DURVAL TOLEDO

**Aspectos da E-caderina na invasão óssea do carcinoma
epidermóide da mucosa oral**

São Paulo

2016

DURVAL TOLEDO

**Aspectos da E-caderina na invasão óssea do carcinoma
epidermóide da mucosa oral**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, para obter o título de Mestre.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Toledo, Durval.

Aspectos da E-caderina na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral / Durval Toledo ; orientador Silvia Vanessa Lourenço. -- São Paulo, 2016.

88p. :ilus., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Epitélio bucal. 3. Mesordema. 4. Mucosa oral. I. Lourenço, Silvia Vanessa. II. Título.

Toledo D. Aspectos da E-caderina na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 13 / 04 /2016

Banca Examinadora

Profa. Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Instituição: AC Camargo Cancer Center. Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Claudio Costa

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP. Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Ricardo Hsieh

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP. Julgamento: Aprovado

Aos meus pais Antonio e Brigida e minha irmã Brigida, pela constante preocupação com o meu bem estar e com o andar da pós-graduação, nunca deixando de me apoiar financeiramente e psicologicamente.

Aos meus amigos de pós-graduação, pelos bons e maus momentos, alegrias e tristezas e, principalmente, pelo aprendizado e companheirismo.

À Prof.^a Dra. Mônica Andrade Lotufo, por ter-me feito gostar da Odontologia ao me mostrar quão bela e interessante pode ser a ciência por trás desta área.

À Prof.^a Dra. Silvia Vanessa Lourenço, pela qual criei grande admiração pessoal e profissional. Estes dois anos ao seu lado me proporcionaram aprendizados e momentos que levarei para a vida inteira.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Silvia Vanessa Lourenço, primeiramente, pois sem sua paciência, didática e disposição este trabalho não seria finalizado.

Aos pós-graduandos do Instituto de Medicina Tropical da USP e da FMUSP, em especial ao prof. Dr. Ricardo Hsieh, por me auxiliarem em toda etapa laboratorial, demonstrando papel ativo e fundamental na elaboração desta pesquisa.

À Prof.^a Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo, pela confecção das lâminas brancas utilizadas no estudo.

Aos alunos de iniciação científica: Leonardo Keiji, Gabriela Matos e Emerson Santiago, pelos auxílios e pelos aprendizados compartilhados.

Aos funcionários do departamento, pela constante ajuda e auxílio nos inconvenientes diários referentes ao projeto e à pós-graduação em si.

À instituição CAPES pelo auxílio monetário referente à bolsa de estudo durante certo período cumprido.

RESUMO

Toledo D. Aspectos da E-caderina na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

O carcinoma epidermóide da mucosa oral (CEMO) é uma neoplasia maligna comum; no Brasil, são estimados, para 2016, 15.490 novos casos. A invasão óssea ocorre em casos avançados.; esta é classificada em erosiva e infiltrativa. Aparentemente, o processo de transição epitélio-mesenquimal, com o envolvimento da E-caderina, é implicado. Foi investigada a expressão de E-caderina, por meio da imunoistoquímica em 15 casos avançados de CEMO e avaliada sua correlação com as características clínicas e histológicas da invasão óssea. A imunoexpressão da E-caderina foi estudada nos 15 casos de CEMO com evidência histológica de invasão óssea. A maioria dos pacientes eram homens (10 pacientes) e apresentavam invasão em mandíbula (9 casos). A expressão de E-caderina foi negativa em CEMOs com invasão erosiva e positiva nos casos que apresentavam infiltração óssea. A expressão de E-caderina na invasão óssea sugere que a participação do fenômeno de transição epitélio-mesenquimal é um fator diretamente envolvido com o tipo de invasão óssea.

Palavras-chave: E-caderina. Carcinoma epidermoide oral. Invasão óssea. TNM.

ABSTRACT

Toledo D. E-cadherin expression in oral squamous cells carcinoma with bone invasion [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a common malignancy; in Brazil it is estimated, in 2016, 15.490 new cases. Bone invasion occurs in advanced cases; it is classified in erosive and infiltrative patterns. Apparently, the epithelial-mesenchymal phenomenon, with important participation of E-cadherin is implicated. We investigated the expression of E-cadherin in advanced OSCC and correlated its expression with the clinical characteristics and histologic patterns of bone invasion. Immunoexpression of E-cadherin was studied in 15 cases of OSCC with histological evidence of bone invasion. Most patients were men (10 patients) and presented mandible invasion (9 cases). The expression of E-cadherin was negative in OSCC in erosive bone invasion and positive in the infiltrative bone invasion. E-cadherin expression in bone invasion suggests that participation of epithelial-mesenchymal phenomenon is dependent on the patterns of tumour bone invasion.

Keywords: E-cadherin. Oral Squamous Cell Carcinoma. Bone invasion. EMT.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Distribuição dos casos estudados por sexo	57
Gráfico 5.2- Distribuição dos casos estudados de acordo com a cor da pele declarada nos prontuários analisados	58
Gráfico 5.3- Distribuição dos casos estudados de acordo com a classificação da diferenciação tumoral.....	61
Gráfico 5.4- Distribuição dos casos estudados de acordo com o perfil de invasão óssea.....	61
Gráfico 5.5- Perfil de invasão óssea de acordo com a diferenciação tumoral	62
Gráfico 5.6- Distribuição da expressão da E-caderina de acordo com a diferenciação tumoral.....	66
Gráfico 5.7- Expressão da E-caderina em CEMOs de pacientes vivos com doença	66
Gráfico 5.8- Expressão da E-caderina em CEMOs de pacientes que foram a óbito	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Aspectos clínicos do carcinoma epidermóide.....	27
Figura 2.2 - Esquematização da invasão do CEMO em suas várias etapas	29
Figura 2.3 - Estrutura normal do epitélio da mucosa oral.....	37
Figura 2.4 - Apresentação esquemática do carcinoma epidermóide da mucosa oral com invasão óssea.....	38
Figura 2.5 - Apresentação esquemática da invasão óssea.....	39
Figura 2.6 - Representação esquemática do processo de TEM com migração das células neoplásicas ao vaso sanguíneo	43
Figura 2.7 - Apresentação esquemática da molécula de E-caderina	47
Figura 2.8 - Detalhes sobre a molécula de E-caderina	48
Figura 5.1 - Exemplos dos aspectos histopatológicos de carcinoma epidermóide da mucosa oral com invasão óssea.....	63
Figura 5.2 - Aspectos da expressão de E-caderina na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral.....	68
Figura 6.1 - Ilustração da hipótese de perda e ganho de expressão da E-caderina no CEMO, de acordo com as fases da invasão óssea.....	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Classificação TNM/FIGO da IARC, para carcinomas da cavidade oral	33
Quadro 2.2- Exemplos de marcadores biológicos associados ao CEMO	35
Quadro 2.3- Principais fatores de transcrição envolvidos no processo TEM	44
Quadro 5.1- Dimensões tumorais, tipo histológico, tipo de invasão óssea e expressão de E-caderinas	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soro de Albumina Bovina
CEMO	Carcinoma Epidermóide da Mucosa Oral
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HPV	Papiloma Vírus Humano
IARC	Sociedade Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
kD	Quilodalton
NF	Fator de Necrose
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
TNM	Classificação do estadiamento tumoral
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
µm	Micrômetro
°C	Graus Célsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 Epidemiologia do carcinoma epidermóide da mucosa oral.....	25
2.2 Diagnóstico e estágios clínicos.....	26
2.3 Patogenia	34
2.4 Características histopatológicas	36
2.5 A invasão óssea	38
2.6 Características moleculares da invasão óssea.....	40
2.7 Transição epitélio-mesenquimal.....	41
2.8 Moléculas de adesão e as caderinas	45
3 PROPOSIÇÃO	51
3.1 Objetivos gerais	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Seleção de casos	53
4.1.1 Critérios de Inclusão	53
4.1.2 Critérios de Exclusão	53
4.2 Ética	53
4.3 Coleta de Dados, Lâminas e Blocos de Parafina	54
4.4 Imunoistoquímica.....	54
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Aspectos clínico-demográficos	57
5.2 Aspectos patológicos	60
5.3 Imunoistoquímica.....	64
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

O câncer vem sendo, nos últimos anos, considerado uma doença crônica. No Brasil estudos epidemiológicos sobre o carcinoma epidermóide da mucosa oral (CEMO) mostram índices alarmantemente altos, constituindo problemas para o sistema público de saúde (Massano et al., 2006; Durazzo et al., 2005).

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima que no ano de 2016 haverão 596.070 novos casos no Brasil. Entre os homens a estimativa é de 295.200 casos, e entre as mulheres espera-se 300.870 novos diagnósticos. O tipo de câncer estimado como o mais incidente em ambos os sexos deverá ser o de pele não melanoma (29% do total estimado). Em homens, os tumores da próstata corresponderão a 61.200 novos casos/ano, seguidos pelos casos de câncer do pulmão (17.330), cólon e reto (16.660), estômago (12.920), cavidade oral (11.140), esôfago (7.950), bexiga (7.200), laringe (6.360) e leucemias (5.540). Entre as mulheres, as maiores incidências serão de cânceres de mama (57.960), cólon e reto (17.620), colo do útero (16.340), pulmão (10.860), estômago (7.600), corpo do útero (6.950), ovário (6.150), glândula tireoide (5.870), linfoma não-Hodgkin (5.030) e cavidade oral (4.350).

O carcinoma epidermóide da mucosa oral, assim, totalizará cerca de 15.490 novos casos, com número de óbitos estimado em 5.401.

O carcinoma epidermóide da mucosa oral é uma doença multifatorial cuja etiologia envolve fatores genéticos e outros fatores, como o etilismo e tabagismo crônicos.

O diagnóstico precoce da doença é fundamental para seu tratamento eficaz e cura, mas diversos fatores sociais mostram que a doença, na maioria dos casos, é diagnosticada em fases avançadas, o que leva a tratamentos mutiladores e óbito.

Nas últimas décadas, diversos pesquisadores vêm investigando fatores que possam contribuir para a maior eficiência do diagnóstico do CEMO nas fases

precoces da doença, para a predição do comportamento tumoral e também, alvos moleculares terapêuticos, especialmente nos casos avançados que envolvem invasão óssea e cujo tratamento cirúrgico leve a mutilações importantes.

Nesse sentido, um dos mecanismos biológicos que vêm sendo foco de intensas pesquisas é a transição epitélio-mesenquimal (TEM). Esse mecanismo biológico descreve a mudança de fenótipo e comportamento celular em diversas situações, para facilitar processos de migração e evasão da vigilância imunológica. Esse mecanismo parece ser importante nos processos de invasão tumoral.

Dentre as moléculas envolvidas no processo, a E-caderina tem sido apontada como protagonista nos tecidos epiteliais, uma vez que é uma das principais moléculas envolvidas na adesão intercelular.

Assim, nosso estudo avaliou a participação da E-caderina nos processos de invasão óssea no carcinoma epidermóide.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do carcinoma epidermóide da mucosa oral

O carcinoma epidermóide da mucosa oral está inserido em um grupo de neoplasias denominado câncer de cabeça e pescoço. Esse grupo envolve neoplasias malignas da mucosa oral, seios paranasais, cavidade nasal, orofaringe e laringe (Argiris et al., 2008). O CEMO acomete a cavidade oral anteriormente à orofaringe (delimitada pelo anel de Waldeyer), podendo envolver o palato mole, palato duro, rebordo alveolar e gengivas, mucosa jugal, os dois terços anteriores da língua, soalho, região retromolar e lábios (Landry; Glastonbury, 2015; Huber; Tantiwongkosi, 2014).

De acordo com a publicação de Argiris et al. (2008), o câncer da cabeça e pescoço é o sexto tipo mais comum de neoplasia, correspondendo a cerca de 6% de todos os casos de tumores, mundialmente. No Brasil, o INCA estima que no ano de 2016 o CEMO totalizará cerca de 15.490 novos casos, com número de óbitos estimado em 5.401.

A doença é diagnosticada primordialmente em pacientes com média de idade de 60 anos; homens são mais acometidos, embora há evidências de um aumento de número de casos em mulheres (Argiris et al., 2008; Durazzo et al., 2005). Girod et al. (2009), relatam que a incidência da doença na França é crescente em mulheres, apesar de os números globais terem diminuído. Esse fato está provavelmente associado a mudanças sócio-culturais. Os casos em mulheres também parecem ter uma progressão mais agressiva que nos homens. Há também evidências recentes do aumento do número de casos em pacientes jovens, até 40 anos de idade, principalmente nos países ocidentais (Américas e Europa). A sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 60%, de acordo com as bases do *Surveillance Epidemiology and End Results* (Argiris et al., 2008; Chi et al., 2015).

O tabagismo e etilismo crônico está implicado em cerca de 75% dos casos. Ainda, polimorfismos genéticos em enzimas que metabolizam substâncias presentes no tabaco e no álcool têm sido relacionados ao risco para o desenvolvimento da doença. Ainda, o risco para a doença está relacionado a suscetibilidades genéticas individuais ou a síndromes, como a síndrome de Lynch (câncer colorretal não-polipose hereditário), a síndrome de Li-Fraumeni, anemia de Fanconi e telangectasia atáxica (Argiris et al., 2008; Chi et al., 2015).

O papiloma vírus humano (HPV), especialmente os do tipo 16 e 18, vêm mais recentemente sendo implicado como fator causal dos casos de câncer da cabeça e pescoço. Essa associação, em cerca de 25% dos casos (detectados por meio de hibridização *in situ*), ocorrem majoritariamente na região das tonsilas e na orofaringe (Argiris et al., 2008; Chi et al., 2015).

2.2 Diagnóstico e estágios clínicos

A detecção precoce da doença é fundamental para o sucesso do tratamento e para a melhora das taxas de sobrevida.

Os métodos de estadiamento incluem o exame clínico e exames de imagem como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética.

Clinicamente a neoplasia apresenta-se ulcerada, branca, vermelha ou verrucosa, ou como uma massa persistente, vegetante, e endurecida (Figura 2.1).

Figura 2.1- Aspectos clínicos do carcinoma epidermóide

A-D: Carcinoma epidermóide da mucosa oral: em A, forma inicial, lesão vermelha irregular, com área papilomatosa, na borda lateral da língua; B: úlcera vegetante na borda lateral posterior da língua; neoplasia vegetante no soalho/base da língua, em C; carcinoma epidermóide extenso, vegetante no ápice da língua, em D.

A maioria dos casos ocorre na mucosa não-queratinizada, e a borda lateral da língua é uma das localizações mais comuns da neoplasia (Pezier; Partridge, 2011; Huber; Tantiwongkosi, 2014). Os sintomas estão geralmente presentes nos estágios mais avançados da doença e incluem dor, disfagia, otite, perda de peso e trismo, além de parestesia. A disseminação metastática ocorre nas cadeias linfonodais submandibular, cervical e jugular, e o sítio metastático distante mais comum é o pulmão (Huber; Tantiwongkosi, 2014).

O estadiamento clínico é útil para o planejamento do tratamento do paciente, e o método mais utilizado é a classificação TNM, onde T refere-se ao tamanho da neoplasia primária, N refere-se ao número de linfonodos regionais acometidos pela doença e M refere-se à presença de metástases distantes. A distinção entre os estágios de doença localizada (I e II) e dos estágios mais avançados da doença (III e IV) são essenciais na determinação terapêutica. Nessa classificação ainda são importantes o volume tumoral, a gradação histológica, os níveis das metástases linfonodais, o padrão de crescimento tumoral e o crescimento extracapsular (Edge et al., 2010; Huber; Tantiwongkosi, 2014; Chi et al., 2015).

Diversas também são as tentativas de relacionar o desenvolvimento e progressão do carcinoma epidermóide da cavidade oral com fatores clínico-patológicos que eventualmente possam ditar/prever seu prognóstico. Desses fatores, destacam-se classicamente:

- ❖ Sítios anatômicos que expressam variantes com relação à irrigação e vasos linfáticos, relacionando-se com a disseminação da doença.
- ❖ Estágio da doença baseado no sistema de classificação TNM.
- ❖ Espessura da neoplasia que relaciona-se ao risco de metástases locais, regionais e à distância.
- ❖ Tipo histológico, invasão extracapsular, invasão vascular e perineural, fatores todos relacionados ao prognóstico e ao potencial de disseminação da doença.

Esses fatores supra-citados formam um pool consensual entre a grande maioria dos pesquisadores (Leite; Koifman, 1998; Gonzáles-Moles et al., 2002; Vicente et al., 2002; Ferlito et al., 2003; Genden et al., 2003; Greenberg et al., 2003; Guerra et al., 2003; O-Charoeniat et al., 2003; Ribeiro et al., 2003; Noolgar et al., 2003; Woolgar et al., 2003; Bettenford et al., 2004; Takes, 2004) e foram compilados na excelente revisão de Massano et al. (2006).

O sistema preconizado pela *International Agency for Research in Cancer (IARC)* da França (Chi et al., 2015), para avaliação de estadiamento é o TNM/FIGO, que classifica a lesão pelo tamanho do tumor primário, acometimento de linfonodos cervicais e presença/ ausência de metástase à distância, como pode ser verificado no quadro 2.1.

A Figura 2.2 A à D esquematiza a invasão do CEMO em suas várias etapas:

1

Figura 2.2 A: Representação esquemática de displasia da mucosa oral

Figura 2.2 B: representação esquemática de carcinoma in situ da mucosa oral, com presença de mitoses na camada basal

3

Figura 2.2 C: Representação esquemática do carcinoma epidermóide superficialmente invasivo

Figura 2.2 D: Representação esquemática do carcinoma epidermóide invasivo da mucosa oral.

Classificação TNM/ FIGO da IARC, para carcinomas da cavidade oral	
T — Tumor primário	
TNM	FIGO
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Ausência de evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com até ou com 2 cm de dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e menos de 4 cm, ou com 4 cm
T3	Tumor com mais de 4 cm de dimensão
T4a (lábio)	Invasão do tumor em cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho de boca, ou pele (chin or nose)
T4a (cavidade oral)	Invasão do tumor em cortical óssea, nos músculos extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso, e estiloglosso), seio maxilar, ou pele da face
T4b (lábio e cavidade oral)	Invasão do tumor na região mastigatória, lâmina pterigoidea e base de crânio; ou em casos que envolva a artéria carótida interna
N – Linfonodos cervicais	
NX	Os linfonodos cervicais não puderam ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos cervicais
N1	Metástase em um único linfonodo ipsilateral (mediastinal), com até 3cm de dimensão.
N2	Metástases são divididas em N2a, 2b e 2c, como abaixo
N2a	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, com mais de 3cm e menos de 6cm de diâmetro
N2b	Metástase em vários linfonodos ipsilaterais, desde que nenhum com mais de 6 cm de dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, desde que nenhum com mais de 6 cm de dimensão.
N3	Metástase em linfonodo com 6 cm ou mais de dimensão
M – Metástase à distância	
MX	A existência de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: American Joint Committee of Cancer – Cancer Staging Manual 7th edition.

Quadro 2.1 – Classificação TNM/FIGO da IARC, para carcinomas da cavidade oral

Em particular, a extensão óssea do CEMO o classifica no estágio T4a, o que é considerado um fator importante de mau-prognóstico (Jimi et al., 2011). Pacientes com evidência clínica e imaginológica de invasão óssea devem ser tratados cirurgicamente, com ressecção da área acometida(geralmente a mandíbula) (Jimi et al., 2011).

Biologicamente há controvérsia sobre a patogenia da destruição óssea durante a invasão tumoral mas esta aparentemente é mediada por osteoclastos, ao invés de invasão direta pelas células neoplásicas (Guise; Mundy, 1998; Jimi et al., 2011).

2.3 Patogenia

Do ponto de vista da Patologia Geral, as neoplasias malignas são caracterizadas pela autossuficiência nas respostas a sinais proliferativos, perda da responsividade a sinais de inibição do crescimento, evasão da morte celular programada (apoptose), potencial ilimitado de proliferação, angiogênese sustentável, invasão e metástase. Para isso, as células neoplásicas passam por alterações genéticas e epigenéticas. Essas alterações podem ocorrer como consequência de instabilidades genômicas a partir de rearranjos cromossômicos, amplificações, deleções, metilações e mutações, sendo que várias dessas alterações originam células neoplásicas com heterogeneidade molecular, protéica e fenotípica. O CEMO é uma doença multifatorial que envolve uma gama de eventos genéticos que leva à inativação de genes supressores de tumores ou ativação de proto-oncogenes, ou ambos (Argiris et al., 2008). Fatores do estroma e do sistema imunológico também contribuem para a carcinogênese e resistência ao tratamento. A angiogênese também é fundamental para a evolução dos tumores e para o seu crescimento secundário (metástases) e fatores angiogênicos e antiangiogênicos têm uma participação importante na patogenia da doença. Alguns marcadores biológicos do CEMO estão listados no quadro 2.2.

Exemplos de marcadores biológicos associados ao CEMO	
Aneuploidia	<p><u>Marcador da instabilidade cromossômica e alterações do conteúdo do DNA</u></p> <p>Presente em 20 a 45%% dos casos</p> <p>Pouca evidência do seu uso na predição da progressão tumoral</p>
Mirna	<p><u>Sequências não-codificantes de RNA com 20 a 22 nucleotídeos que podem atuar como supressores de tumores ou oncogenes, já que podem ativar ou silenciar a expressão genética</u></p> <p>Valor como marcador preditivo da evolução tumoral ainda indeterminado</p>
Desequilíbrio alélico	<p><u>Indicam ganhos ou perdas de alelos</u> (ex. perda da heteroziguidade)</p> <p>Seu valor como marcador da progressão tumoral ainda encontra-se em investigação</p>
Hipermetilação	<p>Aberrações da metilação do DNA contribuem para a tumorigênese</p>
Marcadores de proliferação	<p>Aumento da expressão de marcadores da proliferação celular se correlaciona com a progressão tumoral</p>
Regulação da telomerase	<p>Facilita a imortalização das células neoplásicas, mas seu valor como marcador preditivo ainda é indeterminado</p>
Genes supressores de tumores	<p>A descrição da perda de genes supressores de tumores como o p53, p63, p74, p21 e p16 tem sido associados com a carcinogênese</p>
Receptores de tirosina quinase	<p>Alterações nas cascatas de sinalização têm sido descritas, especialmente na via do fator de crescimento epidérmico (EGF/EGFR)</p>

Fonte: Huber e Tantiwogkosi, 2014.

Quadro 2.2 – Exemplos de marcadores associados ao CEMO

2.4 Características histopatológicas

A principal característica biológica de uma neoplasia maligna é a capacidade de suas células invadirem e sobreviverem em locais ectópicos. Essa característica é avaliada, de forma geral, na análise histopatológica dos tumores.

Os aspectos histopatológicos de uma neoplasia continuam sendo o principal parâmetro para a realização do seu diagnóstico, embora os avanços da biologia molecular sejam muito importantes para a compreensão de sua biologia.

O carcinoma epidermóide da mucosa oral é tradicionalmente classificado, do ponto de vista histopatológico, de acordo com o seu estado de diferenciação e semelhança com o epitélio normal da mucosa Figura 2.2. Dessa forma, a Classificação Internacional dos tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS) considera os CEMOs como bem diferenciados, moderadamente diferenciados, pouco diferenciados e indiferenciados, baseados no grau de semelhança com o epitélio da mucosa oral (Pindborg et al., 1997; Rivera, 2015).

Figura 2.3 - Estrutura normal do epitélio da mucosa oral

Essa classificação é derivada do sistema de gradação que foi originalmente proposto por Broder é baseado na quantidade de produção de queratina e no pleomorfismo celular, Entretanto, devido a relativa heretogeneidade morfológica observada nos tumores, esse sistema não se relaciona com o prognóstico da doença (Broder, 1925; El-Mofty, 2014).

Outros autores sugerem que informações advindas da avaliação das frentes de invasão e das estruturas invadidas são mais úteis (Figura 2.3) (Chi et al., 2015). Assim, cinco características histológicas são classicamente analisadas: o grau de queratinização, o pleomorfismo nuclear, o número de mitoses por campo de grande aumento, padrão de invasão e a reação inflamatória peritumoral (Bryne et al., 1989; Bryne et al., 1992; Chi et al., 2015).

Figura 2.4 - Representação esquemática do carcinoma epidermóide da mucosa oral com invasão óssea

2.5 A invasão óssea

A invasão indica a penetração em tecidos vizinhos e sua completa ocupação. Esse mecanismo permite as células neoplásicas destruírem os tecidos adjacentes e entrarem na circulação para atingirem órgãos distantes formando tumores secundários, as metástases (Mareel; Leroy, 2003). São escassos os estudos relacionados à taxas de incidência de invasão óssea pelo CEMO, apesar de estudos como o de Wang e colaboradores mostrarem uma maior taxa de recidiva e menor tempo de sobrevida em casos mais avançados (Wang et al., 2013)

Estudos mostram que após a invasão óssea, o CEMO progride através das lamelas ósseas em padrão erosivo, infiltrativo e misto. O padrão erosivo é caracterizado por uma frente de invasão grande, com interface bem determinada

com a estrutura óssea, geralmente mandibular, além de reabsorção osteoclástica e fibrose. O padrão infiltrativo é caracterizado por ninhos e projeções de células tumorais que penetram o sistema harvesiano. Casos que mostram os dois padrões são considerados mistos (Slootweg; Muller, 1989; Totsuka et al., 1991; Jimi et al., 2011). (Figura 2.4)

A infiltração óssea, principalmente mandibular, parece correlacionar-se com o comportamento clínico do tumor. Esses casos são mais propensos a apresentarem recorrências primárias, regionais e distantes. Ainda, em casos com infiltração óssea, a média de sobrevida livre de doença é de apenas 30% dos casos. Casos com padrão erosivo de invasão óssea têm sobrevida livre de doença em 3 anos de até 70%. Esses casos, são usualmente tratados com mandibulotomia marginal (Wong et al., 2000).

Figura 2.5 - Representação esquemática da invasão óssea

2.6 Características moleculares da invasão óssea

Pouco ainda se sabe sobre a capacidade de reabsorção óssea pelas células do CEMO e envolvimento dos osteoclastos no processo. Os osteoclastos sofrem um processo de diferenciação na superfície óssea e dissolvem o componente da matriz mineralizada por mecanismos que envolvem a secreção de componentes ácidos. Aparentemente, cascatas de sinalização desencadeadas pelos queratinócitos neoplásicos afetam a função osteoclástica, incluindo a indução de produção de proteases, citocinas e fatores de crescimento.

Assim, a invasão óssea é considerada como um processo finamente controlado espacial e temporalmente, e pode ser subdividido em 3 fases: fase inicial, fase de reabsorção e fase final. Várias moléculas orquestram esse processo. Na fase inicial, quando os osteoclastos ainda não estão ainda plenamente recrutados, proteases auxiliam na degradação da matriz extracelular para facilitar a migração dos queratinócitos neoplásicos em direção ao osso. Na fase de reabsorção, quando os osteoclastos assumem o papel de reabsorver a matriz calcificada, citocinas geradas pelas células tumorais induzem direta e indiretamente a diferenciação osteoclástica. Na fase final, a reabsorção mediada pelos osteoclastos facilita a secreção de fatores de crescimento para promover a proliferação das células neoplásicas, em um mecanismo de círculo vicioso.

Um vasto número de marcadores protéicos/moleculares tem sido correlacionado com o prognóstico do CEMO, destacando-se fatores de crescimento, expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular (p-53, p-16, ciclinas, p-21, p-27, etc). Mais recentemente, ainda, tem se tentado pesquisar possíveis marcadores moleculares que se relacionem ao tumor e assim, diversas alterações foram encontradas, mais frequentemente nos cromossomos 3, 9, 11, 17 e 19 (Massano et al., 2006).

Além de todos esses fatores, moléculas de adesão que estabelecem a integridade dos tecidos também vêm sendo investigadas, principalmente no que se relaciona com seu envolvimento com vias de sinalização intra-celulares. Neste

sentido, as moléculas mais pesquisadas com relação ao carcinoma epidermóide da cavidade oral são as caderinas e moléculas associadas (Thomas; Speight, 2001).

Essa grande diversidade de marcadores e a intensa busca por fatores que possam prever o curso da doença revela a grande diversidade que se observa entre os doentes e os tumores que os acometem e a complexidade molecular desta doença. A diversidade e complexidade revelam ainda que há muito a ser investigado no que tange a relação desses diversos fatores e a inter-relação entre as células tumorais, assim como entre as células e seu micro-ambiente.

2.7 Transição epitélio-mesenquimal

Durante as últimas décadas avanços importantes no entendimento da relação entre as células e o microambiente vêm sendo aplicados ao conhecimento dos aspectos biológicos das células tumorais. Um dos fenômenos mais interessantes recentemente descritos é a transição epitélio-mesenquimal (TEM).

A transição epitélio-mesenquimal é conceituada como um processo biológico complexo e reversível pelo qual uma célula epitelial modifica sua polaridade e propriedades adesivas para um fenótipo de célula mesenquimal, com alterações no citoesqueleto, resistência à apoptose e ganho na capacidade de migração e invasão.

O fenômeno de TEM contribui para uma gama de eventos durante o desenvolvimento embrionário, sendo essencial para a correta morfogênese e organogênese. Os mecanismos de controle da execução da TEM são intrinsecamente envolvidos com as cascatas de controle da diferenciação e morte celular.

A pesquisadora Elizabeth Hay foi pioneira na pesquisa do fenômeno de TEM. Em 1967 Trelstad, Hay e Revel, no Departamento de Anatomia da Faculdade de Medicina de Harvard, descreveram rudimentarmente o processo, estudando o contato celular na morfogênese de embriões de galinha, por meio da microscopia eletrônica. Mais tarde, em 1986, Greenburg e Hay descreveram o processo de diferenciação e mudança fenotípica *in vitro*, do epitélio ocular em células do tipo mesenquimal. Quase uma década depois, Hay e Zuk, 1995 publicaram a excelente revisão sobre o processo de TEM em processos fisiológicos, patológicos e induzidos experimentalmente. A partir daí, o processo de TEM foi implicado em diversas situações patológicas, incluindo as neoplasias, onde contribui para os processos de invasão e metástase.

Basicamente, durante a TEM, as células epiteliais perdem as estruturas de adesão intercelular, incluindo as junções aderentes edesmosomos, modulam a sua polaridade e reorganizam o citoesqueleto, para poderem, de forma temporária, romper a membrana basal, penetrar e se locomover no tecido conjuntivo, em um processo denominado delaminação. Durante essa fase, as células passam a expressar marcadores mesenquimais e adquirem um fenótipo mesenquimal que favorece a locomoção e a sobrevivência no micro-ambiente do tecido conjuntivo (Xue ET al., 2012). As células neoplásicas dos carcinomas parecem ter-se apropriado desse complexo mecanismo, descrito na embriogênese, para promoverem a invasão de tecidos e a disseminação tumoral distante (Kalluri; Weinberg, 2009). Assim, esses últimos autores denominaram o processo em neoplasias como TEM tipo 3; outros autores o denominam TEM-símile (Savagner, 2010).

In vivo, a TEM promove células pouco diferenciadas e com potencial pluripotente, ao invés de fibroblastos; essas células de fenótipo intermediário, têm proteínas citoesqueléticas do tipo células basais (citoqueratinas 5 e 14), o que lhes confere uma maior plasticidade (Savagner, 2010). A Figura 2.6 ilustra esse processo.

Figura 2.6: Ilustração esquemática do processo de TEM, com migração das células neoplásicas em direção ao vaso sanguíneo.

Muitas cascatas genéticas estão implicadas na indução da TEM em células neoplásicas. Essas cascatas são comuns a outros processos como o de proliferação celular, apoptose e diferenciação durante os estágios iniciais da embriogênese, morfogênese e cicatrização, entretanto, na progressão tumoral, sua relação com a TEM ainda é pouco elucidada (Savagner, 2010).

Cinco cascatas principais são associadas com o mecanismo TEM: receptores tirosina quinase (fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento insulina-símile), integrinas, Wnt, NF-kappa beta e a via do TGF-beta (Savagner, 2010).

A diminuição transcricional de componentes juncionais acompanha o fenômeno de TEM, principalmente a diminuição da E-caderina. Ainda, fatores de transcrição específicos, em particular o Snail, o Slug e o Twist (quadro 2.3), irão regular negativamente a E-caderina, causando a diminuição de sua expressão (Savagner, 2010).

Mais recentemente, outras vias com potencial de indução da TEM foram reveladas, principalmente na tumorigênese. Essas vias incluem o ajuste da sobrevivência celular a microambientes pobremente nutridos e hipóxicos, associados ao hipermetabolismo, glicólise, resistência a acidose toxicidade e neoangiogênese (Savagner, 2010).

FATORES DE TRANSCRIÇÃO	
Snail 1 e Snail 2	Ligam-se ao promotor E-box da E-caderina, reprimindo sua transcrição
Zeb 1 e Zeb 2	Ligam-se as terminações bipartite de E-box na região promotora da E-caderina
Twist	Reprime a expressão da E-caderina e p16INK4 por meio da remodelação de cromatina; liga-se ao E-box do PDGF-alfa , que regula a degradação da matriz extracelular, facilitando a metástase

Fonte: Thierry JP, et al, 2009.

Quadro 2.3 - Principais fatores de transcrição envolvidos no processo TEM

2.8 Moléculas de adesão e as caderinas

A adesão celular é crucial para o agrupamento de células em estruturas tridimensionais que formam os tecidos animais, estabelecendo relações entre as células e o seu meio ambiente, juntamente com suas conexões internas com o citoesqueleto, determinando assim, a arquitetura dos diversos tecidos (Gumbiner, 1996).

Fenômenos biológicos e fisiológicos vitais tais como a embriogênese, proliferação, diferenciação e morte celular são orquestrados por um complexo sistema de moléculas e receptores de adesão.

Essas moléculas e receptores são importantes para a manutenção da integridade da pele, desde os estágios mais precoces do período embrionário, onde desmosomos são detectados (5 a 6 semanas de vida gestacional) (Hentula et al., 2001). Essas moléculas estão também envolvidas na definição da estrutura e arquitetura da pele e mucosas, no controle da polarização celular e em uma cascata complexa de sinalização de controle dos níveis de maturação celular (Hotchin et al., 1995; Marchisio et al., 1997)

Essas junções são localizadas em pontos de contato intercelular e entre as células e a membrana basal/matriz extracelular.

A adesão entre as células que compõem o epitélio cutâneo e mucoso são essenciais na manutenção, formação e preservação da arquitetura da pele e de sua função.

As células de origem epitelial que formam as estruturas componentes da pele são interconectadas por três tipos principais de estruturas juncionais: as junções de ancoragem que incluem os desmosomos e hemidesmosomos, as junções aderentes e os contatos focais, as junções “tight” e as junções “gap”. Essas estruturas estão envolvidas direta ou indiretamente na coesão, comunicação e transdução de sinais entre as células desse complexo (Cozzani et al., 2001).

As junções de ancoragem estão envolvidas primariamente com a adesão celular. Elas podem ser divididas segundo a morfologia, expressão de componentes transmembrânicos e de acordo com a associação com os filamentos do citoesqueleto. Desmosomos e hemidesmosomos conectam-se aos filamentos de citoqueratinas enquanto que as junções aderentes e os contatos focais estão ligadas aos microfilamentos de actina.

As caderinas e as integrinas são moléculas que, juntamente com outras, participam da estrutura das junções de ancoragem.

As caderinas são moléculas de adesão que participam de forma crítica do desenvolvimento embrionário de vários tecidos, incluindo a pele.

A superfamília das caderinas é composta por pelo menos 80 moléculas, incluindo as caderinas clássicas, desmogleínas e desmocolinas, entre outras. Essas moléculas estão envolvidas na adesão intercelular de forma homotípica. Todos os membros dessa família são moléculas transmembrânicas dependentes de Ca^{2+} no seu sítio de ligação. O Ca^{2+} é crítico para a função da molécula, servindo também para a manutenção estrutural da caderina. Sua cauda citoplasmática é altamente conservada e serve de elo com o citoesqueleto através de ligações específicas com as moléculas α e β catenina (Hynes, 1999; Yagi; Takeichi, 2000).

As caderinas mais relevantes presentes no epitélio cutâneo e mucoso são:

- Caderinas clássicas que compreendem as caderinas E, P e N, entre outras
- Caderinas desmosômicas, que fazem parte da estrutura dos desmosomos – desmocolinas e desmogleínas.

A E-caderina, particularmente, é um dos principais elos na adesão de células epiteliais (Takeichi, 1991). Trata-se de uma glicoproteína transmembrânica de 120 kD, presente em todo o epitélio e que possui seu gene mapeado no cromossomo 16q.22.2 (Takeichi, 1991). Essa caderina está localizada

principalmente nas zônulas de aderência juncional, sendo responsável por uma firme adesão célula-célula (El-Bahrawy; Pignatelli, 1998). Figuras 2.5 e 2.6.

Figura 2.7- representação esquemática da molécula de E-caderina

Figura 2.8- Detalhes sobre a molécula de E-caderina

A expressão contínua da E-caderina é fundamental para a manutenção do tecido epitelial. Para exercer suas funções, a E-caderina depende da formação de complexos citoplasmáticos que por sua vez participam da transdução de sinais que regulam o fenótipo celular desde o desenvolvimento (Gumbiner, 1996).

A participação das caderinas vem também sendo estudada em diversas doenças: nas neoplasias de origem epitelial, sua expressão é diminuída ou ausente, estando relacionada à perda da arquitetura tecidual normal e a fenótipos carcinogênicos.

Ainda, a E-caderina, tem participação fundamental no processo de TEM. Em 1998, Perl et al. consideraram que a perda da expressão da E-caderina seria um evento fundamental na progressão do carcinoma invasivo. Mais recentemente, sua participação no processo TEM e na progressão das neoplasias malignas ganhou novos componentes, com a elucidação de fatores reguladores (indutores e repressores) que também são elementos fundamentais na TEM (Thiery et al., 2009).

Nos tumores, os repressores da E-caderina (Snail, Zeb, E47 e KLF8 reprimem a atividade do promotor da E-caderina, enquanto Twist, Goosecoid, E2.2 e FoxC2 reprimem sua transcrição indiretamente) são considerados como indutores do processo TEM, regulando a expressão de uma variedade de genes que reprimem o fenótipo epitelial e promovem o mesenquimal, favorecendo a invasão. Ainda, esses fatores alteram a polaridade celular, diminuem a capacidade de proliferação e facilitam a sobrevivência das células neoplásicas. A atenuação da proliferação celular favorece o processo de invasão e a resistência a estímulos apoptóticos conferem vantagem seletiva de sobrevivência às células tumorais (Thiery et al., 2009; Peinado et al., 2007; Wang et al., 2007; Yang; Weinberg, 2008; Sobrado et al., 2009).

O CEMO em estágio avançado, T4, tem, na maioria das vezes, invasão óssea. Esse tipo de invasão gera maiores morbidades e dificuldades no tratamento cirúrgico e adjuvante. O papel das moléculas de adesão e do processo de TEM na invasão óssea nesses casos ainda é pouco elucidado. Nosso trabalho, por meio do estudo histopatológico e imunoistoquímico do CEMO T4a visa responder a seguinte questão:

Na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral há alterações na expressão da E-caderina que sugiram o envolvimento do fenômeno de TEM no processo?

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Baseando nosso estudo nas evidências publicadas na literatura científica em língua inglesa pretendemos avaliar e correlacionar a expressão da E-caderina na frente de invasão óssea CEMO.

3.2 Objetivos específicos

1. determinar o perfil de expressão de E-caderina nos casos estudados
2. relacionar os dados obtidos com o tipo histológico do tumor

4 CASUÍSTICA-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos casos

Para esse estudo foram selecionados casos de carcinoma epidermóide provenientes das listas de atendimento do Ambulatório de Estomatologia do Hospital Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram selecionados casos de carcinoma epidermóide da mucosa oral com documentação histopatológica de invasão óssea.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da casuística todos os casos que não possuíam material para análise laboratorial (blocos de parafina).

4.2 Ética

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sob o número de inscrição 015113/2015 (anexo A) e título “Carcinoma Epidermóide da Cavidade Oral: Aspectos da Invasão Óssea”. Foi também aprovado pela instituição HCFMUSP, para fins de coleta de prontuários, lâminas e blocos dos casos selecionados.

4.3 Coleta de Dados, Lâminas e Blocos de Parafina

Foram requisitadas ao serviço do hospital as lâminas coradas em hematoxilina e eosina, dos respectivos casos, para classificação de estruturas e seleção de dos espécimes para a etapa imunoistoquímica do processo.

Após confirmação histopatológica da invasão óssea, foram solicitados os prontuários dos casos selecionados para análise clínico demográfica dos pacientes, bem como seus blocos parafinados, de intervenções cirúrgicas respectivas as áreas selecionadas.

Foram selecionados 15 casos com diagnóstico de carcinoma epidermóide da mucosa oral, com evidência histopatológica de invasão óssea e classificados como T4a (fluxograma abaixo).

4.4 Imunoistoquímica

Os cortes de 3µm foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os cortes foram re-hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 85%, respectivamente) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos.

Após a lavagem em água corrente e água destilada, incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% com o intuito de se bloquear a peroxidase endógena tecidual foi realizada.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, os cortes foram imersos duas vezes em solução de TRIS pH 7,4, por dois minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de 1% BSA (Sigma), 5% SFB (Cultilab) em TRIS, pH 7,4, por 60 minutos, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais.

Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário E-caderina, clone EP700Y (Cell Marque, Rocklin, CA95677, USA) diluído em solução de 1% BSA (Sigma) em TRIS pH 7,4 em título 1:400. Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS pH 7,4, durante 5 minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com o reagente En Vision (Dako Cytomation).

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador 3'3'- diaminobenzidina que evidencia a reação por meio de coloração castanha.

Os cortes foram então lavados em água corrente e água destilada e contracolorados com hematoxilina de Mayer por 10 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol, e montados em resina *Permount* para o exame ao microscópio de luz.

Controles negativos das reações supracitadas foram realizados através da incubação de espécimes com soro não-imune substituindo o anticorpo primário.

Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

As reações foram analisadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa.

Os dados foram fotografados com equipamento fotográfico digital.

Os dados obtidos após a análise foram correlacionados aos dados clínico-evolutivos dos doentes.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos clínico-demográficos

A maioria dos pacientes eram homens (10 casos) (gráfico 5.1); as idades ao diagnóstico variaram de 43 a 86 anos com media de 56,46 anos.

Gráfico 5.1: Distribuição dos casos estudados por sexo

A cor da pele foi determinada de acordo com a informação fornecida pelo paciente. Tratavam-se de 9 pacientes brancos, 4 pardos e 1 negro (gráfico 5.2). Cinco pacientes apresentaram metástases em linfonodos regionais.

Gráfico 5.2 - Distribuição dos casos estudados de acordo com a cor da pele declarada nos prontuários analisados

Detalhes sobre os dados clínico-demográficos e histopatológicos estão listados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - dados clínico demográficos sobre os casos incluídos no estudo

	Sexo	Idade	Cor da pele*	Localização	Etilista	Tabagista	Metástase em Linfonodos Regionais	Invasão óssea	Sobrevida em 5 anos
1	F	70	Pardo	Palato duro e cavidade nasal	Não	Não	Ausente	Maxila	Vivo com doença
2	M	79	Branco	Soalho e mento	NI	NI	Ausente	Mandíbula	Óbito
3	M	68	Branco	Lábio Inferior	Não	Sim	Ausente	Mandíbula	Vivo com doença
4	F	80	Branco	Zigo-naso-orbital	Não	Não	Ausente	Maxila	Vivo com doença
5	F	54	Pardo	Soalho de boca e mento	NI	NI	Presente	Mandíbula	Óbito
6	M	80	Pardo	Cavidade Nasal e palato duro	NI	NI	NI	Maxila	Vivo com doença
7	F	47	Branco	Soalho e mento	NI	NI	Ausência	Mandíbula	Óbito
8	M	53	Pardo	Toda a base da língua até orofaringe e mucosa jugal	NI	NI	Presente	Mandíbula	Óbito
9	M	49	Negro	Trígono retromolar	NI	NI	Presente	Mandíbula	Óbito
10	M	43	Branco	Soalho	Não	Sim	Ausência	Mandíbula	Vivo com doença
11	M	58	Branco	Maxila bilateral	Sim	Sim	Ausência	Maxila	Vivo com doença
12	M	53	Pardo	Soalho / mento/ porção anterior da língua	NI	NI	Ausência	Mandíbula	Óbito
13	M	57	Branco	Soalho	Sim	Sim	Ausência	Mandíbula	Vivo com doença
14	M	86	Branco	Soalho	Não	Não	Presente	Mandíbula	Vivo com doença
15	M	50	Branco	Trigono retromolar até maxila	Não	Não	Presente	Mandíbula e maxila	Vivo com doença

Legenda:
NI: Não informado.

5.2 Aspectos patológicos

Quanto aos aspectos patológicos das neoplasias, os tumores variaram entre 4cm e 12cm em seu maior eixo. 10 casos apresentaram evidência macroscópica de invasão óssea mandibular, 4 na maxila e apenas 1 caso exibiu invasão na mandíbula e na maxila. Histologicamente os tumores foram classificados de acordo com Broder (1925).

Os aspectos histopatológicos dos tumores dos 15 pacientes estudados variaram entre os tipos carcinoma epidermóide bem diferenciado, carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado e carcinoma epidermóide pouco diferenciado.

Todos os tumores apresentavam características de invasão franca no tecido conjuntivo, estendendo-se por toda a lâmina própria, submucosa e tábua óssea. Observou-se invasão de estruturas anatômicas como glândulas salivares e regiões perivascular e perineural.

As células neoplásicas variaram em seu padrão de diferenciação, mas apresentavam, em geral, perda da polaridade, pleomorfismo celular e núcleos hipercromáticos e aberrantes. Mitoses atípicas foram notadas na massa tumoral.

Nas neoplasias bem diferenciadas, diagnosticadas em 8 pacientes predominou o aspecto de formação de pérolas córneas no centro das ilhas tumorais; nas neoplasias moderadamente diferenciadas (4pacientes), células neoplásicas de diferenciação intermediária, com presença de poucas pérolas córneas foram detectadas, e, finalmente, nos carcinomas epidermóides pouco diferenciados (3 pacientes), notou-se células neoplásicas de diferenciação pobre e presença abundante de comedo necrose (figura 5.1).

Independente do padrão histopatológico de diferenciação tumoral, 6 casos apresentaram padrão erosivo de invasão óssea e 9 casos exibiram padrão infiltrativo. Gráficos 5.3, 5.4 e 5.5.

Os aspectos histopatológicos observados nos casos estudados estão ilustrados na Figura 5.1.

Gráfico 5.3- Distribuição dos casos estudados de acordo com a classificação da diferenciação tumoral (Broder, 1925)

Gráfico 5.4- Distribuição dos casos estudados de acordo com o perfil de invasão óssea

Gráfico 5.5 - Perfil de invasão óssea de acordo com a diferenciação tumoral

Figura 5.1 - Exemplos dos aspectos histopatológicos de carcinoma epidermóide da mucosa oral com invasão óssea

A-C: Carcinoma epidermóide com invasão óssea do tipo erosiva. Notar nessas fotomicrografias a juxtaposição da massa neoplásica à tábua óssea com remodelação óssea por meio dos osteoclastos (setas) (aumento original X400). Carcinoma epidermóide da mucosa oral com invasão óssea do tipo infiltrativo. Notar a ilha tumoral circundada por tecido ósseo em D e E (aumentos originais X200 e X400, respectivamente), e o padrão infiltrativo de uma fileira de células neoplásicas na tábua óssea, em F e G. (aumentos originais X200 e X400, respectivamente). Ilha tumoral permeada por hemácias no interior de uma lamela óssea em H (aumento original X400). Necrose do tecido ósseo em decorrência da infiltração tumoral em I (aumento original X400).

5.3 Imunoistoquímica

A presença da E-caderina foi detectada em todos os casos estudados. Nas neoplasias bem diferenciadas e moderadamente diferenciadas notou-se maior positividade para a proteína no centro das ilhas tumorais. A periferia desses blocos neoplásicos apresentou positividade fraca ou foi negativa para a proteína. Nas neoplasias pouco diferenciadas, a positividade para a E-caderina foi fraca em todas as áreas tumorais.

Nas regiões que apresentavam invasão óssea do tipo erosiva, a E-caderina não foi detectada na interface com as lamelas ósseas. Nos casos de franca infiltração óssea, com destruição e substituição da tábua óssea por massa neoplásica, os blocos tumorais foram, em geral, positivos para a E-caderina. Exemplos desses aspectos podem ser observados na Figura 5.2.

Dois casos exibiram um padrão distinto do descrito acima: no caso 8, apesar de seu padrão histopatológico de invasão óssea ser erosivo, a expressão de E-caderina foi detectada adjacente às lamelas ósseas, e, no caso 11, a E-caderina foi negativa no padrão infiltrativo de invasão óssea.

O quadro 5.1 exhibe um sumário dos resultados descritos acima.

Os gráficos 5.6 a 5.8 ilustram a distribuição da expressão da E-caderina de acordo com os parâmetros estudados.

Caso	Tamanho do tumor	Grau Histológico	Tipo de invasão óssea	E-caderina	Sobrevida em 5 anos
1	NI	Pouco diferenciado	Infiltrativa	+	Vivo com doença
2	7 cm	Bem diferenciado	Erosivo	-	Óbito
3	9,7 cm	Bem diferenciado	Infiltrativa	+	Vivo com doença
4	11 cm	Bem diferenciado	Erosiva	-	Vivo com doença
5	11 cm	Bem diferenciado	Erosiva	-	Óbito
6	7 cm	Bem diferenciado	Erosiva	-	Vivo com doença
7	9,5 cm	Moderadamente diferenciado	Infiltrativa	+	Óbito
8	3 cm	Bem diferenciado	Erosiva	+	Óbito
9	12 cm	Bem diferenciado	Erosiva	-	Óbito
10	9 cm	Pouco diferenciado	Infiltrativa	+	Vivo com doença
11	8,5 cm	Pouco diferenciado	Infiltrativa	-	Vivo com doença
12	4,5 cm	Bem diferenciado	Erosiva	-	Óbito
13	8 cm	Moderadamente diferenciado	Erosiva	-	Vivo com doença
14	8,5 cm	Moderadamente diferenciado	Infiltrativa	+	Vivo com doença
15	4 cm	Moderadamente diferenciado	Erosiva	-	Vivo com doença

+: positiva; - : negativa

Quadro 5.1- Dimensões tumorais, tipo histológico, tipo de invasão óssea e expressão de E-caderina

Gráfico 5.6 - Distribuição da expressão da E-caderina de acordo com a diferenciação tumoral

Gráfico 5.7 - Expressão da E-caderina em CEMOs de pacientes vivos com doença

Gráfico 5.8 - Expressão da E-caderina em CEMOs de pacientes que foram a óbito

Figura 5.2 - Aspectos da expressão de E-caderina na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral

A: mucosa oral normal, revestida por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado. A expressão da E-caderina contorna a membrana plasmática dos queratinócitos, gerando um padrão arquitetural em “rede de peixe” (aumento original X200). B: infiltração do CEMO no periósteo. Notar a ausência de expressão da E-caderina na interface com o periósteo/ tábua óssea no padrão erosivo de invasão (aumento original X200); B: Padrão erosivo de invasão do CEMO, mostrando drástica diminuição da expressão da E-caderina nas células neoplásicas (aumento original X400). D e E: exemplos da expressão da E-caderina no padrão infiltrativo de invasão óssea do CEMO. Ilhas tumorais circundadas por lamelas ósseas com expressão intensa da E-caderina (aumento original X400).

6 DISCUSSÃO

Os aspectos clínicos, histológicos e imunoistoquímicos observados nos nossos resultados mostram um interessante padrão de expressão da E-caderina em diferentes tipos de invasão óssea. Assim, essa discussão irá se ater a debater as evidências originais sobre a E-caderina na invasão óssea do CEMO e suas interfaces biológicas.

A invasão óssea é um importante parâmetro para a classificação clínica e planejamento do tratamento do carcinoma epidermóide. Em casos avançados, como os estudados neste trabalho, as evidências de invasão óssea são observáveis em exames de imagem pré-operatórios, mas a sua avaliação histopatológica é um padrão importante para a documentação do caso. Em particular, o padrão de invasão óssea, parece ganhar destaque na avaliação da evolução dos casos.

Em 2011, Ebrahimi et al. realizaram um significativo estudo retrospectivo com a avaliação de 498 casos de carcinoma epidermóide da mucosa oral, dos quais 102 apresentavam comprovação histopatológica de invasão óssea. Os autores verificaram uma importante associação da invasão óssea com a dimensão tumoral, invasão perineural e vasculolinfática, além de uma associação com a diferenciação tumoral. Esses parâmetros não puderam ser avaliados estatisticamente em nosso trabalho devido ao pequeno número de casos incluídos no estudo. Entretanto, com no que tange a diferenciação tumoral, a maioria dos nossos casos apresentaram-se bem diferenciados, apesar de terem sido diagnosticados em estágio avançado com invasão óssea, o que parece indicar que a diferenciação tumoral é independente do grau de invasão. Ainda, esses autores discutem que a dimensão tumoral é um fator muito mais importante na determinação do prognóstico do que a invasão da cortical óssea propriamente dita, e, que a relação entre invasão óssea e o prognóstico se define muito mais pelo tamanho do tumor do que pela biologia da invasão do tecido mineralizado. Dessa forma, os autores questionam a real validade clínica da classificação T4 generalizada para tumores com invasão óssea.

O trabalho desses autores supracitados analisa de forma clínico-patológica a invasão óssea, mas não faz alusões às peculiaridades biologia tumoral. Considerando essa lacuna, nosso trabalho adiciona importantes informações com a análise da expressão da E-caderina na invasão óssea pelo CEMO.

Diversos são os pesquisadores que citam a modulação da E-caderina como um importante fator na invasão tumoral. No epitélio normal a E-caderina mostra intensa positividade ao redor dos queratinócitos desde a camada basal. A molécula é componente fundamental dos desmosomos e assim promove a adesão intercelular desde o desenvolvimento embrionário até a formação e manutenção fisiológica do epitélio adulto (Mareel; Leroy, 2003; Lourenço et al., 2008). O desenvolvimento neoplásico envolve, entre outros mecanismos complexos, a perda temporária ou permanente da E-caderina, induzida por mecanismos genéticos e epigenéticos (como mutações ou transcrição insuficiente), redistribuição das moléculas em diferentes localizações na célula e competição de receptores por outras proteínas (Shapiro; Weiss, 2009; Rajwar et al., 2015).

Estudos recentes também mostram a importância das caderinas e de sua participação no fenômeno de TEM na progressão tumoral. Nosso trabalho mostra diferenças na expressão da E-caderina, na dependência do padrão de invasão óssea do CEMO. Van der Pluijm (2011), relata que o padrão invasivo das células neoplásicas é necessário para a invasão e metástase óssea, garantindo aos tumores um padrão osteotrópico. Mais que isso, outros autores mostraram experimentalmente que a indução de TEM facilita a invasão óssea pelas células tumorais. O mecanismo parece funcionar em “*looping*”, onde as células neoplásicas são induzidas a expressarem o fenótipo de TEM, com perda da E-caderina e aumento da mobilidade e capacidade de invasão. Essa habilidade leva as células neoplásicas a planos invasivos profundos e invasão/erosão óssea inicial. A erosão óssea, com a participação de periostina e metaloproteinases que degradam a matriz extracelular, liberando outros fatores que mantém o fenótipo TEM, como TGF beta, PDGF, VEGF, entre outros, induzindo a expressão dos fatores de transcrição Slug, Snail e Twist (Quan et al., 2012; Morra; Moch, 2011; Jimi et al., 2011). Esse “*looping*” mantém o padrão osteotrópico da neoplasia, favorecendo o estabelecimento da invasão óssea, com intensa destruição cortical

e eventuais metástases ósseas. Nossos resultados, mostraram a perda da E-caderina na erosão inicial do tecido ósseo durante a invasão do carcinoma epidermóide. Esse dado parece corroborar a ideia de que a erosão inicial faz com que haja a liberação desses fatores que induzem a TEM. Autores relatam que a periostina parece ser um fator desencadeador da TEM, levando à supressão da E-caderina (Morra; Moch, 2011). Yan et al. (2006), demonstraram essa relação de forma experimental induzindo a expressão de periostina em células não-metastáticas que passaram a expressar marcadores do fenótipo TEM, com perda da expressão da E-caderina; essas células transfectadas, *in vivo*, causaram metástase e invasão óssea. A co-expressão da periostina com outros marcadores da TEM ainda já foi demonstrada em neoplasias de vários órgãos e regiões como próstata, mama, cabeça e pescoço, oral e ovariano (Morra; Moch, 2011). Não foi escopo do nosso trabalho avaliar a periostina. Inversamente a esse fenômeno, os casos de invasão franca do osso, com penetração da cortical, as células neoplásicas mostraram-se positivas para a E-caderina, revelando que, talvez, a perda da E-caderina seja um fenômeno fugaz e que a re-expressão da molécula possa ser importante para outras funções das células neoplásicas. Esse mecanismo, em hipótese, está ilustrado na figura 6.1.

Figura 6.1 - Ilustração da hipótese de perda e ganho de expressão da E-caderina no CEMO, de acordo com as fases da invasão óssea

A E-caderina é utilizada com muita frequência como ferramenta diagnóstica em patologia. Sua expressão é avaliada para se diferenciar neoplasias com histologia similar, mas de distintas origens. Diversos estudos imunoistoquímicos têm confirmado que neoplasias com morfologia epitelial preservada, classificadas como bem diferenciadas, têm alta expressão de E-caderina, enquanto as frentes tumorais e neoplasias pouco diferenciadas mostram importantes perdas do marcador. Isso também acontece no carcinoma epidermóide da mucosa oral, como demonstramos nos casos 1, 10 e 11, que tiveram pouca expressão de E-caderina. Mais que isso, a E-caderina é considerada como um marcador do fenótipo de TEM, e sua ausência no início da invasão óssea denota as importantes modificações que levam as células neoplásicas a mostrar um padrão agressivo que favorece a invasão e a metástase.

Dessa forma, o presente estudo suplementa informações da literatura a respeito da TEM e a expressão da E-caderinas na invasão óssea do CEMO, sugerindo que essa proteína como potencial alvo de estudos para se confirmar seu valor prognóstico na avaliação dos casos e eventual alvo terapêutico futuro. A avaliação de um maior número de casos, assim, torna-se imperativa, embora as adversidades inerentes aos trabalhos com material de arquivo, como a

dificuldade em encontrar o material bem preservado e a falta de informações nos prontuários atrasem o processo ativo da pesquisa.

7 CONCLUSÃO

- A expressão de E-caderina foi detectada em padrões distintos na invasão óssea do carcinoma epidermóide da mucosa oral, sendo positiva nos casos de invasão óssea infiltrativa e negativa nos casos de erosão superficial da tábua óssea.

- Nos casos de CEMO bem diferenciado predominou o tipo erosivo de invasão óssea, com menor expressão de E-caderina.

REFERÊNCIAS

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008 May 17;371(9625):1695-709. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60728-X

Bettendorf O, Piffkò J, Bãnkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? *Oral Oncol*. 2004 Feb;40(2):110-9. Review.

Broder AC. The grading of carcinoma. *Minn Med*. 1925;8:726.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 1992 Apr;166(4):375-81.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1989 Sep;18(8):432-437.

Chi AC, Day RA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma – an update. *CA Cancer J Clin*. 2015 Sep-oct;65(5):401-21. doi: 10.3322/caac.21293

Cozzani E, Cacciapuoti M, Parodi A. Adhesion molecules in keratinocyte. *Clin Dermatol*, 2001 Sep-Oct;19(5):544-50. Review.

Durazzo MD, de Araujo CE, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F, Bianchi C, Tavares MR, de Brito e Silva Filho G, Ferraz AR. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. *Clinics (São Paulo)*. 2005 Aug;60(4):293-8.

Ebrahimi A, Murali R, Beng KG, Elliot M, Clark J. The prognostic and staging implications of bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2011 Oct;117(9):4460-7. doi: 10.1002/cncr.26032.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz CC, Greene FL, Trotti A, editors. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer; 2010.

El-Bahrawy MA, Pignatelli M. E-cadherin and catenins: molecules with versatile roles in normal and neoplastic epithelial cell biology. *Microsc Res Tech*. 1998; 1; 43(3): 224-232.

El-Mofty SK. Histopathologic risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma variants: an update with special reference to HPV-related carcinomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014 Jul 1;19(4):e377-85

Ferlito A, Rinaldo A, Robbins KT, Leemans CR, Shah JP, Shaha AR, et al. Changing concepts in the surgical management of the cervical node metastasis. *Oral Oncol*. 2003 Jul;39(5):429-35.

Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol*. 2003 Apr;39(3):207-12.

Girod A, Mossero V, Jouffroy T, Point D, Rodriguez J. Women and squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: is there something new? *J Oral Maxillofac Surg*. 2009;67(9):1914-20. doi: 10.1016/j.joms.2009.04.031

González-Moles MA, Esteban F, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, González-Moles S. Importance of tumor thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol*. 2002;38:394-7. Greenburg G, Hay ED. Cytodifferentiation and tissue phenotype change during transformation of embryonic lens epithelium to mesenchyme-like cells in vitro. *Dev Biol*. 1986 Jun;115(2):363-79.

Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. Disparities in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implications for therapeutic decision making. *Cancer*. 2003 Aug;98(3):508-15.

Guisse TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev*. 1998 Feb;19(1):18-54.

Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 1996 Feb;84(3):345-57. Review.

Hay ED, Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis*. 1995 Oct;26(4):678-90.

Hentula M, Peltonen J, Peltonen S. Expression profiles of cell-cell and cell-matrix junction proteins in developing human epidermis. *Arch Dermatol Res*. 2001 May; 293(5):259-67.

Hotchin NA, Gandarillas A, Watt FM. Regulation of cell surface beta 1 integrin levels during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol*. 1995 Mar;128(6):1209-19.

Huber MA, Tantiwongkosi B. Oral and oropharyngeal cancer. *Med Clin N Am*. 2014 Nov; 98(6):1299-321. doi : 10.1016/j.mcna.2014.08.005.

Hynes RO. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol*, 1999 Dec; 9(12):M33-7.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil em 2016 [criado em 2015]. Rio de Janeiro, RJ; 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>

Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2011 Jul;17(5):462-8. doi : 10.1111/j.1601-0825.2010.01781.x.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104. Review. Erratum in: *J Clin Invest*. 2010 May 3;120(5):1786.

Landry D, Glastonbury CM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a review. *Radiol Clin North Am*. 2015 Jan;53(1):81-97. doi : 10.1016/j.crl.2014.09.013.

Leite IGC, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol*. 1998 Sep;34(57): 347-52.

Lourenço SV, Kamibeppu L, Fernandes JD, Sotto MN, Nico MM. Relationship of adhesion molecules expression with epithelial differentiation markers during fetal skin development. *J Cutan Pathol*. 2008 Aug;35(8):731-7. doi : 10.1111/j.1600-0560.2007.00893.x.

Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev*. 2003 Apr;83(2):337-76.

Marchisio PC, Trusolino L, De Luca M. Topography and biological role of integrins in human skin. *Microsc Res Tech*. 1997 Aug 15;38(4):353-60. Review.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Jul;102(1):67-76.

Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch*. 2011 Nov;459(5):465-75. doi : 10.1007/100428-011-1151-5.

Muñoz-Guerra MF, Gías LN, Campo FR, Pérez JS. Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Nov;61(11):1289-96.

O-Charoenrat P, Pillai G, Patel S, Ficher C, Archer D, Eccles S, et al. Tumor thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol*. 2003 Jun;39:386-90.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer*. 2007 Jun;7:415-28. Review.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998 Mar;392(6672):190-3.

Pezier T, Partridge M. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and upper oesophagus. *Medicine*. [internet]. 2001 [citado]; 39(3):137-41. Disponível em: [www.meddicinejournal.com.uk/article/S1357-3039\(10\)00310-5/pdf](http://www.meddicinejournal.com.uk/article/S1357-3039(10)00310-5/pdf).

Pindborg J, Reichart P, Smith C, Van der Waal I. WHO International Histological Classification of Tumours Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. New York: Springer-Verlag; 1997.

Quan J, Johnson NW, Zhou G, Parsons PG, Boyle GM, Gao J. Potential molecular targets for inhibiting bone invasion by oral squamous cell carcinoma: a review of mechanisms. *Cancer Met Rev*. 2012 Jun;31(1-2):209-19.

Rajwar YC, Jain N, Bathia G, Sikka N, Garg B, Walia E. Expression and significance of cadherins and its subtypes in development and progression of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Diag Res*. 2015 may; 9(5):ZE05-07. doi : 10.7860/JCDR/2015/11964.5907.

Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MRDO. Periooperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Feb;129(2):219-28.

Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Sep;8(9):11884-94. eCollection 2015. Review.

Savagner P. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii89-92. doi: 10.1093/annonc/mdq292.

Shapiro L, Weiss WI. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Sep;1(3):a003053. doi : 10.1101/calperspect.a003053.

Slootweg PJ, Muller H. Mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*. 1989 Feb;17(2):69-74.

Sobrado, VR, Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Holt, L.J., Nieto, M.A., Portillo, F., and Cano, A. The class I bHLH factors E2-2A and E2-2B regulate EMT. *J Cell Sci*. 2009;122:1014-24.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991 Mar; 251(5000):1451-5. Review.

Takes RP. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol.* 2004 Aug;40(7):656-67.

Thiery JP, Acloque H, Huang R, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov;138(5):871-90. doi : 10.1015/j.cell.2009.11.007.

Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(6):479-98.

Totsuka Y, Usui Y, Tei K et al. Mandibular involvement by squamous cell carcinoma of the lower alveolus: analysis and comparative study of histologic and radiologic features. *Head Neck.* 1991;13:40-50.

Trelstad RL, Hay ED, Revel JD. Cell contact during early morphogenesis in the chick embryo. *Dev Biol.* 1967 Jul;16(1):78-106.

Van der Pluijm G. Epithelial plasticity, cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone.* 2011 Jan;48(1):37-43. doi : 10.1016/j.bone.2010.07.013.

Vicente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, López-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol.* 2002 Apr;38(3):301-8.

Wang B, Zhang S, Yue K, Wang XD. The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases. *Chin J Cancer.* 2013 Nov;32(11):614-8. doi:10.5732/cjc.012.10219.

Wang X, Zheng M, Liu G, Xia W, McKeown-Longo PJ, Hung MC, Zhao J. Kruppel-like factor 8 induces epithelial to mesenchymal transition and epithelial cell invasion. *Cancer Res.* 2007; 67: 7184-7193.

Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ, Varvares MA. Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope.* 2000 Jan;110(1):65-72.

Woolgar JA, Rogers SN, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED. Cervical lymph node metastasis in oral cancer: the importance of even microscopic extracapsular spread. *Oral Oncol.* 2003 Feb;39(2):130-7.

Xue Y, Lim D, Zhi L, He P, Abastado JP, Thierry F. Loss of HPV16 E2 Protein Expression Without Disruption of the E2 ORF Correlates with Carcinogenic Progression. *Open Virol J.* 2012;6:163-72. doi: 10.2174/1874357901206010163.

Yan W, Shao R. Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cell invasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. *J Biol Chem.* 2006 Jul;281(28):19700–8.

Yagi T, Takeichi M. Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 2000 May;14(10):1169-80.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell.* 2008 Jun;14(6):818–29.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE ORAL: ASPECTOS DA INVASÃO

Pesquisador: Sílvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42520915.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.014.981

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Carcinoma Epidermóide da Cavidade Oral ou Carcinoma Epidermóide Oral (CEO) é o sexto tipo de câncer mais comum ao redor do mundo. Seu desenvolvimento ocorre devido a múltiplas alterações genéticas e alguns fatores etiológicos conhecidos como o tabagismo e o etilismo crônico, dentre outros. Um dos maiores impactos na qualidade da sobrevivência é a recidiva, e as maiores taxas são encontradas quando há invasão da mandíbula, algo que piora o prognóstico levando em conta a dificuldade em se avaliar esta invasão, tanto clinicamente quanto por exames radiográficos. As invasões ósseas ocorrem, em geral, em áreas edêntulas se comparadas com dentadas. Pacientes que apresentam erosão da cortical óssea definida têm sua lesão elevada ao grau de classificação T4 e são tratados com excisão óssea de todo o segmento. Pela extensão e complexidade deste tipo de tratamento, há necessidade de se realizar um correto diagnóstico e previsão da evolução da patologia ainda no pré-operatório. A determinação do nível da invasão óssea pelo CEO é fator determinante para o cirurgião de cabeça e pescoço estabelecer seu plano de tratamento. Apesar dos avanços, esse tipo de invasão é bem rápido, causando um diagnóstico tardio e muitos T4. O processo de invasão óssea por um CEO demonstra uma grande dependência de vários fatores para sua ocorrência, sendo um dos mais importantes, o potencial de atividade osteoclástica, responsável pela degeneração de componentes ósseos minerais através de secreções de ácidos. Esta atividade osteoclástica definirá a velocidade da infiltração óssea do CEO. A osteoclastogênese

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.014.981

(OCG) depende diretamente de três moléculas: a RANKL, expressa em osteoblastos e fundamental para o desenvolvimento de osteoclastos; RANK que interage diretamente com a RANKL para a diferenciação de precursores osteoclásticos para osteoclastos; e a osteoprotegerina, que pode ser sintetizada por osteoblastos e células do estroma, sendo um inibidor da reabsorção óssea. O correto equilíbrio destas moléculas influencia diretamente na efetividade ou deficiência osteoclástica. Um fator de suma importância na invasão óssea pelo CEO é a transição epitélio-mesenquimal (TEM), trata-se do processo de células epiteliais transformadas exercerem uma plasticidade epitelial, mudando seu fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal, o que ocasiona aumento de capacidade migratória, resistência à apoptose e uma produção exacerbada de componentes de matriz extracelular. A TEM é caracterizada pela regulação positiva de proteínas mesenquimais como as periostina, vimentina, fibronectina e Ncaderina, junto à regulação negativa das epiteliais, como a E-caderina. Os processos de TEM e de transição mesênquimo-epitelial (TME), quando expressados, aumentam a capacidade de invasão da célula tumoral por criar uma célula híbrida, adaptável ao meio e com facilidade para circular, pela sua capacidade de mudança de fenótipo. Isso aliado à sua forte presença em CEO's invasivos e metastáticos, evidencia esta etapa como um forte definidor de prognóstico da lesão. Ainda são escassos na literatura os trabalhos sobre as peculiaridades do fenômeno TEM na invasão óssea pelo CEO. Sabe-se que nesse fenômeno, alterações na expressão da e-caderina são importantes. Neste estudo será avaliada a relação da e-caderina com o processo de invasão óssea do carcinoma epidermóide oral. Serão selecionados 30 casos de carcinoma epidermóide oral (CEO) atendidos no Ambulatório de Estomatologia do HC-FMUSP, com seus respectivos prontuários, além de 10 casos controle. Serão comparados o estudo imunohistoquímico da e-caderina, o estudo histopatológico e a evolução clínica por meio de análise estatística adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar os aspectos clínicos, evolutivos, histopatológicos e perfil protéico de e-caderina em casos de carcinoma epidermóide oral com invasão óssea (maxila e mandíbula), através da análise retrospectiva de prontuários, seguida da análise histopatológica e da imunohistoquímica da e-caderina. Espera-se encontrar uma real relação entre a expressão de e-caderina e o processo de invasão óssea do carcinoma epidermóide oral.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.014.981

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos e como benefício havendo a comprovação da relação da expressão da e-caderina com o processo de invasão óssea, novas formas de tratamento poderão ser propostas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante, poderá trazer informações importantes para o entendimento do processo de invasão óssea nos casos de carcinoma epidermóide oral.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Dispensa-se o TCLE porque serão avaliados prontuários retrospectivamente. Folha de rosto; Autorização para o uso dos prontuários do Ambulatório de Estomatologia do HC-FMUSP; Projeto de pesquisa, foram adequadamente apresentados, não havendo impedimento ético.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As recomendações anteriores foram plenamente atendidas, não havendo inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.014.981

SAO PAULO, 08 de Abril de 2015

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br