RAYZA RECHETNICOU

**Análise imuno-histoquímica de vimentina e de novo sistema de graduação
histológica de malignidade em carcinomas epidermóides orais**

São Paulo
2020

RAYZA RECHETNICOU

**Análise imuno-histoquímica de vimentina e de novo sistema de graduação
histológica de malignidade em carcinomas epidermóides orais**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas (Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais) para obter o título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

São Paulo
2020

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

Rechetnicou, Rayza.

Análise imuno-histoquímica de vimentina e novo sistema de graduação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides orais / Rayza Rechetnicou, orientador Décio dos Santos Pinto Júnior -- São Paulo, 2020.

65 p. : tab., fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Graduação histológica de malignidade. 3. Vimentina. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Rechetnicou R. Análise imuno-histoquímica de vimentina e de novo sistema de graduação histológica de malignidade em carcinomas epidermóides orais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2020

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Kennedy e Luisa**, que nunca mediram esforços para me ensinar o caminho do bem, e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida. Sem vocês, eu não chegaria até aqui. Muito obrigada por tudo! O amor que sinto por vocês é incondicional

Ao Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Junior** por ter me aberto o mundo da pesquisa e pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço a confiança que depositou em mim nesses anos e por me atender com paciência todas as vezes que bati em sua porta. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, por me guiar de forma que eu conseguisse trabalhar meu raciocínio em pesquisa, nunca me dando todas as respostas e sim orientando para que chegasse até elas. Agradeço pelas risadas e por me ajudar a levar toda essa experiência de pós-graduação de uma forma mais leve. Sua orientação foi extremamente importante para que eu me tornasse a profissional que sou hoje.

Ao Prof. Dr. **Fábio Daumas Nunes**, por nos inspirar todos os dias com sua gentileza, disposição e amor à profissão. Serei eternamente grata por ter sido, muitas vezes um suporte psicológico nessa loucura de pós-graduação. O Senhor foi mais que um mestre, foi um grande amigo que me ajudou a amadurecer como pessoa e profissional.

À Profa. Dra. **Marilia Trierveiler Martins**, a quem admiro muito por seu amor e dedicação à docência e ao programa. Muito obrigada pela paciência, dedicação, compreensão e por todas as conversas e conselhos. Você é um exemplo de competência e profissionalismo que pretendo levar para toda vida.

Ao meu primeiro orientador, Prof. Dr. **Brunno Santos de Freitas Silva**, por ter feito eu me apaixonar pela Patologia Oral. Eu jamais teria chegado até aqui se não fosse a experiência maravilhosa que eu tive no curso de Odontologia como sua aluna. Muito obrigada pela sua amizade.

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, **Suzana, Marina, Karém e Paulo** com quem tive o prazer de conviver e aprender ao longo desses anos. Meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos.

À minha querida amiga **Nayara de almeida**, minha “soul sister “, por sempre estar comigo mesmo a 1005km de distância. Muito obrigado por sua amizade, irmandade e parceria. Você tem um lugar especial no meu coração. Amo você!

Às minhas amigas e colegas de casa, que estiveram comigo durante todo esse processo. À **Pâmela Lucas**, vulgo PANZINHA, você sabe o carinho que tenho por ti. Obrigada pelo suporte e também por ter compartilhado momentos bons e ruins desses anos de São Paulo. À **Letícia Dantas** e a **Victoria**, por toda a convivência, vocês eram as peças que faltavam na nossa casa sem limites. Nossas trocas sempre foram de muito aprendizado. Vocês foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e hoje posso dizer que são muito mais que amigas, são minhas irmãs de coração e nós sempre seremos uma família, mesmo que estejamos separados. Amo vocês!

À minha amiga e colega **Thalita**, não tenho palavras para agradecer tudo o que fez por mim. Você me fez ter esperança e força para que conseguisse finalizar tudo isso. Se tenho uma dissertação terminada, devo muito a você. Agradeço pelas excelentes conversas, pelos conselhos e por me ajudar na análise estatística e interpretação dos resultados deste trabalho.

Aos demais amigos da pós-graduação, que foram minha família em São Paulo, **Jefferson, Nathalia, Marcos, Aline, Juliana, Letícia, Flávia, Emília, Anaeliza, Amanda, Marina Tuma**, e todos os outros que fizeram parte da minha rotina de alguma maneira. Agradeço por todos os momentos de estudo e por ter compartilhado seus conhecimentos comigo, muito obrigada também por todos os momentos de descontração, muitas risadas e cantorias memoráveis no vivo's.

Aos funcionários e colaboradores do PPg FOU SP, **Elisa, Juvani, Vinícius e Adriana** muito obrigada pela disponibilidade, auxílio e paciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Não é o crítico que importa; nem aquele que aponta onde foi que o homem tropeçou ou como o autor das façanhas poderia ter feito melhor. O crédito pertence ao homem que está por inteiro na arena da vida, cujo rosto está manchado de poeira, suor e sangue; que luta bravamente; que erra, que decepçiona, porque não há esforço sem erros e decepções; mas que, na verdade, se empenha em seus feitos; que conhece o entusiasmo, as grandes paixões; que se entrega a uma causa digna; que, na melhor das hipóteses, conhece no final o triunfo da grande conquista e que, na pior, se fracassar, ao menos fracassa ousando grandemente”

(Theodore Roosevelt, 1910)

RESUMO

Rechetnicou R. Análise imuno-histoquímica de vimentina e de novo sistema de graduação histológica de malignidade em carcinomas epidermoides orais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2020. Versão Original.

O Carcinoma epidermoide oral (CEO) é uma neoplasia de origem epitelial que representa um desafio devido a seu comportamento agressivo e capacidade metastática¹. Sua carcinogênese envolve um processo multifásico que culmina na desregulação da expressão de proteínas relacionadas a transição epitélio-mesênquima (EMT), como a vimentina, que tem sido associada a invasão e metástase de carcinomas². Com alta incidência e pouca evolução quanto a tratamentos, devido a heterogenicidade histológica do CEO, se torna difícil encontrar um sistema de análise prognóstica que seja confiável e reproduzível³. Em 2017, Boxberg et al.⁴, propôs um novo sistema de graduação histológica que demonstrou uma alta concordância inter e intraobservadores e forte impacto prognóstico. Com base nessas informações, este estudo teve por objetivo investigar, pela técnica de imuno-histoquímica a expressão desta proteína em 50 casos de CEO provenientes do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Cada caso foi graduado quanto a atividade de brotamento (BA) e tamanho do ninho de células (CNS). Através do escore obtido, os casos foram divididos em bem diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2) e pobremente diferenciados (G3). A expressão de VIM foi considerada focal com até 25% das células neoplásicas imunopositivas e difusa quando mais de 25% de células neoplásicas imunopositivas. O teste exato de Fisher foi utilizado para a análise estatística quanto a associação da marcação de VIM e com características clínicas e histológicas e associação entre o sistema de graduação histológica. A expressão imuno-histoquímica de VIM foi significativamente associada ao status de tabagismo dos pacientes desta amostra, porém não esteve relacionada aos outros parâmetros clínicos e histopatológicos referentes aos casos investigados.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide oral. Graduação histológica de malignidade. Vimentina.

ABSTRACT

Rechetnicou R. Immunohistochemical analysis of vimentin and of a new histological malignancy grading system in oral squamous cell carcinomas [dissertation]. São Paulo: Faculdade de odontologia, Universidade de São Paulo; 2020.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a neoplasm of epithelial origin that represents a challenge due to its aggressive behavior and metastatic capacity¹. Its carcinogenesis involves a multiphase process that culminates in the dysregulation of the expression of proteins related to the epithelium-mesenchymal transition (EMT), such as vimentin (VIM), which has been associated with invasion and metastasis of carcinomas². With high incidence and little evolution in terms of treatments, OSCC shows histological heterogeneity and this makes it difficult to find a prognostic analysis system that is reliable and reproducible³. In 2017, Boxberg et al.⁴ demonstrated a high inter and intraobserver agreement and a strong prognostic impact. Based on this information, this study aimed to investigate, by immunohistochemistry, the expression of this protein in 50 cases of OSCC from the Oral and Maxillofacial Pathology Service of the Faculty of Dentistry of the University of São Paulo. Each case was graded in terms of budding activity (BA) and cell nest size (CNS). Through the score obtained, the cases were classified into well differentiated (G1), moderately differentiated (G2) and poorly differentiated (G3). Vimentin expression was considered focal with up to 25% of immunopositive neoplastic cells, and diffuse when more than 25% of the neoplastic cells were immunopositive. Fisher's exact test was used for statistical analysis to evaluate the association between VIM expression and clinical characteristics and with the histological grading system. The immunohistochemical expression of VIM was positive in most of the studied cases and it was significantly associated with the smoking status of the patients, but it was not related to the other clinical and histopathological parameters. We concluded that the protein VIM is focally expressed in most OSCC cases and that this expression is not associated with the new histological grading system investigated.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Histological Malignancy Grading System. Vimentin.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Vias de sinalização envolvidas na Transição Epitélio-Mesênquima (EMT)	30
Figura 5.1 - Fotomicrografia demonstrando padrão de marcação focal na periferia das ilhas neoplásicas	44
Figura 5.2 - Fotomicrografia demonstrando padrão de marcação difuso nas ilhas neoplásicas com regiões imunopositivas em grupos celulares menores	45
Gráfico 5.1 - Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o sexo.....	48
Gráfico 5.2- Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com os grupos etários.....	48
Gráfico 5.3- Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o local anatômico	49
Gráfico 5.4- Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o status de tabagismo	49
Gráfico 5.5- Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o status de etilismo.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-	Gradação de diferenciação celular proposta pela OMS (2005).....	25
Tabela 2.2-	Algoritmo de graduação para carcinoma epidermoide oral	27
Tabela 5.1-	Parâmetros clínicos e demográficos dos casos de carcinoma epidermoide estudados	41
Tabela 5.2-	Distribuição absoluta e relativa dos parâmetros de análise histopatológica dos casos de carcinoma epidermoide segundo proposto por Boxberg et al ¹⁶	42
Tabela 5.3-	Distribuição absoluta e relativa da expressão de Vimentina em casos de carcinoma epidermoide oral, de acordo com as características clínicas e histológicas.....	46
Tabela 5.4-	Resultados do teste de associação entre a expressão imuno-histoquímica de Vimentina e as características clínicas e histológicas dos casos de carcinoma epidermoide oral estudados	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β -Cat	β -catenina
BA	Tumour Budding Activity
CEO	Carcinoma Epidermoide Oral
CNS	Cell Nest Size
E-cad	E-caderina
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition
N-cad	N-caderina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	CARCINOMA EPIDERMÓIDE.....	23
2.2	DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO TUMORAL	23
2.3	SISTEMA TNM E GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE	24
2.4	TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA.....	28
2.5	VIMENTINA.....	30
3	PROPOSIÇÃO	33
4	METODOLOGIA	35
4.1	AMOSTRA.....	35
4.2	ANÁLISE PELO SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE	36
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	37
4.4	TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA	37
4.5	AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS	39
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5	RESULTADOS	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	41
5.2	RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA	42
5.3	RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	43
6	DISCUSSÃO	51
7	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO.....	63

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide oral (CEO) é a neoplasia maligna mais frequente em região de cabeça e pescoço³. Representa 95% de todas as neoplasias que se desenvolvem nessa região, e está entre as 10 neoplasias malignas mais comuns de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA)⁵. Apesar dos avanços relacionados ao entendimento e nos tratamentos, o número de novos casos por ano permanece estável juntamente com a taxa de mortalidade desses pacientes^{3,5}. Sua elevada incidência instiga o desenvolvimento de diversos estudos visando a identificação de biomarcadores que auxiliem no entendimento de sua gênese, progressão e tratamento^{1,5-8}.

Usualmente, quando diagnosticadas, essas lesões passam por um processo de análise para classificação e seleção do melhor tratamento⁹. O estadiamento TNM é o sistema mais utilizado para esse fim, utilizando características neoplásicas clínicas importantes⁹. No entanto, muitas vezes pacientes com neoplasias de mesmo estágio clínico, apresentam uma diferença significativa no prognóstico e agressividade⁹. Observando essa lacuna que a classificação TNM não conseguia preencher, foram sendo desenvolvidas sistemas de graduação histológica de malignidade, aonde vários autores sugeriram meios de auxiliar na classificação neoplásica e predição do prognóstico do paciente¹⁰⁻¹⁴.

Devido a subjetividade da análise para todas as graduações histológicas e por outros fatores como grau de concordância e a dificuldade na padronização de parâmetros que tenham um alto impacto prognóstico, nenhuma graduação foi consolidada para essa neoplasia^{10,15}. O CEO apresenta uma heterogenicidade histológica que torna difícil encontrar um sistema de análise prognóstica que seja confiável e reproduzível⁴. O último sistema de graduação histológica proposto por Boxberg et al.⁴ demonstrou uma alta concordância inter e intraobservadores e forte impacto prognóstico¹⁶.

A transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês Epithelial-Mesenchymal Transition) está intimamente associado a progressão dos CEOs, e consiste na alteração de fenótipos epiteliais das células neoplásicas, direta ou indiretamente, em

fenótipos mesenquimais¹⁷. Esse evento confere a essas células a capacidade de invasão dos tecidos adjacentes, perda da polaridade, evasão a apoptose e alta motilidade, levando a progressão neoplásica¹⁸. Alguns autores sugeriram que a aquisição dessas características é temporária, ocorrendo uma transição mesênquima-epitelial pós EMT, assim como na dinâmica EMT-MET (Mesenchymal-Epithelial Transition) na embriogênese^{19,20}.

Com o objetivo de entender os processos de carcinogênese, invasão e progressão tumoral, vários genes e proteínas foram estudados especialmente nesse evento^{17,21-24}. Em razão dessas alterações genes supressores de caderina como Snail e Twist foram altamente marcados em carcinomas e no fronte de invasão dessas neoplasias, concomitantemente com uma redução na expressão de E-caderina (E-cad)^{24,25}. Essa proteína é responsável pela adesão célula-célula e sinalização para parada do ciclo celular por meio da via Wnt/ β -catenina²⁵. Alguns autores afirmaram que a expressão de vimentina em CEO era produto da ativação da via de sinalização β -catenina (β -Cat) através do complexo β -catenina/TGF e esse processo apresenta relação com a sobrevivência de células epiteliais neoplásicas nos tecidos mesenquimais²⁶⁻²⁹. Apesar de alguns estudos afirmarem a participação da vimentina na progressão, invasão e metástase de carcinomas epiteliais em outros locais do corpo, os resultados em CEO ainda não são claros^{18,26,30}.

Segundo Paccione et al.²⁹, a vimentina pode ser um potencial marcador para a progressão inicial das células mutadas, adquirindo maior motilidade e capacidade metastática.

Com base nesses dados o presente estudo teve como objetivo analisar a expressão da proteína Vimentina em carcinomas epidermóides orais e, utilizando o novo sistema de graduação histológica de malignidade proposto por Boxberg et al.⁴, e associar os dados encontrados com a características clínicas e histológicas dos casos selecionados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura foi realizada de maneira a elucidar as pesquisas relacionadas ao carcinoma epidermoide oral, novas descobertas sobre alterações moleculares envolvidas na Transição Eitélíio-Mesenquima e abordagens atuais em pesquisa de gradações histológicas de malignidade.

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE

O carcinoma epidermoide é uma neoplasia maligna de origem epitelial altamente agressiva e que está entre as 10 mais comuns no mundo (contando cabeça e pescoço)³. Em cavidade oral é considerada a mais frequente neoplasia em região de cabeça e pescoço, representando mais de 90% de todos os cânceres dessa área e possui maior incidência em indivíduos do sexo masculino entre a quarta e sexta década de vida^{3,5}. Sua prevalência tende a aumentar de acordo com o avanço da idade, exposição a fatores de risco e estilo de vida⁵.

2.2 DESENVOLVIMENTO E PROGRESSÃO TUMORAL

O desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral compreende diversos elementos contribuintes que envolvem associação de fatores extrínsecos como o uso intenso de tabaco e consumo de álcool e fatores intrínsecos como a predisposição genética e deficiências nutricionais e imunológicas³. Apesar de se desenvolver em qualquer região da boca, esta neoplasia apresenta uma predileção significativa pelas regiões de borda lateral de língua, lábio inferior e soalho bucal⁵.

Ainda que vários avanços tenham sido feitos nos últimos anos, o número de novos casos de câncer de cabeça e pescoço tem se mantido, e devido a sua agressividade, o prognóstico dos pacientes diagnosticados com carcinoma

epidermoide continua pobre e com uma sobrevida de 5 anos para menos de 50% dos casos^{3,5}.

2.3 SISTEMA TNM E GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE

Por décadas, o sistema TNM tem sido um tipo de linguagem universal na classificação de neoplasias malignas, visto que analisa características clínicas básicas como extensão local da lesão, disseminação regional e metástase a distância⁹. Essa forma de determinação prognóstica auxilia a estimar tanto a sobrevida dos pacientes quanto na distinção de formas de tratamento e resposta clínica desses tratamentos⁹. Contudo, alguns pacientes com CEO clinicamente classificados em estádios I e II vão a óbito de forma rápida, tornando cada vez mais difícil prever a sobrevida desse paciente. Essa agressividade pode ser explicada por meio das diferentes características celulares individuais de cada neoplasia^{3,7,9}.

Desde o século XVII, vários aspectos já eram relacionados a malignidade das neoplasias, como tamanho, localização, idade dos pacientes, assim como a relação com vasos sanguíneos e linfáticos^{5,10}. E desde essa época, já se observava e era questionado sobre o comportamento dessas neoplasias.

A partir disso, nas últimas décadas diversos pesquisadores desenvolveram sistemas de gradações histológicas buscando classificar os carcinomas epidermóides por meio do padrão histológico de cada paciente e entender dissonâncias entre o comportamento biológico das neoplasias com características clínicas aparentemente¹⁰. Esses sistemas de graduação avaliam diferentes parâmetros histopatológicos e têm diferentes poderes preditivos¹⁰⁻¹³. Um dos primeiros autores a sugerir um método que era dissociado de características clínicas e utilizava padrões histopatológicos para graduação dos CEOs foi Broders em 1920 e posteriormente revisada em 1925¹¹. O autor afirmava que o grau de anaplasia, era determinante para o prognóstico do paciente. No entanto, ao longo dos anos, foi-se observando que os CEOs possuíam uma heterogeneidade celular e que outras

análises precisariam ser feitas para que as gradações histológicas tivessem uma maior precisão quanto a prognóstico e aplicabilidade clínica¹³.

A proposição de Broders¹¹, foi essencial para o desenvolvimento do raciocínio relacionado a características histopatológicas dessas neoplasias, e diante disso surgiram diversas outras propostas como gradações multiparâmetros, avaliação das margens invasivas e abordagens de avaliação de risco, que pudessem contribuir com a compreensão e análise de prognóstico, mas que produziram resultados conflitantes quanto a predição de sobrevida^{10,15,16}.

Dentre os sistemas que já foram relatados ao longo das últimas décadas, a OMS, em 2005¹⁴, sugeriu um sistema de diferenciação celular baseado na proposição de Broders, aonde os cortes histológicos eram avaliados segundo a morfologia das células e divididos em três grupos: pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Gradação de diferenciação celular proposta pela OMS (2005)

Parâmetro	Graus de diferenciação		
	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado
Características	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso	Certo grau de pleomorfismo e atividade mitótica	Predomínio de células imaturas
		Pouca queratinização	Numerosas mitoses típicas e atípicas
			Mínima queratinização

Fonte: Barnes¹⁴.

Apesar de ser a mais utilizada, essa gradação também apresenta aspectos que inviabilizam a sua aplicabilidade clínica de forma consistente, pois não possui um grande impacto preditivo e estratificação prognóstica^{4,16}.

Até o momento, nenhuma gradação foi aceita pela literatura e ainda existem divergências a respeito da eficácia de sua utilização, pois até o presente momento não foi encontrada uma padronização dessas avaliações, principalmente relacionado a concordância entre observadores^{4,10,15}.

Esse fator específico fez Boxberg et al.⁴ investigar a aplicabilidade de um esquema de gradação recentemente proposto pelo grupo para carcinoma de pulmão em CEOs por entender que os carcinomas do trato aerodigestivo inferior e superior estão altamente relacionados.

Foi conduzido um estudo que analisava diversos parâmetros histomorfológicos sugeridos previamente que pudessem ser utilizados para a construção de um novo esquema de gradação histológica que tivesse um alto impacto prognóstico, junto com os parâmetros anteriormente sugeridos para carcinoma de pulmão. No entanto, os autores afirmaram que características histomorfológicas isoladas, não são específicas o suficiente para uma gradação proficiente. Em seus resultados, demonstraram que a combinação da atividade de brotamento do tumor – BA (Tumour Budding Activity) e tamanho do ninho de células – CNS (Cell Nest size), parâmetros morfológicos que os autores consideraram fáceis de avaliar em um CEO, podem representar um potencial maligno dos carcinomas e ser altamente prognóstico. O grupo então propôs um novo esquema de gradação histológica de malignidade que possui uma classificação simples e de fácil reprodução^{4,16} (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 - Algoritmo de graduação para carcinoma epidermoide oral

Algoritmo para graduação	
Parâmetro	Pontos
Atividade de brotamento tumoral	
Sem brotamento	1
< 15 brotamentos	2
≥ 15 brotamentos	3
Menor tamanho de ninhos tumorais	
> 15 células	1
5-15 células	2
2-4 células	3
Invasão de células individuais	4
Grau histológico	Escore Total
Bem diferenciado - G1	2-3
Moderadamente diferenciado - G2	4-6
Pobrememente diferenciado - G3	7

Fonte: Boxberg¹⁶.

Em 2018, o mesmo grupo realizou um estudo que validasse esse algoritmo avaliando a concordância interobservador e intraobservador. Através da análise de 108 casos utilizando três patologistas com avaliação independente e com resultados calculados utilizando o método Cohen's Kappa, concluíram que o sistema proposto possui alta reprodutibilidade, um importante impacto prognóstico e categorias claramente definidas¹⁶.

A elevada incidência dos CEOs e alta taxa de mortalidade fomenta cada vez mais o desenvolvimento de estudos visando o entendimento de sua gênese, progressão, bem como a investigação de marcadores moleculares como coadjuvantes nesse processo de carcinogênese⁷.

2.4 TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESÊNQUIMA

A morfologia do carcinoma reflete diversas interações moleculares essenciais para sua progressão^{31,32}. Um desses eventos é a transição epitélio-mesênquima, descrita inicialmente por Greenburg e Hay³³, em 1982, onde ocorre alteração nas características fenotípicas das células epiteliais, como polaridade e capacidade coesiva, e adquirem fenótipos mesenquimais como motilidade celular e capacidade invasiva³³.

Até hoje, são conhecidos três tipos de EMT¹⁹. A do tipo I está intimamente relacionada com a embriogênese e permite que as células epiteliais que antes pertenciam a um epitélio integral, percam sua adesão com células vizinhas, desenvolvam a capacidade migratória e se desloquem para regiões próximas ou distantes no embrião com a finalidade de arquitetar os tecidos do organismo^{19,20}. Após a embriogênese, o mecanismo EMT mantém-se inativo a fim de conservar a integridade e homeostase dos tecidos do organismo salvo durante a reparação tecidual^{19,20}.

A EMT do tipo II, como é conhecida nesse estágio, é responsável por reconstruir os tecidos após a injúrias, além de formar fibroblastos e modular a inflamação para o total reparo desse dano¹⁹. A EMT do tipo III, tem sido proposta como um evento que está associada a processos patológicos como a progressão de carcinomas¹⁹.

Assim como todos os eventos que ocorrem no organismo associados a morfogênese, a EMT ocasiona por meio de sinalizações que a célula epitelial recebe do microambiente ou de alterações genéticas intracelulares^{34,35}. Em razão desses sinais recebidos, as células neoplásicas podem desencadear o mecanismo de EMT para adquirir os fenótipos requeridos para a invasão local, translocação por meio de vasos sanguíneos e linfáticos a sítios distantes ocasionando metástase (Figura 2.1)¹⁹. Para fixação em um sítio diferente, a nova colônia precisa de meios para sobrevivência e para isso ela tende a reagrupar e recuperar as características epiteliais¹⁹. Esse processo reversivo de transição mesênquima-epitélio (MET) acontece fazendo as células epiteliais recuperarem suas características fenotípicas

originais após passarem pelo EMT, funcionando como um efeito³⁵. Esse processo EMT-MET foi descrito como essencial na embriogênese, pois algumas células epiteliais necessitam de diversas transformações teciduais do epitélio ao mesênquima e mesênquima ao epitélio, para conseguirem adentrar a matriz extracelular, migrar para seu local de destino e formar os órgãos e tecidos^{20,31}.

Alguns estudos têm sugerido que as células neoplásicas utilizem dessa dinâmica EMT-MET, pois um número significativo de genes é ativado e/ou inativado durante a invasão mesenquimal dessas células, então nos últimos anos a quantidade de estudos que objetivam entender esse processo tem aumentado significativamente²⁰. Vários estímulos extracelulares estão relacionados com a ativação do processo EMT-MET, como fatores de crescimento, citocinas, sinalização célula-célula entre outros¹⁹. Esses estímulos funcionam como ativadores de vias de sinalização que induzem a produção de proteínas relacionadas a todo tipo de função celular e especificamente induzindo essa transformação celular direta ou indiretamente³².

Inúmeros marcadores foram estudados com o intuito de identificar possíveis moléculas que ajudariam no prognóstico de neoplasias malignas. Liang et al.¹⁹, realizaram uma meta-análise objetivando reunir uma base de dados com todos os genes e proteínas já estudados que estavam relacionados com a EMT. Neste estudo, eles mostraram que mais de 500 marcadores já tinham sido estudados de forma experimental, não só como genes expressos ou ausentes. Também buscaram analisar os tipos de EMT. Fazendo um cruzamento das listas de outros estudos que foram incluídos na meta-análise, eles mostraram genes em comum em todas as listas e dentre eles estavam, Cd24, Cdh1, Cdh2, Epcam, Fn1, Lox, Mmp2, Ocln, Prss8, Vcan, Vim, and Zeb1. Todos genes envolvidos direta ou indiretamente em adesão e/ou motilidade celular.

Figura 2.1 - Vias de sinalização envolvidas na Transição Epitélio-Mesênquima (EMT)

Fonte: GeneTex³⁶

2.5 VIMENTINA

A vimentina, se trata de um filamento intermediário, tipicamente de células de origem mesenquimal, como macrófagos, condrócitos e fibroblastos. Possui peso molecular de 57.000 daltons e possui a função de manter a arquitetura e integridade dos tecidos^{25,37,38}.

Muitas células, quando perdem sua natureza tridimensional, sendo de origem não mesenquimal, malignas ou não, adquirem a expressão de vimentina, mesmo em propagações malignas e células em cultura^{18,30,39}. Muitos estudos têm reportado o aumento na expressão de vimentina em carcinomas de origem epitelial e essas células seriam menos diferenciadas ou mostrariam perda ou redução da coesividade^{26,40,41}. Os CEOs apresentam uma marcação significativa dessa proteína, porém localizada em células específicas, sugerindo uma alteração adaptativa das células epiteliais ao microambiente ao qual está localizada^{8,23}.

Estudando o papel da vimentina junto com a troca de expressão das caderinas, Afrem et al.²⁶, conseguiram demonstrar que o aumento da expressão de vimentina em carcinomas, está intimamente relacionado a diminuição na expressão de E-caderina. Visto que o gene promotor de vimentina, tem como alvo a via de sinalização β -catenina/TGF, a ativação dessa via de sinalização através da ruptura entre a E-caderina e β -catenina pode estar envolvida na sua alta expressão²⁷.

Por ser uma proteína intimamente relacionada a motilidade celular, muitos estudos seguem a premissa de que a alta expressão de vimentina em carcinomas estaria relacionada a migração e invasão celular e já foi demonstrado que a supressão da vimentina pode inibir a migração de células de carcinomas que, para que a transição epitélio mesenquima acontecesse, expressaram essa proteína²⁹. Paccione et al.²⁹ afirmaram que a supressão da vimentina com o intuito de reverter o fenótipo mesenquimal de neoplasias avançadas pode ser utilizada como uma modalidade de terapia.

Essa característica fenotípica das células neoplásicas aparenta ser temporária. Liu et al.⁴², em 2016, investigaram a expressão da vimentina em dois tipos de células de CEO com baixa capacidade metastática (HN4) e com alta capacidade de metástase (HN12), buscando se essa proteína seria um bom fator prognóstico. Em seu estudo eles conseguiram identificar que os níveis de expressão de vimentina estavam intimamente associados com a capacidade metastática dos tipos celulares. Quando comparados, a linhagem com alta capacidade de metástase demonstrava uma expressão significativamente maior do que a linhagem com baixo potencial metastático. Além disso, após a diminuição da vimentina na linhagem celular HN12 via siRNA, resultou na redução das atividades de invasão e migração dessas células. Demonstrando que a super-expressão de vimentina pode estar associada a EMT e a propensão de invasão e metástase de células neoplásicas⁴².

Costa et al.¹⁸, realizaram um estudo imuno-histoquímico em 20 biópsias de carcinomas epidermóides, verificando a expressão de vimentina, E-caderina e N-caderina no front invasivo e nas áreas central e superficial da lesão, objetivando entender as alterações dessas moléculas em cada região. Os autores e identificaram a diminuição da expressão da E-caderina na profundidade invasiva das neoplasias, maior expressão de vimentina e nenhuma marcação para N-cad (N-

caderina). Esse grupo relatou que a perda da E-caderina era maior em áreas com brotamentos tumorais e que isso se traduzia na facilidade de invasão que as células dessa área apresentavam. Já a falta de marcação de N-caderina pode ser explicada pelo pequeno número amostral e diferenças no processamento, apesar de ter sido feita com casos controle¹⁸.

Apesar dos estudos realizados, e muitos concordarem em relação a positividade da marcação, ainda não há uma padronização de técnicas para análise e possível utilização dos resultados na estratificação de pacientes e utilização com um sistema de gradação histológica de fácil execução e com alta concordância⁴. Os dois parâmetros utilizados por Boxberg et al.⁴ estão altamente relacionados com a perda de adesão célula-célula e podem demonstrar fatores morfológicos do fenômeno da transição epitélio-mesênquima e sendo o aumento na expressão de vimentina um resultado frente a perda dessa adesão¹⁶.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica de Vimentina em 50 espécimes de carcinoma epidermoide oral provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Os objetivos específicos do estudo foram:

- ✓ Coletar as informações clínicas e demográficas dos pacientes incluídos para estudo;
- ✓ Analisar histologicamente os espécimes de CEO incluídos e realizar a graduação histológica proposta por Boxberg et al.⁴.
- ✓ Comparar a expressão imuno-histoquímica de Vimentina aos parâmetros clínicos e histopatológicos investigados.

4 METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido de acordo com os preceitos determinados pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, publicada em 12 de dezembro de 2012. O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (Anexo A).

4.1 AMOSTRA

O presente estudo de caráter experimental compreendeu uma amostra de 50 casos de carcinomas epidermóides orais provenientes dos arquivos dos serviços de Patologia Cirúrgica do departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), no período de 2008 a 2018, diagnosticados por meio de exame histopatológico.

Para tal, dos casos selecionados, foram obtidos cortes histológicos de 3µm, corados pelo método de hematoxilina e eosina. Sob microscópio ótico de luz, os espécimes foram analisados para seleção, confirmação, diferenciação das amostras e classificação quanto ao sistema de graduação histológica de malignidade de Boxberg et al.⁴. No caso de dúvida quanto à classificação da lesão, os cortes foram aprofundados, e os mesmos foram novamente analisados para se instituir uma avaliação final do caso.

4.2 ANÁLISE PELO SISTEMA DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE

Os cortes histológicos foram classificados conforme algoritmo proposto por Boxberg et al.⁴, que consiste na avaliação de dois fatores morfológicos: Atividade de brotamento tumoral (BA) e Tamanho de ninhos celulares (CNS). A BA foi definida como ramificação de pequenos ninhos de tumor com <5 células neoplásicas no parênquima/estroma circundante; baixa atividade de brotamento definida como 1 a 14 e alta atividade de brotamento com ≥ 15 ninhos de brotamento por campo (10 HPF).

Células neoplásicas agrupadas cercadas por estroma neoplásico foram definidas como ninhos celulares. O tamanho do ninho no CEO foi classificado de acordo com o tamanho do menor ninho de células invasivas. Aglomerados de células neoplásicas compostos por >15 células tumorais foram classificados como ninhos grandes, 5 a 15 células neoplásicas como ninhos intermediários; os ninhos pequenos consistiam em 2 a 4 células neoplásicas. Invasão de única célula foi definida como células neoplásicas isoladas, que não apresentam arquitetura aninhada.

A pontuação final foi calculada somando-se a pontuação da atividade de brotamento em 10 HPF e o tamanho do ninho de células, conforme descrito anteriormente. CEO com escore de 2 ou 3 foram classificados como bem diferenciados (G1), CEO com escore entre 4 e 6 foram considerados moderadamente diferenciados (G2) e CEO com escore 7 como pobremente diferenciação (G3).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos no estudo somente os casos que:

- Possuíam fichas com informações básicas preenchidas.
- Fragmentos fixados em formol 10% ou formaldeído.
- Dispuseram de quantidade de material suficiente para análise morfológica e Imuno-histoquímica.

Os casos foram excluídos do estudo quando:

- As fichas estavam incompletas quanto a idade, sexo, etnia e localização da lesão;
- Dispuseram de extensão insuficiente para análise morfológica e Imuno-histoquímica.
- Fragmentos danificados pela técnica adotada durante a Biópsia como bisturi elétrico e apreensão do tecido com pinças e pela forma de fixação.
- Fragmentos com extensa área de necrose.

4.4 TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Reações de imuno-histoquímica foram realizadas pela técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos antivimentina. Para realização desta metodologia foram preparados, a partir do material embocado em parafina, cortes de 3 μ m de espessura dos espécimes teciduais, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilano. Após essa etapa, os cortes

foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo um a 60 °C por 30 minutos, e outro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, passando por três banhos de etanol absoluto, etanol a 95%, 90%, 85% e 80% por 3 minutos cada.

Após a reidratação foi realizada a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram imersos em água destilada por 10 minutos, seguido por mais duas lavagens com água destilada. Após essa etapa, os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica. Para esse tratamento, os cortes que foram submetidos aos anticorpos antivimentina em diluição de 1:500, foram mergulhados em uma solução de ácido cítrico monoidratado 10mM, pH 6.0 em banho Maria por 30 minutos a 95°C.

Ao final da recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados durante 10 minutos em água destilada, seguida de mais duas lavagens, para posteriormente ser realizada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual. O bloqueio da peroxidase endógena dos espécimes foi efetuado por meio da imersão das lâminas, por duas vezes, em uma solução na proporção de 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol por 15 minutos cada. Em continuidade, a lavagem em água destilada foi repetida, seguida pela imersão dos cortes por três vezes em solução de TRIS pH 7.6, por 5 minutos.

A diluição e o tempo de incubação do anticorpo primário utilizado neste estudo foram otimizados de acordo com o tecido a ser aplicado, tendo sido estabelecido a incubação por 30 minutos à 4°C. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o sistema do kit LSAB+ (DAKO, Carpinteria, CA, USA) em incubações de 30 minutos cada.

As reações foram reveladas por meio da incubação por 10 minutos com a substância diaminobenzidina (Liquid DAB+, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA). Em seguida, os cortes foram lavados com TRIS e água deionizada para remoção de excessos da substância de revelação, seguida pela realização de contra-coloração com hematoxilina de Mayer. Todas as reações imuno-histoquímicas deste estudo foram realizadas utilizando-se controles positivos e negativos.

4.5 AVALIAÇÃO DAS MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Os espécimes submetidos às reações de imuno-histoquímica foram avaliados por um sistema de pontuação semi-quantitativa e qualitativa com o intuito de reduzir possíveis distorções relacionadas com a heterogeneidade das amostras. As lâminas foram observadas em microscópio de luz com aumento final de 400x sob um foco fixo e com clareza de campo.

A avaliação da expressão imuno-histoquímica foi considerada positiva para antivimentina quando localizada no citoplasma de células neoplásicas. Foi considerado expressão focal para casos com até com até 25% das células imunopositivas, expressão difusa quando mais de 25% das células foram imunomarcadas e negativo quando não houvesse imunomarcção em células neoplásicas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a coleta, os dados foram organizados em um banco informatizado, com o auxílio do programa Excel e do software GraphPad Prism 8, e submetidos inicialmente a análise descritiva. Para avaliar a associação entre as variáveis, os dados foram submetidos aos testes estatísticos Exato de Fisher. Foi adotado nível de significância de 5% para todos os testes, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A amostra desta pesquisa foi constituída por 50 casos de carcinoma epidermoide de língua e assoalho oral diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A idade dos pacientes variou de 22 a 95 anos, com média de 60,1 e desvio padrão de 14,1 anos. Sendo que 58,3% (n=28) desses pacientes possuíam idade superior a 60 anos. Dos 51 casos estudados, 39 (78%) corresponderam a pacientes do sexo masculino e 11 (22%) a pacientes do sexo feminino. Vinte e cinco pacientes (50%) eram tabagistas e 23 (46%) etilistas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Parâmetros clínicos e demográficos dos casos de carcinoma epidermoide estudados

Parâmetro	n(%)
Sexo	
Masculino	39 (78%)
Feminino	11(22%)
Idade	
10 a 40 anos	5 (10%)
41 a 59 anos	15 (30%)
60 a 74 anos	20 (40%)
> 75 anos	10 (20%)
Idade	
Até 60 anos	20 (41,7%)
> 60 anos	28 (58,3%)
Tabagismo	
Não	19 (38%)
Sim	25 (50%)
Não informado	6 (12%)
Etilismo	
Não	21 (42%)
Sim	23 (46%)
Não informado	6 (12%)

Fonte: A autora.

5.2 RESULTADOS DA ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após a graduação de todos os casos seguindo o modelo histopatológico de análise proposto por Boxberg et al.¹⁶, observou-se que 54% dos casos (n=27) apresentava mais de 15 focos de brotamento tumoral, enquanto apenas 10% dos casos (n=5) não apresentava atividade de brotamento tumoral. Em relação ao tamanho dos ninhos tumorais, observou-se que 40% dos casos (n=22) apresentavam ninhos tumorais pequenos, com duas a quatro células, enquanto 28% (n=14) dos casos apresentavam invasão em células individuais. Ao final dessas duas análises os pontos foram somados e 66% (n=33) dos casos foram classificados como moderadamente diferenciados (G2). Os dados dessa análise estão sumarizados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Distribuição absoluta e relativa dos parâmetros de análise histopatológica dos casos de carcinoma epidermoide segundo proposto por Boxberg et al¹⁶

Parâmetro	n (%)
Atividade de brotamento tumoral	
Sem brotamento	5 (10%)
< 15 brotamentos	18 (36%)
≥ 15 brotamentos	27 (54%)
Menor tamanho de ninhos tumorais	
> 15 células	5 (14%)
5-15 células	9 (18%)
2-4 células	22 (40%)
Invasão de células individuais	14 (28%)
Grau histológico	
Bem diferenciado - G1	6 (12%)
Moderadamente diferenciado - G2	33 (66%)
Pobrememente diferenciado - G3	11 (22%)

Fonte: A autora.

5.3 RESULTADOS DA ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para análise da expressão imuno-histoquímica de Vimentina foi feita uma análise semi-quantitativa do padrão de marcação nas células do *front* de invasão tumoral. Casos com até 25% das células imunopositivas foram classificados como tendo expressão focal (Figura 5.1) Se mais de 25% das células estivessem imunomarcadas, os casos foram considerados como tendo expressão difusa de Vimentina (Figura 5.2). Para efeitos de comparações estatísticas os casos de Vimentina focal e difusa foram agrupados.

Em geral, a maioria dos casos apresentou expressão focal de Vimentina (n=26; 52%), enquanto apenas 7 (14%) casos apresentaram expressão difusa dessa proteína e 16 (32%) casos foram completamente negativos. As distribuições das expressões de Vimentina de acordo com as características clínicas e histopatológicas estão resumidas na tabela 5.3.

Figura 5.1 – Fotomicrografia demonstrando padrão de marcação focal na periferia das ilhas neoplásicas

Fonte: A autora.

Figura 5.2 – Fotomicrografia demonstrando padrão de marcação difuso nas ilhas neoplásicas com regiões imunopositivas em grupos celulares menores

Fonte: A autora.

Tabela 5.3 - Distribuição absoluta e relativa da expressão de Vimentina em casos de carcinoma epidermoide oral, de acordo com as características clínicas e histológicas

Variáveis	Expressão focal de Vimentina	Expressão de difusa de Vimentina	Expressão negativa de Vimentina	Total
Sexo				
Feminino	6 (12%)	2 (4%)	3 (6%)	11 (22%)
Masculino	21 (41%)	5 (10%)	13 (26%)	39 (78%)
Idade				
≤60 anos	13 (27%)	3 (6%)	4 (9%)	20 (41,7%)
>60 anos	14 (29%)	3 (6%)	11 (23%)	28 (58,3%)
Local anômico da lesão				
Língua	21 (42%)	6 (12%)	11 (22%)	38 (76%)
Assoalho bucal	6 (12%)	1 (2%)	5 (10%)	12 (24%)
Tabagismo				
Sim	16 (36%)	5 (11%)	4 (9%)	25 (56,8%)
Não	6 (14%)	2 (5%)	11 (25%)	19 (43,1%)
Etilismo				
Sim	11 (25%)	6 (14%)	6 (14%)	23 (52,3%)
Não	11 (25%)	1 (2%)	9 (20%)	21 (47,7%)
Grau histológico				
G1	4 (8%)	0 (0%)	2 (2%)	6 (12%)
G2	15 (31%)	5 (10%)	12 (25%)	33 (66%)
G3	7 (14%)	2 (2%)	2 (2%)	11 (22%)
Atividade de brotamento tumoral				
Sem brotamento	4 (8%)	0 (0%)	1 (2%)	5 (10%)
< 15 brotamentos	10 (21%)	1 (2%)	7 (14%)	18 (36%)
≥ 15 brotamentos	13 (25%)	6 (12%)	8 (16%)	27 (54%)
Menor tamanho de ninhos tumorais				
> 15 células	4 (9%)	0 (0%)	1 (2%)	5 (14%)
5-15 células	6 (13%)	0 (0%)	3 (6%)	9 (18%)
2-4 células	9 (19%)	4 (9%)	9 (19%)	22 (40%)
Invasão de células individuais	8 (17%)	3 (6%)	3 (6%)	14 (28%)

Fonte: A autora.

Ao comparar a expressão de Vimentina entre os parâmetros clínicos e histopatológicos, observou-se associação estatisticamente significativa para o parâmetro tabagismo ($p=0,008$), sendo que a maioria dos casos referentes a paciente tabagistas apresentava expressão positiva de Vimentina, enquanto a maioria dos pacientes não tabagistas apresentava expressão negativa de Vimentina. Não foram observadas outras associações estatísticas. Os resultados da análise estatística estão sumarizados na tabela 5.4 e nos gráficos de 5.1 a 5.5.

Tabela 5.4 – Resultados do teste de associação entre a expressão imuno-histoquímica de Vimentina e as características clínicas e histológicas dos casos de carcinoma epidermoide oral estudados

Variáveis	Vimentina positiva	Vimentina negativa	Total	p*
Sexo				
Feminino	8 (16%)	3 (6%)	11 (22%)	0.99
Masculino	26 (52%)	13 (26%)	39 (78%)	
Idade				
≤60 anos	16 (33%)	4 (8%)	20 (41,7%)	0.21
>60 anos	17 (36%)	11 (23%)	28 (58,3%)	
Local anatômico da lesão				
Língua	27 (54%)	11 (22%)	38 (76%)	0.48
Assoalho bucal	7 (14%)	5 (10%)	12 (24%)	
Tabagismo				
Sim	21 (48%)	4 (9%)	25 (56,8%)	0.008
Não	8 (18%)	11 (25%)	19 (43,2%)	
Etilismo				
Sim	17 (39%)	6 (14%)	23 (52,3%)	0.34
Não	12 (27%)	9 (20%)	21 (47,7%)	
Grau histológico				
G1	4 (8%)	2 (4%)	6 (12%)	0.99
G2/G3	30 (60%)	14 (28%)	44 (88%)	

* Teste Exato de Fisher

Fonte: A autora.

Gráfico 5.1 – Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o sexo

Fonte: A autora.

Gráfico 5.2 – Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com os grupos etários

Fonte: A autora.

Gráfico 5.3 – Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o local anatômico

Fonte: A autora.

Gráfico 5.4 – Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o status de tabagismo

Fonte: A autora.

Gráfico 5.5 – Distribuição de casos exibindo expressão imuno-histoquímica positiva e negativa de Vimentina de acordo com o status de etilismo

Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A transição epitélio-mesênquima consiste em um evento biológico no qual as células epiteliais perdem diversas das suas funções fenotípicas e ganham propriedades típicas de células mesenquimais, exibindo alta mobilidade e perda da polarização. Esse fenótipo migratório adquirido está envolvido em diversas neoplasias malignas, principalmente durante a invasão tumoral e o processo de metástase^{43,44}.

A Vimentina é o maior constituinte da família de proteínas do filamento intermediário e é expressa normalmente em células mesenquimais, atuando na manutenção da integridade celular e promovendo resistência contra o estresse celular⁴⁵. Elevadas expressões de Vimentina tem sido demonstradas em diversas neoplasias malignas incluindo tumores gastrointestinais, câncer de mama, de próstata, de pulmão, de cabeça e pescoço, melanoma, dentre outros^{43,45,46}.

Este estudo investigou a expressão imuno-histoquímica de Vimentina em 50 casos de carcinoma epidermoide oral (CEO). Observou-se que a maioria dos casos apresentava expressão positiva dessa proteína, entretanto, dentre os 33 casos positivos, apenas 7 apresentaram expressão difusa. No restante dos casos positivos a expressão de Vimentina se deu de forma focal, ocorrendo principalmente nas células no *front* de invasão tumoral. Dezesseis casos foram completamente negativos para Vimentina.

Essa heterogeneidade na expressão de Vimentina já foi demonstrada em outros estudos que investigaram casos de CEO^{26,41,47,47}. Em geral, esses autores também demonstraram uma positividade focal de Vimentina nas células tumorais do *front* de invasão. Assim como no presente estudo, Afem et al.²⁶ demonstraram expressão focal de Vimentina na maioria dos casos estudados, estando localizada principalmente na periferia das ilhas tumorais.

A expressão de Vimentina em neoplasias epiteliais malignas está associada a um alto grau de invasão e tem sido considerada um biomarcador de transição epitélio-mesênquima confiável^{43,45}. Além disso, a expressão imuno-histoquímica de

Vimentina está associada com uma elevada frequência de metástases linfonodais em carcinomas de cabeça e pescoço^{48,49}.

Neste estudo, a expressão de Vimentina foi comparada a um novo sistema de graduação tumoral para casos de carcinoma epidermoide oral, proposto por Boxberg et al.⁴. Esse sistema preconiza a avaliação da atividade de brotamento tumoral e o menor tamanho dos ninhos tumorais e foi escolhido para este estudo por apresentar alta concordância intra e interobservadores, além de estar associado a diminuição da sobrevida global e específica em pacientes com CEO^{4,16}.

Seguindo esse novo sistema de graduação, a maior parte dos casos destes estudos apresentavam alta atividade de brotamento tumoral e ninhos tumorais pequenos, com duas a quatro células. O grau histológico final de 66% dos casos foi o G2, sendo considerados como moderadamente diferenciados. No estudo de Boxberg et al.⁴, 54% dos casos de CEO estudados também foram classificados como G2/moderadamente diferenciados; enquanto no estudo mais recente do mesmo grupo¹⁶, esse grau foi atribuído a 47,2% dos casos. Esses resultados demonstram que, mesmo utilizando-se um novo sistema de graduação histológica de malignidade, a maioria dos casos de CEO será classificada na categoria “moderadamente diferenciada”.

De todo modo, o sistema de graduação apresentado por Boxberg et al.⁴ é mais objetivo do que o sistema utilizado pela OMS e apresenta bons resultados de concordância¹⁶. Portanto, novas pesquisas que utilizem esse sistema em CEO devem ser estimuladas.

Observou-se uma expressão heterogênea de Vimentina dentre os graus histológicos do tumor, sendo que não foram identificadas associações estatisticamente significantes. Esses resultados corroboram os encontrados por Liu et al.⁴¹, que também não identificaram associações entre a expressão de Vimentina e o grau histológico do tumor (utilizando o sistema preconizado pela OMS). Entretanto, em uma amostra de 230 casos de carcinoma epidermoide de língua, Wang et al.⁴⁷ demonstraram que uma elevada expressão de Vimentina está significativamente associada a um aumento na atividade de brotamento tumoral. Neste estudo, 54% dos casos apresentavam alta atividade de brotamento tumoral (>15) e desses casos a maioria apresentou expressão positiva de Vimentina. Esses

resultados podem indicar que as células organizadas em brotamentos tumorais estejam sofrendo a transição epitélio-mesênquima. Entretanto, mais estudos que utilizem esse novo sistema de graduação são essenciais para desvendar essa relação.

Não foram observadas associações entre a expressão de Vimentina e os parâmetros sexo, idade, local anatômico e etilismo. Contudo, observou-se que os casos referentes a pacientes tabagistas apresentavam principalmente Vimentina positiva, enquanto os pacientes não-tabagistas apresentavam maior frequência de Vimentina negativa, e essa associação foi estatisticamente significativa.

Um estudo recente que avaliou células epiteliais orais de pessoas tabagistas e não-tabagistas, assim como de pacientes com leucoplasia oral e com CEO, demonstrou que o tabagismo promove a transformação maligna do epitélio oral através da ativação das vias Wnt/ β -catenina e MAPK⁵⁰. Além disso, os autores demonstraram um aumento na expressão de Vimentina nas células de pacientes tabagistas, com leucoplasia oral e com CEO. Esses resultados corroboram os encontrados no presente estudo e indicam que o tabagismo pode estar relacionado à progressão do câncer oral, através da modulação de vias de sinalização importantes para a transição epitélio-mesênquima.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta pesquisa, conclui-se que:

- A expressão imuno-histoquímica de Vimentina foi positiva e focal na maioria dos casos de CEO estudados;
- Os casos de CEO investigados exibiam principalmente mais de 15 brotamentos tumorais e ninhos tumorais com 2 a 4 células;
- Predominantemente, os CEOs foram classificados histologicamente como grau 2 (moderadamente diferenciados);
- A expressão imuno-histoquímica de Vimentina foi significativamente associada ao status de tabagismo dos pacientes desta amostra;
- A expressão imuno-histoquímica de Vimentina não esteve relacionada aos outros parâmetros clínicos e histopatológicos referentes aos casos investigados.

REFERÊNCIAS¹

1. Sinevici N, O'sullivan J. Oral cancer: deregulated molecular events and their use as biomarkers. *Oral Oncol.* 2016 Oct;61:12-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.07.013.

 2. Rivera C, Oliveira AK, Costa RAP, De Rossi T, Paes Leme AF. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. *Oral Oncol.* 2017 Sep;72:38-47. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.003.

 3. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol.* 2010 Jun;46(6):414-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.009.

 4. Boxberg M, Jesinghaus M, Dorfner C, Mogler C, Drecoll E, Warth A, et al. Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system. *Histopathology.* 2017 Jun;70(7):1125-1137. doi: 10.1111/his.13173.

 5. Brasil. Ministério da Saúde; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2017.

 6. Blatt S, Krüger M, Ziebart T, Sagheb K, Schiegnitz E, Goetze E, et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. *J craniomaxillofac Surg.* 2017 May;45(5):722-730. doi: 10.1016/j.jcms.2017.01.033.

 7. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol.* 2014 Mar;50(3):168-77. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.12.008.

 8. Zhou Y, Zhang H, Zhuo X, Liu Y, Zhang G, Tan Y. Over-expression of TWIST, an epithelial-mesenchymal transition inducer, predicts poor survival in patients with oral carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Jun 15;8(6):9239-47.

 9. Costa A de L, Araújo Júnior RF, Ramos CC. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2005 Mar-Apr;71(2):181-7. doi: [https://doi.org/10.1016/S1808-8694\(15\)31308-2](https://doi.org/10.1016/S1808-8694(15)31308-2).
-

10. Lindenblatt R de C, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenço S de Q. Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med*. 2012 Jan;41(1):34-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01068.x.
11. Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the LIP. *JAMA*. 1920;74(10):656. doi:10.1001/jama.1920.02620100016007.
12. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987 Jun;95(3):229-49. doi:10.1111/j.1600-0722.1987.tb01836.x
13. Byrne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis*. 1998 Jun;4(2):70-7. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.1998.tb00260.x>.
14. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours. *WHO Classif Tumour*. 2005;9:163-75. doi: 10.1016/j.urology.2004.09.048.
15. Wagner VP, Webber LP, Curra M, Klein IP, Meurer L, Carrad VC, et al. Byrne's grading system predicts poor disease-specific survival of oral squamous cell carcinoma: a comparative study among different histologic grading systems. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Jun;123(6):688-696. doi: 10.1016/j.oooo.2017.02.012.
16. Boxberg M, Bollwein C, Jöhrens K, Kuhn PH, Haller B, Steiger K, et al. Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance. *J Clin Pathol*. 2019 Apr;72(4):285-94. doi: 10.1136/jclinpath-2018-205454.
17. Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Dec;1796(2):75-90. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.03.002.
18. Costa LC, Leite CF, Cardoso SV, Loyola AM, Faria PR, Souza PE, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci*. 2015 Mar-Apr;23(2):169-78. doi: 10.1590/1678-775720140187.

19. Liang L, Sun H, Zhang W, Zhang M, Yang X, Kuang R, et al. Meta-analysis of EMT Datasets Reveals different types of EMT. *PLoS One*. 2016 Jun 3;11(6):e0156839. doi: 10.1371/journal.pone.0156839.

20. Gröger CJ, Grubinger M, Waldhör T, Vierlinger K, Mikulits W. Meta-analysis of gene expression signatures defining the epithelial to mesenchymal transition during cancer progression. *PLoS One*. 2012;7(12):e51136. doi: 10.1371/journal.pone.0051136.

21. Shih JY, Yang PC. The EMT regulator slug and lung carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2011 Sep;32(9):1299-304. doi: 10.1093/carcin/bgr110.

22. Kidd ME, Shumaker DK, Ridge KM. The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Jan;50(1):1-6. doi: 10.1165/rcmb.2013-0314TR.

23. Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Mar 1;8(3):3150-4.

24. Guo M, Mu Y, Yu D, Li J, Chen F, Wei B, et al. Comparison of the expression of TGF- β 1, E-cadherin, N-cadherin, TP53, RB1CC1 and HIF-1 α in oral squamous cell carcinoma and lymph node metastases of humans and mice. *Oncol Lett*. 2018 Feb;15(2):1639-1645. doi: 10.3892/ol.2017.7456.

25. Balasundaram P, Singh MK, Dinda AK, Thakar A, Yadav R. Study of β -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. *Diagn Pathol*. 2014 Jul 21;9:145. doi: 10.1186/1746-1596-9-145.

26. Afrem MC, Mărgăritescu C, Crăițoiu MM, Ciucă M, Șarlă CG, Cotoi OS. The immunohistochemical investigations of cadherin "switch" during epithelial-mesenchymal transition of tongue squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55(3 Suppl):1049-56.

27. Bai Y, Sha J, Kanno T. The role of carcinogenesis-related biomarkers in the wnt pathway and their effects on Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 28;12(3). pii: E555. doi: 10.3390/cancers12030555.

28. McInroy L, Määttä A. Down-regulation of vimentin expression inhibits carcinoma cell migration and adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 17;360(1):109-14. doi:10.1016/j.bbrc.2007.06.036
29. Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, Waseem A, Gutkind JS, Zehner ZE, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol Cancer Ther*. 2008 Sep;7(9):2894-903. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0450.
30. Fujiwara T, Eguchi T, Sogawa C, Ono K, Murakami J, Ibaragi S, et al. Carcinogenic epithelial-mesenchymal transition initiated by oral cancer exosomes is inhibited by anti-EGFR antibody cetuximab. *Oral Oncol*. 2018 Nov;86:251-7. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.09.030.
31. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1438-49. doi: 10.1038/nm.3336.
32. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Mar;15(3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758.
33. Greenburg G, Hay ED. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol*. 1982 Oct;95(1):333-9. doi:10.1083/jcb.95.1.333
34. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology*. 2007 Jun;39(3):305-18. doi: <https://doi.org/10.1080/00313020701329914>.
35. Jolly MK, Ware KE, Gilja S, Somarelli JA, Levine H. EMT and MET: necessary or permissive for metastasis? *Mol Oncol*. 2017 Jul;11(7):755-69. doi: 10.1002/1878-0261.12083.
36. GeneTex. Epithelial-Mesenchymal Transition. [2019] [citado 23 fev. 2019]. Disponível em: https://www.genetex.com/Research/Overview/cancer/Epithelial-Mesenchymal_Transition.
37. Liu PF, Kang BH, Wu YM, Sun JH, Yen LM, Fu TY, et al. Vimentin is a potential prognostic factor for tongue squamous cell carcinoma among five epithelial-mesenchymal transition-related proteins. *PLoS One*. 2017 Jun 1;12(6):e0178581. doi: 10.1371/journal.pone.0178581.

38. Bayo P, Jou A, Stenzinger A, Shao C, Gross M, Jensen A, et al. Loss of SOX2 expression induces cell motility via vimentin up-regulation and is an unfavorable risk factor for survival of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Oncol*. 2015 Oct;9(8):1704-19. doi: 10.1016/j.molonc.2015.05.006.
39. Wangmo, C., Charoen, N., Jantharapattana, K., Dechaphunkul, A. & Thongsuksai, P. Epithelial–Mesenchymal Transition Predicts Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* (2019) doi:10.1007/s12253-019-00731-z.
40. Burdsal CA, Damsky CH, Pedersen RA. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development*. 1993 Jul;118(3):829-44.
41. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*. 2010 Feb;23(2):213-24. doi: 10.1038/modpathol.2009.160.
42. Liu S, Liu L, Ye W, Ye D, Wang T, Guo W, et al. High vimentin expression associated with lymph node metastasis and predicated a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2016 Dec 14;6:38834. doi: 10.1038/srep38834.
43. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1429-37. doi: 10.1172/JCI36183.
44. Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):7-19. doi: <https://doi.org/10.1159/000101298>.
45. Satelli A, Li S. Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 201 Sep;68(18):3033-46. doi: 10.1007/s00018-011-0735-1.
46. Costa LC, Leite CF, Cardoso SV, Loyola AM, Faria PR, Souza PE, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci*. 2015 Mar-Apr;23(2):169-78. doi: 10.1590/1678-775720140187.

47. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011 Aug;40(7):545-51. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x.

48. Jin H, Morohashi S, Sato F, Kudo Y, Akasaka H, Tsutsumi S, et al. Vimentin expression of esophageal squamous cell carcinoma and its aggressive potential for lymph node metastasis. *Biomed Res*. 2010 Apr;31(2):105-12. doi: <https://doi.org/10.2220/biomedres.31.105>.

49. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer*. 2008 May 1;112(9):2088-100. doi: 10.1002/cncr.23410.

50. Sarkar R, Das A, Paul RR, Barui A. Cigarette smoking promotes cancer-related transformation of oral epithelial cells through activation of Wnt and MAPK pathway. *Future Oncol*. 2019 Oct 31. doi: 10.2217/fon-2019-0338.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE VIMENTINA, E-CADERINA, N-CADERINA, SNAIL E TWIST E SUA CORRELAÇÃO COM SISTEMAS DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03300718.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.137.488

Apresentação do Projeto:

O Carcinoma epidermoide oral é uma neoplasia de origem epitelial que representa um desafio devido a seu comportamento agressivo e capacidade metastática. Sua carcinogênese envolve um processo multifásico que consiste em diversas alterações genéticas que levam a desregulação da expressão de proteínas responsáveis pelas funções celulares. Em busca de biomarcadores que possam ser usados como fatores prognósticos,

juntamente com gradações histológicas de malignidade, este estudo tem por objetivo analisar pela técnica de imuno-histoquímica das proteínas Vimentina, E-caderina, N-caderina, Snail e Twist, 50 casos de carcinomas epidermóides orais provenientes dos arquivos dos serviços de Patologia Cirúrgica do departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), no período de 2008 a 2018.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a expressão das proteínas Vimentina, E-caderina, N-caderina, Snail e Twist em carcinomas epidermóides correlacionando com os sistemas de gradação histológica de malignidade proposto por Bryne (1998) e pela OMS (2005) e posteriormente comparar os dados encontrados buscando identificar a relação dos graus de expressão das proteínas analisadas com a progressão neoplásica.

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

Continuação do Parecer: 3.137.488

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo não apresenta riscos já que serão utilizadas lâminas de arquivo e não será possível a identificação dos pacientes.

Obter maior compreensão deste carcinoma de forma que consiga direcionar novas pesquisas para a busca de um ou mais proteínas que auxiliem no prognóstico para os pacientes e possibilitar a criação de um novo sistema de gradação histológica de malignidade que contemple todas as características desse carcinoma.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda cuja a única alteração ocorrida neste projeto foi a inclusão de um membro na equipe de pesquisa a aluna Karine Carli Frank

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatório estão de acordo com as exigências da Resolução 466/12.

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:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1293268_E1.pdf	04/02/2019 13:29:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	22/11/2018 14:04:52	RAYZA RECHETNICOU	Aceito

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.137.488

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao.pdf	22/11/2018 13:16:32	RAYZA RECHETNICOU	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	03/10/2018 14:16:36	RAYZA RECHETNICOU	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador(a))

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