(a) sr(a), desenvolva “aftas” associadas ao uso de Everolimo, estas “aftas” serão removidas através de uma pequena cirurgia, com anestesia local para minimizar a dor do procedimento, seguida da remoção da lesão e dado ponto(s), e analisadas. A expectativa dos pesquisadores é identificar a causa destas “aftas” associadas ao uso de Everolimo em boca e estabelecer um protocolo de auxílio para aqueles pacientes que possivelmente desenvolverão estas “aftas”.

Desconforto ou riscos: O projeto traz como risco mínimo a perda da confidencialidade dos dados. Porém, os pesquisadores comprometem-se em manter ao máximo o sigilo da pesquisa. O desconforto que poderá vir a ocorrer será o do incomodo pós-operatório, havendo, também, possíveis riscos de: sangramento, inchaço, manchas roxas e vermelhidão no local operado, caso o(a) sr(a). desenvolva “aftas” em boca.

Método alternativo de tratamento: Bochechos contendo anti-inflamatórios e anestésicos.

Benefícios: O projeto não apresenta benefícios diretos aos pacientes envolvidos, uma vez que, trata-se de uma pesquisa básica, sem aplicação direta dos resultados obtidos. Os resultados desta pesquisa caracterizarão benefícios futuros, pois, ajudarão a obter informações e conhecimentos que auxiliarão em um entendimento mais aprofundado da possível origem destas “aftas”.

Ficha de coleta e privacidade: Os dados do(a) Sr(a). serão anotados em uma ficha que ficará sob responsabilidade dos pesquisadores, com a garantia de que haverá sigilo quanto a sua identidade. Os resultados obtidos ficarão sob a responsabilidade do Departamento de Estomatologia do A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, aos cuidados dos pesquisadores, e serão utilizados como dados de pesquisa, podendo vir a serem divulgados em artigos e/ou congressos, resguardando-se sempre o sigilo quanto à sua identificação. Serão utilizando códigos de identificação dos participantes, ao invés de dados pessoais como: seu nome ou demais dados. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicá-lo e/ou alterar o tratamento necessário. Será mantido o atendimento padrão, visado pelo departamento de estomatologia e demais especialidades do A.C.Camargo Cancer Center.

Dúvidas: Qualquer dúvida, pergunte quantas vezes necessário, e o(a) sr(a) será esclarecido em qualquer momento da pesquisa. Você poderá entrar em contato com o pesquisador Matheus Henrique Alves de Lima, telefone (011) 95154-5906 e (11) 2189-5000, ramal 5129. Se o pesquisador não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética e pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center - SP, pelo telefone (11) 2189-5020, com horário de funcionamento de segunda-feira à quinta-feira das 7:00 horas às 18:00 horas e sexta-feira das 7:00 horas às 16:00 horas.

Abandono: Caso não deseje participar da pesquisa ou queira retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo ou punição.

Resultado: O(a) Sr(a). poderá ter acesso aos resultados provenientes das análises das suas amostras, caso seja do seu interesse. O resultado obtido da pesquisa não alterará em nada o tratamento e/ou seguimento do(a) Sr(a).

Eu, _____,
RG número _____, abaixo assinado, declaro que consinto participar no trabalho intitulado “**ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/mTOR**,”

CICLO CELULAR E APOPTOSE EM PACIENTES PORTADORES DE ESTOMATITES ASSOCIADAS AO USO DE EVEROLIMO” e declaro que fui satisfatoriamente esclarecido e que estou livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa sem que isso implique em prejuízo ao meu tratamento e que não preciso apresentar justificativas para isso. Sei também de todas as informações por mim fornecidas e os resultados obtidos na pesquisa só serão utilizados para divulgação científica em reuniões e revistas científicas. Serei informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato desses poderem mudar meu consentimento em participar da pesquisa. Concordo também em responder às questões contidas no formulário que me foi apresentado. Assim, concordo em participar da pesquisa em questão. Declaro ainda que assinei duas vias do presente Termo de Consentimento e que uma via me foi entregue.

São Paulo/SP, ____ de _____ de _____

Assinatura do participante: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Este formulário foi lido enquanto eu estava presente.

Nome da testemunha: _____ Assinatura _____.

Apêndice 2 - Ficha de Coleta de Dados Clínico

ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA VIA PI3K/mTOR, CICLO CELULAR E APOPTOSE EM PACIENTES PORTADORES DE ESTOMATITES ASSOCIADAS AO USO DE EVEROLIMO.

Pesquisador: Matheus Henrique Alves de Lima

Orientador: Dr. Fabio de Abreu Alves

Co-orientadores: Dr. Vladmir Claudio Cordeiro de Lima,

Dra. Gláucia Noeli Maroso Hajj

FICHA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Data: ___/___/___

No. de Identificação: _____

RGH: _____

Idade: _____

Gênero: Masculino () Feminino ()

Fumante: () Não () Sim () Ex. Se sim ou ex, Quanto? _____ Duração? _____

Etilista: () Não () Sim () Ex. Se sim ou ex, Quanto? _____ Duração? _____

Diagnóstico: () Mama () Rins () Neuroendócrino

Data do diagnóstico: ___/___/___

Tipo histológico do tumor:

Estadiamento: T () N () M ()

Metástases? Não () Sim () Local(is):

Tratamento(s) Prévio(s):

Tratamento(s) Atual(is):

Medicação(ões) em uso:

Data do início do Everolimo: ___/___/___

Observou lesões e/ou alterações em cavidade oral após o início da medicação? Não () Sim () Se sim, Quando?: ___/___/___

O que sentiu?

Data da biópsia das EAlm: ___/___/___

Laudó (No.: _____, ___/___/___):

Data de prescrição do bochecho com corticoide: ___/___/___

Data de melhora das lesões em cavidade oral: ___/___/___

Outros sintomas? () Não () Sim, especificar, vide quadro abaixo:

- | | |
|--|--|
| <input type="radio"/> Mielossupressão | <input type="radio"/> Diarréia |
| <input type="radio"/> Rash cutâneo | <input type="radio"/> Xerostomia |
| <input type="radio"/> Prurido | <input type="radio"/> Disgeusia e disfagia |
| <input type="radio"/> Ressecamento cutâneo | <input type="radio"/> Fadiga e fraqueza |
| <input type="radio"/> Reação mão-pé | <input type="radio"/> Dor muscular generalizada. |
| <input type="radio"/> Náusea e vômito | |