UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Agnes Assao

Correlação da expressão da podoplanina,
ezrina e Rho-A em carcinomas
espinocelulares de lábio inferior

Bauru
2014

AGNES ASSAO

**Correlação da expressão da podoplanina, ezrina
e Rho-A em carcinomas espinocelulares de lábio inferior**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

BAURU
2014

Assao, Agnes

As72c Correlação da expressão de podoplanina, ezrina e Rho-A em carcinomas espinocelulares de lábio inferior./ Agnes Assao. – Bauru, 2014.

122 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 555.531

Data: 13/03/2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação de mestrado ao meu irmão, Régis Assao, por toda sua generosidade e apoio em todos os momentos da minha vida.

Por toda sua contribuição em minha formação e por acreditar nos meus sonhos. Por orientar-me, com seus conselhos e sua experiência. Pelo exemplo de pessoa, de caráter e de irmão.

AGRADECIMENTOS

*À Professora **Denise Tostes Oliveira**, meu maior exemplo de pessoa, professora e pesquisadora. Não existem palavras suficientes para agradecer-lhe. Serei eternamente grata por acolher-me desde o início da minha vida acadêmica. Agradeço por toda sua paciência, pelo ensinamento compartilhado e pela confiança depositada. Obrigada por buscar sempre o melhor de mim e, principalmente, por me formar. Agradeço ainda a amizade e o apoio prestado em todos os momentos. É um grande honra ser sua orientada. Obrigada de coração!*

*Aos meus pais, **Kazuyoshí e Marisa**, por apoiarem nos meus sonhos e decisões. Por todo carinho e amor imensuráveis dispensados a todos seus filhos. Por valorizarem nossa educação como o bem mais precioso e por fazerem de mim uma pessoa melhor. Minha gratidão.*

*Ao meu irmão, **Denís**, que sempre alegre, torna minha vida mais leve. Por todo seu carinho em todos os momentos da minha vida, e pela enorme felicidade ao me fazer tia e madrinha.*

*Ao meu querido afilhado e sobrinho, **Iuri**, pelo amor mais nobre, inocente e puro que existe entre nós.*

*À minha grande e querida amiga **Kellen Cristine Tjioe**. Por toda ajuda profissional e pessoal, desde que entramos na faculdade. Pelos conselhos e apoio nos momentos mais difíceis. Uma das pessoas mais generosas que conheço. Guardo sua amizade como um precioso tesouro.*

*Ao meu querido amigo **Victor Faria Munhoz**, meu terceiro irmão. Por sempre ouvir-me e aconselhar-me, com suas palavras de conforto, de estímulo e de reflexão. Obrigada por sua amizade!*

*Aos meus padrinhos, **Tieko e Pedro**, que sempre se fizeram presentes em minha vida. Às minhas primas, **Bruna e Andrea**, companheiras desde minha infância.*

*Às minhas cunhadas, **Grazi e Samantha**, por tornarem nossa família mais feliz.*

*Aos meus colegas de pós-graduação: **Diego, Alexandre, Lúgia, Paula, Natália, Regina e Ana Paula**. Obrigada pela ajuda e pelo companheirismo.*

*Em especial, aos colegas de pós-graduação: **Heliton, Taiane, Karen e Pepe**, pela amizade e pelos alegres finais de semana compartilhados em Bauru.*

*Às amigas de graduação: **Caroline Nascimento, Caroline Rocha, Mariane Miyashiro, Samanta Moraes e Maria Fernanda**, por todos os bons momentos que vivemos.*

*Às minhas amigas **Poliana, Bárbara e Elisa**, pelo companheirismo em todos os momentos. E ao grande amigo **Thiago**, pelos momentos felizes e gratificantes que sempre me proporcionou.*

Aos Professores do Departamento de Patologia Bucal: Prof. Alberto Consolaro, Prof. Luís António de Assís Taveira e Profa. Vanessa Soares Lara, por cada ensinamento compartilhado e pela amizade dispensada. Minha profunda gratidão.

Aos funcionários do Departamento de Patologia: Fátima Silveira, Maria Cristina e Marina Corrêa, por toda ajuda sempre prestada.

Aos colaboradores do Hospital do Câncer A.C. Camargo: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski, Prof. Dr. Fernando Soares, Prof. Dr. Clóvis Pinto. Obrigada pela atenção e pela contribuição inestimável para realização deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do Hospital do Câncer A.C. Camargo: Suelly Nonogaki e Severino da Silva Ferreira. Obrigada pela realização da técnica imuno-histoquímica e por viabilizarem este trabalho.

Aos pacientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo, por nos permitirem a realização deste estudo.

Aos colaboradores do Hospital do Câncer de Barretos, Fundação Pío XII: Prof. Dr. André Lopes Carvalho e Prof. Cleyton Zanardo de Oliveira, pela prestatividade, sugestões e realização da análise estatística.

Ao Professor José Roberto Pereira Lauris, por seus ensinamentos e pelo auxílio na análise estatística.

Às alunas de iniciação científica: Yara Costa, Paula Yoshino e Maria Carolina Medeiros. Agradeço pela troca de experiências e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À **Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo**, na pessoa da diretora Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira Machado.

À **Comissão de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo, na pessoa do Presidente, Prof. Dr. Guilherme Janson.

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo.

Ao **Hospital do Câncer A.C. Camargo**, na pessoa do seu presidente, Prof. Dr. José Hermílio Curado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo suporte financeiro.

À **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo suporte financeiro, sob a forma de Auxílio Regular à Pesquisa (2012/13411-6) e sob a forma de bolsa de mestrado (2013/16999-7).

Muito Obrigada!

**“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago, a lua toda brilha porque alta vive.”**

Ricardo Reis
(Heterônimo de Fernando Pessoa)

RESUMO

A localização da podoplanina e da ezrina nas células malignas sugere uma ligação dessas proteínas nos processos de migração e invasão tumoral, ativadas mediante a fosforilação de Rho-A. O objetivo desse estudo foi avaliar a distribuição e a correlação da podoplanina, da ezrina e da Rho-A em 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, e verificar a associação dessas proteínas com as variáveis clínicas e patológicas, com a evolução e com o prognóstico dos pacientes. Os pacientes foram analisados quanto ao gênero, idade, tabagismo, etilismo, classificação pelo sistema TNM, tratamento, ocorrência de recidivas locorregionais, segundo tumor primário, além da presença de embolização vascular, infiltração perineural, muscular, glandular e comprometimento linfonodal histopatológico. Analisou-se também as expressões imuno-histoquímicas de podoplanina, ezrina e Rho-A no *front* de invasão tumoral e o índice de malignidade tumoral. A associação entre a podoplanina, a ezrina e a Rho-A com as variáveis clínico-patológicas e a correlação entre as proteínas foram analisadas pelos testes do qui-quadrado e de Spearman, respectivamente. A análise da sobrevivência global em 5 e 10 anos foi feita pelo estimador produto-limite Kaplan-Meier e a comparação da curva de sobrevivência pelo teste *log-rank*. Os resultados demonstraram uma forte expressão de podoplanina, de ezrina e de Rho-A no *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Houve uma associação significativa entre a expressão citoplasmática de podoplanina com o etilismo ($p=0,024$), com a recidiva locorregional ($p=0,028$) e com comprometimento linfonodal histopatológico ($p=0,010$), porém não foi detectada nenhuma associação significativa entre a ezrina e a Rho-A com as variáveis clínicas e microscópicas analisadas. Uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a expressão de podoplanina membranosa ($p=0,000$ e $r=0,384$) e citoplasmática ($p=0,000$ e $r=0,344$) com a expressão de ezrina, e da podoplanina membranosa com a expressão de Rho-A ($p=0,006$ e $r=0,282$) foi detectada. Nenhuma das três proteínas se mostrou fator de prognóstico significativo para os pacientes com câncer de lábio. Concluimos que a forte expressão membranosa de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior pode ajudar a identificar pacientes com menor risco de recidiva locorregional. Além disso, a correlação entre as expressões da podoplanina, da ezrina e da Rho-A pelas células neoplásicas sugere uma participação conjunta destas proteínas nos processos de movimentação celular e invasão tumoral do câncer de lábio.

Palavras-chave: Câncer de lábio, Carcinoma espinocelular, podoplanina, ezrina, Rho-A

ABSTRACT

Correlation of podoplanin, ezrin and Rho-A expression in oral squamous cell carcinoma

Immunolocalization of podoplanin and ezrin suggests a connection between these proteins in migration and tumoral invasion process, activated through Rho-A phosphorylation. The aim of this study was to evaluate the distribution and the correlation of podoplanin, ezrin and Rho-A in 91 squamous cells carcinomas of the lower lip and to verify its association with clinical and pathological features, evolution and prognostic of the patients. Patients were analyzed concerning gender, age, tobacco, alcohol, TNM classification, local and regional recurrences, second primary tumor, perineural, muscle and glandular infiltration, and histopathological lymph node metastasis. The association of podoplanin, ezrin and Rho-A expressions at tumoral invasion *front* and histological risk assessment of tumors were verified by chi-square test. The association between podoplanin, ezrin and Rho-A expressions with clinical and pathological variables, and the correlation of these variables were analyzed by chi-square and Spearman test, respectively. Overall survival in 5 and 10 years was calculated by Kaplan Meier method and overall curves were compared by *log rank* test. The results showed strong expression of podoplanin, ezrin and Rho-A at tumoral invasion *front* of squamous cell carcinomas of the lower lip. A significant association of strong cytoplasmic podoplanin expression and alcoholism ($p=0,024$), local recurrences ($p=0,028$) and lymph node metastasis ($p=0,010$) was found, although ezrin and Rho-A expressions were not associated with clinical and microscopic features analyzed. A statistically significant correlation between membranous ($p=0,000$ e $r=0,384$) and cytoplasmic ($p=0,000$ e $r=0,344$) podoplanin expressions and ezrin, and membranous podoplanin and Rho-A ($p=0,006$ e $r=0,282$) was observed. None of the proteins analyzed can be considered as prognostic factor for lip cancer. We can conclude that strong membranous podoplanin expression in squamous cell carcinoma of the lower lip can help to identify patients with lower risk of local and regional recurrences. Furthermore, the correlation of podoplanin, ezrin and Rho-A expressions suggest a cooperative participation in cell movement and tumoral invasion.

Key-words: Lip cancer, Squamous cell carcinoma, podoplanin, ezrin, Rho-A

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Avaliação de risco histológico. Em A, padrão de invasão tumoral em borda compressiva, em B, de largas ilhotas e em C, de pequenas ilhotas tumorais. Em D e E invasão tumoral perineural de pequenos nervos. Em F, invasão muscular do carcinoma espinocelular de lábio. (A, IHQ 10X; B, IHQ 20X; C, IHQ 40X; D, IHQ 40X; E, IHQ 40X; F, IHQ 40X)..... 65
- Figura 2 - Imunoexpressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B, padrão de expressão forte na membrana e no citoplasma das células do *front* de invasão tumoral. Em C e D detalhe da expressão membranosa de podoplanina nas células periféricas das ilhotas tumorais e com ausência de expressão da proteína na região central e pérolas córneas. Em E e F nota-se a ausência de expressão de podoplanina pelas células malignas e imunopositividade no endotélio linfático (seta). (A, IHQ 20X; B, IHQ 40X; C, IHQ 20X; D, IHQ 20X; E, IHQ 10X, F, IHQ 20x)..... 73
- Figura 3 - Imunoexpressão de ezrina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A, B, C e D, observar a expressão forte da ezrina pelas células neoplásicas do *front* de invasão tumoral, com ausência de expressão nas pérolas córneas. Em E e F, expressão fraca de ezrina na periferia e no centro dos tumores. (A, IHQ 20X; B, IHQ 40X; C, IHQ 20X; D, IHQ 40X; E, IHQ 20X, F, IHQ 40x)..... 79
- Figura 4 - Imunoexpressão de Rho-A nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B, padrão de expressão forte da Rho-A na periferia e no centro das ilhotas tumorais. Em C e D detalhe da expressão citoplasmática forte nas células malignas periféricas e ausência de expressão da Rho-A na região central e pérolas córneas. Em E e F, ausência de expressão de Rho-A no *front* de invasão tumoral. (A, IHQ 40X; B, IHQ 20X; C, IHQ 40X; D, IHQ 20X; E, IHQ 20X, F, IHQ 40x)....., 85
- Figura 5 - Sobrevivência global dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, de acordo com o comprometimento linfonodal histopatológico. Porcentagem de sobrevivência acumulada por meio da técnica Kaplan Meier..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Graduação da malignidade tumoral, de acordo com as características morfológicas e seus respectivos scores, proposto por Brandwein-Gensler et al.(2005).....	52
Tabela 2 -	Protocolo de reações imuno-histoquímicas realizado no presente estudo.....	55
Tabela 3 -	Distribuição dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	60
Tabela 4 -	Distribuição dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as variáveis microscópicas analisadas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	62
Tabela 5 -	Graduação de malignidade dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior proposta por Brandwein-Gensler et al (2005). Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	63
Tabela 6 -	Distribuição da avaliação de risco histológico para recidiva local e diminuição da sobrevivência global dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	63
Tabela 7 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina membranosa no <i>front</i> de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	69
Tabela 8 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina citoplasmática no <i>front</i> de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	70
Tabela 9 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina membranosa no <i>front</i> de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	71

Tabela 10 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina citoplasmática no <i>front</i> de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	72
Tabela 11 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica de ezrina pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	76
Tabela 12 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica de ezrina pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	77
Tabela 13 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica de Rho-A pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	82
Tabela 14 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica de Rho-A pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	83
Tabela 15 - Distribuição da expressão de podoplanina, ezrina e Rho-A, pelas células malignas dos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, segundo a graduação da malignidade tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	87
Tabela 16 - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de podoplanina membranosa e citoplasmática, de ezrina e de Rho-A pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	88
Tabela 17 - Análise da sobrevivência global acumulada em 5 e 10 anos, por meio da técnica de Kaplan-Meier, dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, comprometimento linfonodal histopatológico e expressão de podoplanina, de ezrina e de Rho-A. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.....	90

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
:	Proporção
°C	Graus Celsius
>	Menor
<	Maior
≥	Menor ou igual
≤	Maior ou igual
AP	Anátomo-patológico
Ca	Câncer
CA	Califórnia
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEC	Carcinoma Espinocelular
CEC I	Carcinoma Espinocelular bem diferenciado
CEC II	Carcinoma Espinocelular moderadamente diferenciado
CEC III	Carcinoma Espinocelular pouco ou indiferenciado
CEC SOE	Carcinoma Espinocelular sem outras especificações
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydroclorato
EDTA	Ácido Etileno Diamino-tetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ERM	Ezrina, Radixina, Moesina
EUA	Estados Unidos da América
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GTP	Guanosina Trifosfato
GTPase	Enzima hidrolase de Guanosina Trifosfato

H	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
HSC-3	Instituto Nacional de Pesos e Medidas
IHQ	Imuno-histoquímica
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimol
MOCI	Morte por intercorrência cirúrgica
MOCA	Morte decorrente do câncer
MOASS	Morte por outras causas não relacionadas ao câncer
N	Ausência ou presença clínica de metástase do tumor primário nos linfonodos regionais
Nº	Número
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Nível de significância
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Concentração Hidrogeniônico
pN	Comprometimento Linfonodal Histopatológico
pN0	Ausência de comprometimento Linfonodal Histopatológico
pN+	Presença de comprometimento Linfonodal Histopatológico
r	Coeficiente de correlação de Spearman
RGH	Registro Geral Hospitalar
RNA	Ácido Ribonucléico
SAME	Serviço de Arquivamento Médico
Seg	Segundo

siRNA	Silenciamento Ácio ribonucleico
SP	Estado de São Paulo
SPSS	Statistics Standard Edition Software (Pacote estatístico para Ciências Sociais)
TNM	Sistema de Classificação Tumores Malignos (Tumor Node Metastasis)
T1	Tumor com até 2cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca.
T2	Tumor com mais de 2cm e até 4 cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca.
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca.
T4	Tumor com mais de 4 cm em sua maior extensão, invadindo estruturas adjacentes, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca.
UICC	União Internacional contra o câncer (Union Internationale Contre le Cancer)
USP	Universidade de São Paulo
VEGF-C	Fator de crescimento endotelial vascular tipo C
VIVO 000	Vivo e sem evidência de doença
x^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	EXPRESSÃO DE PODOPLANINA NO CÂNCER DE BOCA	32
2.2	EXPRESSÃO DE EZRINA NO CÂNCER DE BOCA	36
2.3	PROTEÍNA RHO-A NO CÂNCER	40
3	PROPOSIÇÃO	43
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	47
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	49
4.2	REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	49
4.3	VARIÁVEIS DE ESTUDO	50
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	51
4.4.1	Graduação da malignidade tumoral	51
4.4.2	Técnica imuno-histoquímica	53
4.4.3	Avaliação imuno-histoquímica	53
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4.6	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	56
4.7	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	56
5	RESULTADOS	57
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	59
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	61
5.2.1	Graduação de malignidade tumoral	61
5.2.2	Expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior	67

5.2.3	Expressão de ezrina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior	75
5.2.4	Expressão de Rho-A nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior	81
5.2.5	Associação da podoplanina, ezrina e Rho-A com o índice de malignidade dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior	87
5.2.6	Correlação da expressão de podoplanina, ezrina e Rho-A nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior	88
5.3	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA	89
6	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	107
	ANEXOS	119

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A metástase consiste em um processo de disseminação das células malignas, com alteração da sua morfodiferenciação, permitindo que elas adquiram propriedades fibroblásticas, tornando-se assim, mais invasivas (KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012).

Essas células neoplásicas invasivas passam por mudanças morfológicas e estruturais, como a formação e extensão de pseudópodes, por meio da contração do corpo celular e desprendimento das adesões intercelulares (BAUMGARTNER et al., 2006; CLUCAS; VALDERRAMA, 2014). Em seguida, estabelecem locais de adesão com a matriz extracelular no *front* de invasão tumoral e aumentam sua mobilidade, o que permite a migração e invasão para outros locais além do tumor primário (SAHAI et al., 2002).

Nos últimos anos, algumas evidências reforçaram a participação das proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina e moesina) no processo de progressão tumoral, particularmente no mecanismo de migração e invasão da célula epitelial cancerosa, contribuindo para a metástase (ARPIN et al., 2011).

Essas proteínas ERM participam da transmissão de sinais intracelulares, via estimulação de receptores de membrana, que controlam os processos dependentes da adesão, como a proliferação celular, a sobrevivência e a remodelação da actina do citoesqueleto, durante a migração celular (ARPIN et al., 2011; MCCLATCHEY, 2014). Alguns estudos reforçam que, não somente a expressão das proteínas ERM, mas também seu estado de fosforilação e localização subcelular, devem ser considerados para entender o papel destas proteínas na progressão tumoral (MADAN et al., 2006; ARPIN et al., 2011).

Recentemente, Saito et al., (2013) demonstraram a importância de uma das proteínas ERM, a ezrina, na dinâmica da movimentação celular e ativação das vias metastáticas, comprovando, em linhagens celulares neoplásicas de língua (linhagem HSC-3), que na ausência da ezrina, as células diminuíam drasticamente sua proliferação, sua migração e seu poder de invasão.

Adicionalmente, investigações clínicas vem associando a forte expressão citoplasmática de ezrina, pelas células dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, incluindo aqueles de boca, a tumores mais agressivos com maior potencial invasivo e pior prognóstico para os pacientes (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007;

SCHLECHT et al., 2012; WU et al., 2013; SAITO et al., 2013), sugerindo que a expressão desta proteína poderia ser utilizada como um biomarcador para prever a sobrevivência dos pacientes.

Um estudo interessante realizado por Martin-Villar e colaboradores (2005) demonstrou que a ezrina está co-localizada com a podoplanina e se liga diretamente a esta proteína transmembrana, cuja forte expressão no *front* de invasão de carcinomas espinocelulares de boca está relacionada à maior ocorrência de metástases linfonodais e a um pior prognóstico para os pacientes (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013).

Em estudos *in vitro*, em cultura celular, foi verificado que o aumento da expressão de podoplanina induziu a formação de protrusões nas superfícies celulares aumentando a adesão e a migração celular, sugerindo um papel desta proteína nas propriedades de contração e reorganização do citoesqueleto (SCHACHT et al., 2003; MARTIN-VILLAR et al., 2005).

Além disso, foi comprovado que a ligação da podoplanina com a ezrina induz a fosforilação (ativação) da Rho-A promovendo o rearranjo do citoesqueleto de actina *in vitro* (MARTIN-VILLAR et al., 2006). Em linhagens celulares que expressam altos níveis de Rho-A, foi verificado que a podoplanina diminuiu a atividade da Rho-A (MARTIN-VILLAR et al., 2006; WICKI et al., 2006).

Posteriormente, Ma et al. (2013) mostraram uma correlação entre a Rho-A e a ezrina em células de câncer de mama confirmando que, quando a fosforilação da Rho-A era inibida, a expressão de ezrina era suprimida, reduzindo a migração celular, a infiltração tumoral e a ocorrência de metástase. Os autores sugeriram que a sinalização para ativação da Rho-A fornece um feedback positivo que mantém a ezrina no seu estado ativo, capaz de ligar-se à actina do citoesqueleto, permitindo assim a maior mobilidade das células.

Mesmo tendo sido demonstrado que a podoplanina, a ezrina e a Rho-A participam conjuntamente do processo de invasão tumoral de linhagens de câncer pancreático (MARTIN-VILLAR et al., 2006), onde a podoplanina ativada se liga a ezrina e esta última fosforila a Rho-A, provocando a movimentação do citoesqueleto celular, a co-localização celular imuno-histoquímica da expressão destas três proteínas, conjuntamente, em tumores malignos não foi encontrada na literatura.

Além disso, verificamos também que as investigações sobre a expressão de podoplanina e ezrina em câncer de lábio são escassas (GARCIA et al., 2014) e o padrão de expressão de Rho-A neste tipo de tumor não foi encontrado na literatura científica.

Portanto, pretendemos com este estudo verificar se existe uma correlação entre a expressão de podoplanina, de ezrina e de Rho-A no *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio e contribuir com o conhecimento da participação destas proteínas na evolução clínica e no prognóstico dos pacientes com estes tumores malignos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A principal causa de mortalidade e morbidade pelo câncer é devido à metástase (KUMAR; ABBAS; FAUSTO; ASTER, 2010). A metástase é um processo coordenado e complexo, que envolve o desprendimento das células do tecido tumoral, regulação da mobilidade celular e invasão, proliferação, estimulação da angiogênese e evasão através do sistema linfático e sanguíneo, além da troca de sinais entre o microambiente tumoral, estroma e parênquima (NGUYEN, 2007; NOGUTI, 2012). Um dos passos críticos para o desenvolvimento do tumor é a aquisição dessas características invasivas e migratórias pelas células (WICKI et al., 2006).

Para que ocorra a metástase, as células passam por uma morfodiferenciação celular, na qual adquirem propriedades fibroblásticas, tornando-se mais invasivas. Neste processo, também conhecido como transição epitélio-mesenquimal, no qual as células neoplásicas perdem suas características epiteliais e adquirem características mesenquimais, ocorre uma redução na adesão intercelular das células tumorais com perda de E-caderina e aumento da expressão de N-caderina (KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012). Essas células neoplásicas invasivas passam por mudanças morfológicas e estruturais, como a formação e extensão de pseudópodes, em seguida, estabelecem locais de adesão no *front* de invasão, contraem o corpo celular e desprendem-se das adesões intercelulares, o que decorre no aumento de sua mobilidade (TURUNEN, 1994).

O complexo de proteínas ezrina, radixin e moesina (ERM) participa do processo de movimentação celular sendo responsável por transduzir os sinais da membrana celular para os filamentos de actina do citoesqueleto, provocando assim a alteração conformacional da célula (ARPIN et al., 2011; CLUCLAS; VALDERRAMA, 2014).

Nos últimos anos, a participação da proteína ezrina nos processos de movimentação celular e metástase tumoral tem sido investigada, particularmente devido ao seu envolvimento na formação de domínios especializados da membrana celular como as microvilosidades (LAN et al., 2006; ARPIN et al., 2011), os lamelópodes e os filópodes (BAUMGARTNER et al., 2006).

Alguns estudos verificaram que a ezrina encontrava-se co-localizada nas mesmas regiões celulares que a podoplanina (MARTIN-VILLAR et al., 2005) uma proteína que se expressa no *front* de invasão de carcinomas espinocelulares, incluindo aqueles localizados na boca (YUAN et al., 2006; YAMANASHI et al., 2009; CARVALHO et al., 2010;

FUNAYAMA et al., 2011; HUBER et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; LEE et al., 2011; BARTULI et al., 2012; INOUE et al., 2012; ITO et al., 2012; TONG et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DUNKEL et al., 2013; FOSCHINI et al., 2013). Assim sendo, alguns estudos relacionando a podoplanina com as proteínas do complexo ERM passaram a ser realizados a fim de verificar se existe correlação entre elas e, compreender o papel marcante dessas proteínas nos diversos tumores malignos.

Os primeiros estudos foram conduzidos por Martin-Villar et al. (2005) que confirmaram, por análise confocal e imunofluorescência, que a podoplanina está co-localizada com a ezrina. Em células de carcinomas espinocelulares de boca iniciais, os autores observaram a maior expressão de podoplanina e uma diminuição de E-caderina. A partir dessas evidências sugeriram que a podoplanina induz uma redistribuição de ezrina para a formação de extensões celulares, assim como a desestabilização dos complexos E-caderina-catenina, acarretando na redução dos contatos célula-célula. Dessa forma, reforçaram um provável papel da podoplanina e ezrina na progressão do câncer de boca.

Em 2006, Martin-Villar et al. observaram a ligação das proteínas ERM à porção citoplasmática da podoplanina, mediante uma sobreexpressão da proteína Rho-A, em células renais, MDCK. Os autores sugeriram que a ligação entre podoplanina e ezrina, mediante o aumento de Rho-A poderia ser a responsável pela transição epitélio-mesenquimal. Ao bloquearem a expressão de ezrina ou de Rho-A, o processo de transição epitélio-mesenquimal não ocorreu, assim como a diferenciação morfogênica das células, essencial para o remodelamento tecidual e desenvolvimento de tumores. Portanto, os autores afirmaram que o papel da podoplanina na migração e invasão celular reside nesta inter-relação com a ezrina e Rho-A.

Wicki et al. (2006), por sua vez, propuseram uma via independente de invasão das células malignas, na ausência da transição epitélio-mesenquimal. Segundo os autores, a podoplanina ativaria as vias de sinalização que levam a uma migração e invasão coletiva das células, mediante a regulação das Rho-GTPases. Os ensaios de invasão e migração em células de câncer pancreático mostraram um aumento desses processos nas células com maior expressão de podoplanina e na presença de E-caderina, confirmando um efeito pró-migratório e pró-invasivo, independentemente da transição epitélio-mesenquimal. De acordo com o autor, a podoplanina se liga à actina do citoesqueleto via aumento da fosforilação de ezrina. Além disso, a podoplanina modula a atividade de Rho-A, visto que o bloqueio de Rho-A reduziu a mobilidade celular, confirmando um papel da Rho-A no fenótipo pró-migratório das células que expressam a podoplanina.

Posteriormente, Wicki et al. (2007) afirmaram existir duas vias de ativação da podoplanina, uma através da migração coletiva das células, sem que para isso seja necessária a presença de E-caderina ou a transição epitélio-mesenquimal e uma via de invasão individual das células, em que pode-se observar a transição epitélio-mesenquimal, assim como a diminuição de E-caderina e aumento de N-caderina, decorrentes desse processo.

Em 2010, o grupo de Martin-Villar et al. propuseram uma associação da podoplanina com o CD44 na migração das células tumorais. Assim como a ezrina, o CD44 está co-localizado com a podoplanina na membrana celular, na qual possui uma forte expressão. Observou-se, que o CD44 pode funcionar com um co-receptor, modulando a transcrição de sinais da superfície celular ao citoesqueleto, sendo para isso dependente da ligação com as proteínas ERM. A análise da expressão de podoplanina e CD44 em diferentes estágios da carcinogênese mostrou que estas proteínas estão associadas com a progressão do tumor maligno, sendo suas expressões aumentadas em linhagens de carcinomas altamente invasivos. A depleção de podoplanina e CD44 também alterou a formação das extensões de membrana e filópodes, assim como a propriedade de “espalhamento” das células tumorais, o que implicou em uma ligação dependente do CD44 a ezrina para direcionar a mobilidade dessas células tumorais.

Mais recentemente, Kreppel et al. (2010) e Cirligeriu et al. (2014), reafirmaram, que a podoplanina não interage diretamente com a actina do citoesqueleto, mas sim via proteínas da família ERM, aumentando a fosforilação de ezrina e Rho-A, o que levaria ao rearranjo da actina e maior mobilidade da célula tumoral. Confirmaram, portanto, uma inter-relação entre as proteínas do complexo ERM, podoplanina e Rho-A na movimentação da célula tumoral.

Também Cueni et al. (2010), em um estudo *in vitro* com células MCF7 de câncer de mama, observaram a expressão de podoplanina, RhoA, E-caderina e proteínas de membrana. Os autores notaram que a maior expressão de podoplanina induziu um aumento da mobilidade das células MCF7, enquanto que os níveis de Rho-A diminuíram. A expressão de E-caderina, por sua vez, foi fraca, não havendo diferença entre as células que expressavam podoplanina e o grupo controle. Dentre as proteínas de membrana, uma proteína específica de ligação com actina do citoesqueleto, muito similar a ezrina, a villina-1 foi utilizada e observou-se sua maior expressão na presença de podoplanina, confirmando uma ligação da podoplanina, Rho-A e villina-1 na movimentação das células tumorais.

Com base nesta revisão de literatura, nota-se que ainda não está totalmente definida a via de sinalização que induz à maior mobilidade e invasão das células malignas, especialmente naquelas células que expressam fortemente a podoplanina. A seguir,

descreveremos uma revisão das características específicas da podoplanina, da ezrina e da Rho-A, com foco nas investigações mais recentes relacionadas com a expressão destas proteínas pelas células malignas, particularmente do carcinoma espinocelular de boca.

2.1 EXPRESSÃO DE PODOPLANINA NO CÂNCER DE BOCA

Estruturalmente, a podoplanina humana é uma sialoglicoproteína transmembrana tipo 1, com 162 aminoácidos, sendo um domínio extracelular hidrofílico, rico em resíduos de serina e treonina, um outro transcelular hidrofóbico e uma porção citoplasmática constituída por nove aminoácidos (WICKI et al., 2006; MARTIN-VILLAR et al., 2005; SWAIN et al., 2014). Nos tecidos normais, esta proteína se expressa nos podócitos renais, no músculo esquelético, na placenta, nos pulmões, no coração (MARTIN-VILLAR et al., 2005), em miofibroblastos de mamas, nas glândulas salivares, nos osteoblastos e nas células mesoteliais (ORDONEZ, 2006).

Uma das características que consagrou os estudos iniciais da podoplanina foi o fato de se expressar nas células do endotélio linfático e não se expressar nas células endoteliais de vasos sanguíneos (BREITENEDER-GELLEF et al., 1999; MARGARITESCU et al., 2010).

Recentemente, investigações em diferentes tipos de cânceres mostraram que a podoplanina se expressa também nas células neoplásicas malignas (YAMANASHI et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; LEE et al., 2011; SUZUKI et al., 2011; ITO et al., 2012; TONG et al., 2012), inclusive no carcinoma espinocelular de boca (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; MARGARITESCU et al., 2010; HUBER et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; INOUE et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DUNKEL et al., 2013; FOSCHINI et al., 2013).

Embora não se conheça o papel exato da podoplanina no câncer de boca, sua alta expressão pelas células malignas destes tumores vem sendo associada à presença de metástases linfonodais e a uma pior sobrevivência do paciente (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; KREPPEL et al 2011; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013).

Foi comprovado que a podoplanina, além de expressar-se fortemente na região do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca, também está presente em áreas displásicas e hiperplásicas, sendo sugerido que esta proteína pode estar relacionada ao risco

de transformação maligna em lesões cancerizáveis, como a leucoplasia (KAWAGUCHI et al., 2008; FUNAYAMA, et al. 2011; INOUE et al., 2012; KREPPEL et al., 2012; DE VICENTE et al., 2013).

A expressão da podoplanina no câncer de boca foi inicialmente investigada por Yuan et al (2006), em 35 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (16 localizados em boca e 19 em hipofaringe). A forte expressão imuno-histoquímica de podoplanina foi observada em 20 dos 35 tumores, sendo que os pacientes cujos tumores apresentaram forte expressão de podoplanina possuíam maior taxa de metástase linfonodal e menor taxa de sobrevivência específica por câncer ($p=0,00$). Verificaram também que a maior expressão de podoplanina sinalizava uma fase ativa da proteína na região do *front* de invasão tumoral, enquanto nas regiões centrais dos tumores, por serem mais maduras e menos ativas, a expressão protéica era fraca ou ausente. Portanto, os autores concluíram que a podoplanina pode ser utilizada como um fator preditivo para metástase linfonodal e pior evolução clínica do paciente.

Posteriormente, em 2010, Kreppel et al. investigaram, a expressão de podoplanina em 80 pacientes com carcinoma espinocelular de boca e sua associação com o prognóstico e a ocorrência de metástases linfonodais. Os autores observaram a expressão imuno-histoquímica da proteína em 84% dos tumores, sendo que em 24% havia uma forte expressão. A sobrevivência global de 5 anos para os pacientes com alta expressão de podoplanina foi baixa ($p<0,01$), comparada aos pacientes com média e moderada expressão. Além disso, 79% dos pacientes com forte expressão de podoplanina apresentavam metástase linfonodal e dos pacientes com ausência de podoplanina, nenhum apresentou metástase linfonodal. Os autores confirmaram que a expressão de podoplanina estava correlacionada com a presença de metástase linfonodal e com o pior prognóstico dos pacientes com câncer de boca.

Também Huber et al. (2010) avaliaram a expressão de podoplanina em 120 carcinomas espinocelulares de boca e orofaringe, com estádios clínicos T1 e T2, com e sem invasão linfonodal. Em 24,2% dos tumores foi observada, por meio da análise imuno-histoquímica, a expressão da podoplanina, predominantemente, na membrana das células tumorais. Alguns carcinomas espinocelulares indiferenciados apresentaram expressão citoplasmática da proteína. Os resultados demonstraram uma correlação entre a expressão de podoplanina e a metástase linfonodal ($p=0,029$), sendo considerada como um fator preditivo para metástase nos linfonodos ($p=0,028$). Além disso, foi avaliada a expressão da proteína em linhagens de adenocarcinoma de colon e melanoma, *in vitro*, e observou-se uma forte expressão de podoplanina nos tumores considerados mais avançados e com presença de

metástase. A partir destes resultados, concluíram que a expressão de podoplanina pelas células tumorais está correlacionada com a maior incidência de metástases linfonodais em carcinomas espinocelulares de boca e orofaringe, porém em estágios iniciais da doença, contribuindo, portanto, para selecionar àqueles que deverão ser submetidos ao esvaziamento linfonodal cervical.

Resultados semelhantes aos descritos acima foram obtidos por Dos Santos Almeida et al. (2013), que avaliaram a expressão de podoplanina e do fator de crescimento endotelial vascular do tipo C (VEGF-C), em 42 carcinomas espinocelulares de boca bem diferenciados. Quanto à expressão de VEGF-C, os autores não encontraram correlação com a metástase linfonodal. Em relação à podoplanina, notaram uma forte expressão da proteína na camada basal das áreas hiperplásicas, e nos tumores, foi observada intensamente na região periférica das ilhotas, principalmente em tumores iniciais, estádios I e II. Observaram ainda que, os pacientes com forte expressão de podoplanina possuíam uma maior frequência de recorrências regionais e locais, assim como infiltração perineural. Assim, os autores sugeriram que a forte expressão da podoplanina, associada com o envolvimento linfonodal, poderia ajudar a identificar os pacientes com câncer de boca que apresentavam um risco maior de evolução clínica desfavorável.

Considerando o papel da podoplanina na invasão e migração das células tumorais, Foschini e colaboradores (2013), avaliaram a expressão imuno-histoquímica de podoplanina e sua relação com a E-caderina, em biópsias incisionais de 102 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Este estudo baseia-se no fato de que a podoplanina poderia ativar a fosforilação de E-caderina, proteína esta responsável pelos processos de adesão celular e cuja baixa expressão é indicativa de metástase. Os resultados confirmaram que mediante a baixa expressão de E-caderina e alta expressão de podoplanina, os pacientes apresentavam um perfil de prognóstico ruim, tendo sido observado em 33 pacientes. Já o resultado inverso, ou seja, alta expressão de E-caderina e baixa de podoplanina, indicava um perfil de bom prognóstico. Além disso, a marcação forte de podoplanina também aumentou o risco de metástase, pois 77,8% dos pacientes que apresentaram metástase durante o período de acompanhamento tiveram uma forte expressão desta proteína. Os autores sugeriram uma relação entre a fraca expressão de e-caderina e forte de podoplanina, podendo-se utilizar esses marcadores para predizer a possibilidade de metástase em carcinomas espinocelulares de boca.

Mediante os estudos sobre a contribuição da podoplanina no prognóstico dos pacientes com CEC de boca, Seki et al. (2013) analisaram a expressão desta proteína e do Ki-67 em 82 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, na tentativa de criar um modelo que pudesse

ser utilizado para predizer o prognóstico nestes pacientes. De acordo com o grau de diferenciação histopatológica da UICC, os tumores foram divididos em carcinomas bem diferenciados (n=66), moderadamente diferenciados (n=10) e pobremente diferenciados (n=6). Utilizando a análise de regressão multivariada, os autores encontraram uma correlação entre a expressão de podoplanina (>50%) e estágios mais avançados dos tumores, neste caso, estágio III. A podoplanina foi correlacionada com a expressão de Ki-67, sugerindo uma associação da sua expressão com o crescimento e/ou progressão tumoral. De acordo com o grau de diferenciação dos tumores, naqueles bem diferenciados, com padrão de invasão compressivo, a expressão de podoplanina ficou restrita à camada basal sendo fraca na região central. Já nos tumores moderadamente e pobremente diferenciados, uma expressão mais uniforme e citoplasmática da proteína foi notada. Os autores concluíram que a expressão de podoplanina está relacionada com o estadiamento clínico dos tumores e com a expressão de Ki-67 e, ressaltaram que esta proteína encontra-se associada ao crescimento e à progressão dos carcinomas espinocelulares de boca.

A imunolocalização da podoplanina em lesões cancerizáveis e carcinomas espinocelulares de boca com diferentes graus de diferenciação histopatológica foi analisada por Inoue et al. (2012). Para este estudo, utilizaram 103 lesões cancerizáveis e 69 carcinomas espinocelulares de boca, sendo 32 destes, com metástase linfonodal. Observaram a expressão de podoplanina em 40,5% dos tumores bem diferenciados, em 60% dos tumores moderadamente diferenciados e em 91,7% dos tumores pobremente diferenciados. De acordo com os padrões de expressão da proteína analisados, notaram que com a maior diferenciação dos tumores, a expressão limitava-se à camada basal e tornava-se menor. Portanto, os autores sugeriram que a podoplanina está associada com o desenvolvimento dos carcinomas espinocelulares de boca e pode estar envolvida nas vias de sinalização que regulam o crescimento e a invasão tumoral.

Recentemente, Tsuneki et al. (2013) investigaram, mais especificamente, o papel da podoplanina na adesão celular, migração e proliferação, em linhagens de carcinomas ZK-1 espinocelulares de boca, por meio da imunofluorescência, western-blotting e real-time PCR. As propriedades de adesão das células ZK-1 foram significativamente inibidas pelo siRNA, segundo os autores, devido a uma interação da podoplanina com o CD44. Observou-se ainda, de forma contraditória aos estudos anteriores, uma menor expressão da proteína em tumores mais diferenciados e invasivos. Também não encontraram relação da proteína com as propriedades de migração e invasão das células. Os autores concluíram que a podoplanina contribui para a adesão das células tumorais à matriz extracelular através de sua relação com

CD44 e que não interfere diretamente na proliferação, invasão e migração, mas que estes podem ocorrer devido a um efeito secundário à adesão estabelecida.

Considerando a região de transição de pele e mucosa bucal, uma região de comportamento e evolução diferente dos demais tumores intrabuciais, Garcia et al. (2014) avaliaram a expressão membranosa e citoplasmática de podoplanina e ezrina, nas células neoplásicas de 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, provenientes de biópsias incisionais. Os resultados demonstraram uma forte expressão membranosa e citoplasmática de podoplanina pelas células periféricas dos tumores, sendo ausente na região central ($p < 0,001$). A expressão de ezrina, por sua vez, foi predominantemente citoplasmática ($p < 0,001$) e mais uniformemente distribuída nas células tumorais. Os autores comprovaram que a podoplanina e a ezrina são fortemente expressas pelas células malignas do câncer de lábio inferior e sugeriram que ambas as proteínas podem estar participando do processo de invasão tumoral do carcinoma espinocelular de lábio.

Portanto, com base nesta revisão de literatura, observa-se que o papel exato da podoplanina e sua participação nas diferentes vias de sinalização intracelulares das células no câncer de boca ainda não estão totalmente esclarecidos.

2.2 EXPRESSÃO DE EZRINA NO CÂNCER DE BOCA

A ezrina é um polipeptídeo, constituída por 585 aminoácidos e uma das proteínas pertencentes à família das proteínas ERM (ezrina, radixina e moesina). Estão associadas à conformação do citoesqueleto e atuam como moléculas chave para formação de domínios especializados de membrana, como as microvilosidades (LAN et al., 2006; ARPIN et al., 2011), lamelópodes e filópodes (BAUMGARTNER et al., 2006).

Dentre as funções da ezrina, sabe-se que ela participa na manutenção da forma e polaridade da célula, nos processos de adesão celular à matriz extracelular, nas interações célula-célula (através de complexos de adesão com E-caderina e integrinas) (PUJUGUET et al., 2003; JUNG; MCCARTY, 2012) e célula-substrato, assim como na movimentação celular, transdução de sinais e processo de apoptose mediado por célula (LOUVET-VALLÉE, 2000; ARPIN, et al. 2011, CLUCAS; VALDERRAMA, 2014).

Alguns estudos identificaram esta proteína como um componente crucial para a disseminação e metástase de alguns cânceres, como o osteossarcoma (YU et al., 2004) , o rabdomiossarcoma (KHANNA et al., 2004), além de outros tumores, como o câncer de

mama (MA et al., 2008) e o câncer de próstata (MUSIAL, 2007). Esses trabalhos nomearam a ezrina como um produto do gene *vil2* e ao realizarem a transfecção desse gene em linhagens de células com menor potencial metastático, observaram que as células aumentaram drasticamente suas propriedades e formaram lesões pulmonares, nos ensaios de metástase (YU et al., 2004; KHANNA et al., 2004; HUNTER, 2004).

Hunter et al. (2004) demonstraram que as células que contém, constitutivamente, a forma ativa da ezrina, acumulam E-caderina intracelularmente, resultando na perda dos contatos célula-célula. A perda de E-caderina ou a desregulação de sua função é um dos meios promotores da disseminação metastática (CANEL et al., 2013). Acredita-se que a função da ezrina como uma organizadora das junções de aderência para as comunicações célula-célula é potencialmente crucial para a metástase tumoral, pois a formação de junções célula-célula permite que as células tumorais sobrevivam mais tempo e que sinais de crescimento passem entre o tecido estromal e a célula metastática (HUNTER, 2004).

Em carcinomas espinocelulares de boca, poucos estudos foram encontrados sobre a expressão de ezrina pelas células malignas (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007; SCHLECHT et al., 2012; WU et al., 2013; SAITO et al., 2013; GARCIA et al., 2014).

Em 2006, Madan et al. investigaram, pela imuno-histoquímica, a expressão de ezrina, moesina e villina em 47 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. Nas células normais essas proteínas encontravam-se no citoplasma, em um estado inativo, e uma vez ativadas, os domínios de ligação conectavam essas proteínas de membrana à actina do citoesqueleto. Notaram ainda que, na mucosa normal, a expressão de ezrina está localizada, predominantemente, na camada espinhosa do epitélio, concentrando-se na membrana destas células. Nos carcinomas espinocelulares, a expressão de ezrina foi mais citoplasmática e focal, sendo negativa nas porções proliferativas, ou seja, na região periférica dos tumores. A moesina apresentou expressão citoplasmática concentrada nas camadas proliferativas dos tumores e a villina além de expressar-se no citoplasma das camadas proliferativas e periféricas dos tumores também foi expressa no núcleo. Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a expressão dessas proteínas com as variáveis clínico-patológicas. No entanto, o modelo de regressão proporcional de Cox encontrou associação entre a forte expressão citoplasmática de ezrina e a menor sobrevida ($p=0,004$), e de forma instigante, a expressão membranosa de ezrina foi associada a maior sobrevivência global dos pacientes. Dessa forma, os autores sugeriram que a ezrina pode ser um potente biomarcador para prever a sobrevivência em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

A expressão imuno-histoquímica de ezrina e outras proteínas supressoras de tumor (Maspin e nm 23-H1) foram analisadas em 120 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (83 de boca e orofaringe e 37 de hipofaringe e laringe) por Mhawech-Fauceglia et al.(2007). Os resultados obtidos mostraram que pacientes com forte expressão de ezrina possuíam uma menor sobrevivência livre de doença em relação aos que apresentaram baixa expressão da proteína. Baseados nestes resultados, os autores sugeriram que a ezrina poderia ser utilizada como um fator de prognóstico para as neoplasias de cabeça e pescoço.

Subsequentemente, em 2012, Schlecht et al. avaliaram a expressão imuno-histoquímica e a expressão gênica do RNA de ezrina, moesina, villina e merlina, em 131 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. Os resultados deste estudo mostraram uma expressão mais frequente de ezrina em pacientes jovens ($p=0,092$) e uma associação estatisticamente significativa entre a forte expressão citoplasmática de ezrina e a menor sobrevivência global em 5 anos destes pacientes ($p=0,004$). Em contraste, a expressão citoplasmática de merlina e villina não foi associada com a sobrevivência global e a progressão da doença. O padrão de expressão gênica nos carcinomas espinocelulares com forte ezrina citoplasmática revelou um fenótipo invasivo dessas células, com maior expressão dos genes que comandam a migração e a invasão celular. Além disso, observou-se que as células com esse padrão de expressão sobreviveram mais, devido à maior expressão de genes anti-apoptóticos. Assim, com base nos resultados, os autores ressaltaram a importância da expressão desta proteína como fator de prognóstico e como meio auxiliar para predizer o comportamento destes tumores, reforçando a necessidade de mais estudos multicêntricos para maior comprovação dos achados.

Em 2013, Wu et al. analisaram, *in vitro*, a expressão de ezrina, em linhagens de células tronco de carcinomas espinocelulares de boca, com e sem expressão de CD44. Além disso, para ativação da ezrina e indução do comportamento metastático nas células, moléculas de adesão se fizeram necessárias, como o CD44. Assim, uma maior expressão de CD44 poderia levar a uma maior ativação de ezrina e, portanto, a um maior potencial invasivo das células. Os resultados do estudo demonstraram que a ezrina está expressa predominantemente na membrana das células, sendo que sua expressão foi significativamente maior na população celular que expressava o CD44. Assim, os autores concluíram que uma maior expressão de ezrina pode afetar as funções das células que possuem o CD44 e contribuir para o comportamento metastático em carcinomas espinocelulares de boca.

A influência da ezrina na proliferação celular e, conseqüentemente, no crescimento, invasão e agressividade dos carcinomas espinocelulares de língua foi estudada por Saito et al.

(2013). Os autores analisaram a expressão imuno-histoquímica da ezrina em 79 espécimes (sendo 10 de tecido normal de língua e 69 carcinomas espinocelulares) e sua correlação com o índice de proliferação celular, determinado pelo Ki-67, e com o índice apoptótico. A expressão de ezrina pelas células neoplásicas foi classificada utilizando-se escores de intensidade e frequência, e o índice apoptótico também foi determinado. Na mucosa normal, os autores observaram a expressão de ezrina, predominantemente, na membrana e fracamente no citoplasma. Ao contrário, nos tumores foi observada tanto a expressão membranosa, quanto citoplasmática, sendo a citoplasmática extremamente mais elevada em comparação ao epitélio normal. Foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão da ezrina e o índice de proliferação celular determinado pelo Ki-67, sugerindo uma relação da proteína com a proliferação das células neoplásicas. Os autores observaram que nos pacientes que apresentavam metástase linfonodal e comportamento tumoral mais agressivo, havia uma forte expressão de ezrina, embora não tenha sido estatisticamente significativa em relação ao estadiamento TNM dos tumores. Ao bloquearem a sinalização de ezrina em linhagens de carcinoma espinocelular de língua, HSC-3, por meio das técnicas de bloqueio de RNA, imunofluorescência, *PCR* e *Western-blotting*, foi observado uma menor proliferação celular, redução das mitoses e interferência na progressão da célula no ciclo celular, além da redução da mobilidade das células tumorais, da invasão e inibição da formação de filópodes. A redução da expressão de ezrina também causou um aumento da E-caderina, molécula esta essencial na manutenção da adesão célula-célula. Os autores concluíram que a ezrina possui um importante papel no crescimento e invasão de carcinomas espinocelulares de língua, pode influenciar no seu comportamento agressivo e fenótipo maligno, além de sugerirem uma participação nos processos de transição epitélio-mesenquimal.

Os resultados acima descritos foram corroborados por Garcia et al. (2014) que detectaram uma forte positividade citoplasmática de ezrina no *front* de invasão tumoral da grande maioria dos tumores (91,6% dos carcinomas espinocelulares), especificamente localizados em lábio inferior. Além disso, observaram uma distribuição citoplasmática da proteína tanto no centro, quanto na periferia dos tumores, sendo que a expressão membranosa foi ausente em 62,5% destes carcinomas espinocelulares. Os autores concluíram que a forte expressão citoplasmática de ezrina, de forma independente ou associada a outras proteínas, está relacionada com a sua participação no desenvolvimento e progressão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

Esta revisão de literatura mostra que a ezrina parece estar implicada nos processos de crescimento e invasão dos carcinomas espinocelulares de boca, porém os conhecimentos

ainda são escassos sobre sua participação específica no processo de disseminação destes tumores.

2.3 PROTEÍNA RHO-A NO CÂNCER

A família Rho-GTPases, também conhecida como homólogo RAS, faz parte das proteínas G (guanina) de baixo peso molecular e desempenham diversas funções. A ativação de Rho decorre em uma cascata de sinais, pela estimulação de receptores de superfície, que regulam a transcrição de genes, a transdução de sinais intracelulares e a reorganização do citoesqueleto, processos esses que afetam o crescimento, a diferenciação, a adesão e a migração das células (ELLENBROEK; COLLARD, 2007).

Estruturalmente, as proteínas Rho consistem em um domínio GTPase e em uma extensão terminal C. Fazem parte da família Rho: Rho-A, que regula a contratilidade dos filamentos de actomiosina na célula, Rho-B, comanda a sinalização intracelular e regula a sobrevivência da célula e Rho-C que participa da migração celular (PARRI; CHIARUGI, 2010).

A alta expressão de Rho foi relatada em alguns tipos de cânceres, como carcinomas de mama (KLEER, 2000), de pulmão (FRITZ, 1999), de cólon e células germinais de testículo (KAMAI et al., 2001), e de ovário (HORIUCHI et al., 2008), e relacionada com a progressão tumoral e disseminação metastática. Esperava-se que alguma mutação na ativação das proteínas Rho seria responsável pela iniciação e progressão do tumor, visto os diversos papéis da Rho na polarização, migração, proliferação e sobrevivência das células. No entanto, os estudos até o momento não encontraram nenhuma mutação neste gene desta proteína (ELLENBROEK; COLLARD, 2007; PARRI; CHIARUGI, 2010).

Dessa forma, as pesquisas passaram a verificar se a desregulação na sinalização de Rho GTPase poderia ocorrer pela expressão ou ativação de seus reguladores efetores (ELLENBROEK; COLLARD, 2007; SCHUBBERT, 2007; PARRI; CHIARUGI, 2010). Os diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, (FRITZ et al., 1999; ABRAHAM et al., 2001; FRITZ et al., 2002; KAMAI et al., 2004) utilizando linhagens de células tumorais e analisando o desenvolvimento e progressão do câncer, indicam que uma desregulação na sinalização da cascata das Rho GTPases possui um papel importante na iniciação e progressão do câncer (ELLENBROEK; COLLARD, 2007).

Em específico para a proteína Rho-A, seu papel está implicado na manutenção da polaridade celular, na junção das células e na geração de uma força de contração, responsável por movimentar o corpo e a cauda da célula para trás (SAHAI et al., 2002; MARJORAM 2014). O aumento da expressão de Rho-A foi relatado em câncer de pulmão, de mama, de cólon (FRITZ et al., 2002), de testículo (KAMAI et al., 2004) e de cabeça e pescoço (ABRAHAM et al., 2001). Esses estudos, realizados *in vitro*, mostraram que como uma consequência do aumento da expressão de Rho-A, ocorre uma transposição da molécula para a membrana plasmática, onde pode ser ativada e promover a invasão, por meio da sinalização de quinases efetoras nos filamentos de actomiosina.

A interação de Rho-A com as proteínas ERM foi explicada, recentemente, por Chiappetta et al. (2014). De acordo com os autores, as moléculas inibidoras da expressão de Rho (RHO GDI) podem se ligar ao domínio NH2 terminal das proteínas ERM. Essa interação leva à ativação de membros da família Rho. Portanto, ezrina, radixina e moesina possuem um papel importante na ativação de Rho, ao recrutarem seus reguladores inibitórios.

Hunter et al. (2004), observaram que o aumento da expressão de ezrina poderia resultar na amplificação dos sinais associados à metástase por meio das vias de transdução de sinais associadas à Rho, conforme demonstrado em células de melanoma (CLARK, et al., 1998) e câncer de fígado (GILDEA, et al., 2002). Em rabdomiossarcomas, os autores observaram que a expressão de Rho-A associada aos níveis de ezrina ocorre por meio de um domínio negativo da expressão da Rho-A, que levou à redução significativa da capacidade metastática das células. Essas observações sugeriram que a desregulação da sinalização da cascata mediada pela Rho pode ser crucial para a disseminação tumoral, amplificando os sinais pro-metastáticos (HUNTER et al., 2004).

A ligação das proteínas ERM à porção citoplasmática da podoplanina, mediante uma sobreexpressão da proteína Rho-A, em células renais foi verificada por Martin-Villar (2006) e sugeriram que a ligação entre podoplanina e ezrina, mediante o aumento de Rho-A poderia ser a responsável pela transição epitélio-mesenquimal e maior capacidade de migração e invasão celular.

Ma et al. (2013) estudaram a expressão de ezrina e Rho-A no desenvolvimento e progressão tumoral, em células neoplásicas de mama. Através de estímulo com EGF, os pesquisadores observaram que aumentou a fosforilação de Rho-A, em um curto período de tempo, o que levou a maior expressão de ezrina. Ao inibirem a fosforilação da Rho-A, puderam suprimir a expressão de ezrina. Os autores concluíram que a inibição da fosforilação

da Rho-A pode ser um meio efetivo no tratamento de pacientes com câncer de mama. No entanto, o mecanismo em que a Rho-A aumenta a expressão de ezrina ainda não é conhecido.

Halon et al. (2013) analisaram a expressão imuno-histoquímica de Rho-A e as proteínas do complexo ERM, em células tumorais de mama, com comprometimento linfonodal. O objetivo desse estudo foi verificar se a expressão sub-celular dessas proteínas possuía relação com as variáveis clínico-patológicas. Os resultados mostraram que a expressão mais fraca de Rho-A, no citoplasma, está associada à presença de metástases linfonodais ($p=0,011$), assim como a expressão forte nuclear de ezrina ($p=0,004$). Os autores concluíram que a expressão imuno-histoquímica de ezrina e Rho-A pode ajudar a prever a metástase linfonodal em pacientes com câncer de mama.

Em relação aos carcinomas da região de cabeça e pescoço, apenas Abraham et al. (2001) observaram a expressão imuno-histoquímica de Rho-A, Rac 2, Cdc 42, PI (3)K, 2E4 e Arp2 em linhagens de celulares, de queratinócitos epidérmicos (NHEK), de lesões displásicas (MSK Leuk 1 cell line) e de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (1483 cell line). Os autores observaram que a expressão de Rho-A e Rac 2 aumentava progressivamente nas lesões displásicas e no carcinoma espinocelular. Em peças cirúrgicas de carcinoma espinocelular de língua, observaram uma expressão predominantemente citoplasmática de Rho-A e no tecido normal desta mesma peça, a expressão ausente da proteína. Os autores confirmaram um papel de Rho-A e Rac 2 na movimentação das células, durante a transformação neoplásica do tumor.

Assim, observamos através desta revisão de literatura que a inter-relação das proteínas pode influenciar na progressão tumoral, sendo que a atuação conjunta ou isolada dessas proteínas, deve ser melhor analisada, de forma a se identificar o real papel de cada uma delas nesses tecidos, assim como seus mecanismos de ativação.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de carcinomas espinocelulares de lábio inferior, com estadiamento I, II, III e IV, propôs-se:

1. investigar a expressão da podoplanina, ezrina e Rho-A, pelas células epiteliais neoplásicas, no *front* de invasão tumoral,
2. verificar se existe correlação entre a expressão da podoplanina, da ezrina e da Rho-A na região do *front* de invasão tumoral;
3. analisar a associação da imunomarcagem destas proteínas com as variáveis clínico-patológicas e com a evolução dos pacientes;
4. contribuir com o conhecimento do papel da podoplanina, ezrina e Rho-A no processo de invasão e metástase tumoral, verificando se estas proteínas influenciam o prognóstico dos pacientes com câncer de lábio.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi constituída por 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, com estádios clínicos I, II, III e IV, submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2009. Todos os prontuários de pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de lábio inferior foram analisados.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados:

- pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de lábio inferior, confirmado por exame anatomopatológico;
- ausência de tratamento prévio a cirurgia;
- tumores com estadiamento clínico I, II, III e IV;
- ausência de outros tumores primários simultâneos;
- seguimento clínico completo;
- fragmentos tumorais suficientes para análise imuno-histoquímica;
- disponibilidade dos blocos de parafina contendo os tumores, assim como adequada conservação dos espécimes.

4.2 REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações referentes aos pacientes foram obtidas a partir do banco de dados pertencente ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo e registradas em formulário próprio (ANEXO A). Estes registros incluíram a identificação e os dados demográficos dos pacientes, informações relativas à história clínica, exame loco-regional, cirurgia, radioterapia pós-operatória, quimioterapia, microscopia da peça cirúrgica inicial, e evolução do paciente (ocorrência ou não de recidiva local, cervical, metástase à distância e segundo tumor primário). No caso de pacientes vivos, a evolução clínica desses pacientes foi atualizada até o ano de 2014, por meio de consulta aos prontuários do SAME.

Realizou-se a análise morfológica qualitativa dos espécimes selecionados, em cortes de 3µm de espessura, obtidas a partir de peças cirúrgicas incluídas em parafina dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Estes cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.), seguindo os padrões histotécnicos do Laboratório de Anatomia Patológica deste hospital.

A confirmação do padrão tumoral com base na morfologia dos tumores foi realizada individualmente pelos pesquisadores (A.A. e D.T.O.), utilizando-se um microscópio óptico binocular, modelo Axiokop 2 Plus (ZEISS, Jena, Alemanha), sendo os pontos de discordância reavaliados e estabelecidos por consenso. Selecionou-se um corte representativo do tumor primário de cada espécime, analisando-se todo fragmento neoplásico presente na lâmina, para a determinação das características microscópicas do padrão tumoral.

4.3 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis de estudos analisadas neste trabalho referem-se aos dados demográficos relativos ao paciente, como idade, gênero (masculino ou feminino) e cor (branca ou não branca).

Quanto à história clínica do paciente, avaliou-se o tempo de história (meses); vícios como o tabagismo (fumante ou não fumante) e o etilismo (etilista ou não etilista).

No exame loco-regional, as lesões foram avaliadas quanto ao tipo de lesão (1-úlceros vegetantes, 2-úlceros infiltrativos, 3-outros) e ao diâmetro aproximado da lesão, em centímetros.

A classificação clínica adotada pelo Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo segue o sistema TNM/UICC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) e, os pacientes foram classificados de acordo com seu estágio clínico em I (T1N0M0), II (T2N0M0), III (T3N0M0, T1N+M0, T2N+M0, T3N+M0) e IV (T4N0M0, T4N+M0, T1/T2/T3/T4, qualquer NM1).

Quanto ao tratamento registrou-se a data da cirurgia, a realização ou não de esvaziamento cervical (ipsilateral ou ipsilateral e contralateral simultâneos), a data da alta hospitalar, bem como se foi necessário radioterapia pós-operatória.

O diagnóstico do tumor primário, referente ao laudo anatomopatológico (CEC I, CEC II, CEC III ou CEC SOE- sem outra especificação), serviu de base para a análise microscópica da peça cirúrgica.

A embolização vascular, infiltração perineural e infiltração muscular foram classificadas como ausentes, presentes ou desconhecidos.

Informações sobre as margens cirúrgicas (0-livres, 1-presentes, 2-comprometidas, 9-desconhecido) e o número de linfonodos dissecados e comprometidos foram obtidos a partir do laudo anatomopatológico da peça cirúrgica inicial. O comprometimento linfonodal cervical histopatológico (pN) foi registrado como negativo (pN0) ou positivo (pN+).

Quanto à evolução dos pacientes, registrou-se a ocorrência ou não de recidiva local, de metástase regional, de metástase à distância e de segundo tumor primário.

Com objetivo de caracterização da amostra, registrou-se também a data da primeira recidiva, os locais de recidiva (0 – não teve, 1- local, 2- pescoço ipsilateral, 3-pescoço contralateral, 4-pulmão, 5- osso, 6-fígado, 7-outra distância ou 8 – recidiva em local ignorado), assim como a data e o local do diagnóstico do segundo tumor primário.

Além disso, foi registrada a última informação do seguimento e a situação do paciente: 1-vivo sem evidência de doença (000), 2- vivo com câncer, 3- morte por intercorrência cirúrgica (MOCI), 4- morte decorrente do câncer (MOCA); 5-morte por outras causas não relacionadas ao câncer (MOASS) e 6- perdido de vista. Pacientes perdidos de vista foram considerados aqueles com menos de cinco anos de seguimento. Pacientes assintomáticos perdidos de vista após cinco anos foram classificados como vivos livres de doença.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.4.1 Graduação da malignidade tumoral

A análise microscópica da graduação da malignidade tumoral foi realizada por dois examinadores (A.A. e D.T.O.), sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um corte tumoral corado em Hematoxilina e Eosina, analisado em um microscópio óptico binocular, contendo uma objetiva de 40x. Foi utilizado o índice de malignidade proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005), descrito em detalhes na Tabela 1.

Este índice baseia-se na análise multifatorial das características morfológicas apresentadas pelas células malignas no *front* de invasão tumoral, sendo analisados: padrão de invasão, graduação do infiltrado inflamatório linfocitário e invasão perineural. Cada característica mencionada foi avaliada e classificada de acordo com o padrão apresentado, recebendo pontuações de 0 a 3.

As pontuações individuais para cada característica foram somadas, determinando um índice total de malignidade tumoral, sendo os tumores classificados com base no risco de recorrência local e de diminuição da sobrevivência global em: escore final 0 foram classificados como sendo de baixo risco, aqueles com escore final 1 ou 2 como risco intermediário, e por fim, aqueles com escore final ≥ 3 , classificados como de alto risco.

Tabela 1 - Graduação da malignidade tumoral, de acordo com as características morfológicas e seus respectivos scores, proposto por Brandwein-Gensler et al.(2005).

PARÂMETROS MORFOLÓGICOS	DEFINIÇÃO	ESCORE
<i>Padrão de invasão</i>		
Tipo 1	Compressão em borda	0
Tipo 1	Projeções digitiformes	0
Tipo 1	Grandes ilhotas separadas (>15 células/ilhota)	0
Tipo 2	Pequenas ilhotas tumorais (≤ 15 células/ilhota)	1
Tipo 3	Tumores satélites, ≥ 1 mm distante do tumor principal	3
<i>Infiltrado Inflamatório</i>		
Tipo 1	Denso tecido linfocitário na interface tumor/hospedeiro	0
Tipo 2	Resposta intermediária (placas descontínuas de tecido linfocitário na interface tumor/hospedeiro)	1
Tipo 3	Pequena/nenhuma resposta do hospedeiro (pouca ou ausente placas de tecido linfocitário)	3
<i>Invasão Perineural</i>		
Nenhuma	Nenhuma	0
Pequenos nervos	Tumor ao redor dos nervos com <1 mm de diâmetro	1
Grandes nervos	Tumor ao redor dos nervos com ≥ 1 mm de diâmetro	3

4.4.2 Técnica imuno-histoquímica

Para evidenciar a expressão da podoplanina, da ezrina e da Rho-A, foram realizadas reações imuno-histoquímicas nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior incluídos em blocos de parafina. As marcações imuno-histoquímicas seguiram o protocolo de reações utilizados no Setor de Imuno-histoquímica do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, São Paulo, SP, previamente padronizadas para cada anticorpo primário (Tabela 2).

4.4.3 Avaliação imuno-histoquímica

Para a avaliação imuno-histoquímica da expressão da podoplanina, da ezrina e da Rho-A no *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, foi utilizado um sistema computadorizado de captura de imagens obtendo-se fotomicrografias com o auxílio de uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha), acoplada a um microscópio binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha), contendo uma objetiva de 40x. A câmera digital, conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviava as imagens para um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.9 ZEISS, Jena, Alemanha).

A expressão imuno-histoquímica da podoplanina, da ezrina e da Rho-A pelas células malignas foi avaliada por um método semi-quantitativo de escores, baseado na soma da proporção e da intensidade das células com imunomarcação positiva, conforme previamente descrito por Faustino et al. (2008).

Para cada campo microscópico capturado no *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, a porcentagem de células com imunomarcação positiva foi obtida e classificada de acordo com os escores a seguir:

- 0= ausência de células imunopositivas;
- 1= menos de 25% de células imunopositivas;
- 2= entre 26 e 50% de células imunopositivas;
- 3= entre 51 e 75% de células imunopositivas;
- 4= mais de 75% de células imunopositivas.

A intensidade da imunomarcção de cada anticorpo primário em cada campo microscópico capturado também foi quantificada de acordo com os escores abaixo:

0= ausência de imunomarcção;

1= imunomarcção fraca;

2= imunomarcção moderada;

3= imunomarcção forte;

4= imunomarcção intensa.

A soma dos escores da proporção e da intensidade das células malignas com imunomarcção positiva para os diferentes anticorpos analisados foi obtida e classificada em três grupos:

0 (escore 0) = ausência de imunomarcção;

1 (escore 1 a 5) = imunomarcção fraca;

2 (escore 6 a 8) = imunomarcção forte.

Tabela 2 – Protocolo de reações imuno-histoquímicas realizado no presente estudo.

	ODOPLANINA	EZRINA	RHO-A
Recuperação Antigênica	<ul style="list-style-type: none"> Solução tampão Tris – EDTA pH 9,0 Panela de pressão convencional: 3min 30seg 	<ul style="list-style-type: none"> Solução tampão citrato a 10mM e pH 6,0 Panela de pressão em inox: 3 min 	<ul style="list-style-type: none"> Solução tampão citrato a 10mM e pH 6,0 Panela de pressão em inox: 3 min
Bloqueio da peroxidase endógena	<ul style="list-style-type: none"> H2O2 a 3% 4 trocas de 5 min 	<ul style="list-style-type: none"> H2O2 a 3% 4 trocas de 5 min 	<ul style="list-style-type: none"> H2O2 a 3% 4 trocas de 5 min
Anticorpos primários	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo anti-podoplanina (clone D2-40, Dako, M3619, Glostrup, Dinamarca) Diluição: 1:200 Incubação: 18h a 4°C em câmara úmida 	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo anti-ezrina (clone 3C12, Thermo Scientific, MS-661, Fremont, CA, EUA) Diluição: 1:1000 Incubação: 18h a 4°C em câmara úmida 	<ul style="list-style-type: none"> Anticorpo anti-Rho-A (clone 1C1, Abcam, ab124287, Cambridge, MA, EUA) Diluição: 1:100 Incubação: 18h a 4°C em câmara úmida
Sistema de detecção	<ul style="list-style-type: none"> <i>Post Primary Block</i> (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7260-k, Newcastle, Reino Unido) Incubação: 30min a 37°C <i>Novolink Polymer</i> (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7260-k, Newcastle, Reino Unido) Incubação: 30min a 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Post Primary Block</i> (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7260-k, Newcastle, Reino Unido) Incubação: 30min a 37°C <i>Novolink Polymer</i> (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7260-k, Newcastle, Reino Unido) Incubação: 30min a 37°C 	<ul style="list-style-type: none"> <i>Post Primary Block</i> (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7260-k, Newcastle, Reino Unido) Incubação: 30min a 37°C <i>Novolink Polymer</i> (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7260-k, Newcastle, Reino Unido) Incubação: 30min a 37°C
Revelação do complexo Ag/Ac	<ul style="list-style-type: none"> Solução substrato: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA) 1 mL de Di-metil-sulfóxido (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) 1 mL de H2O2 a 6% 100 mL de PBS 	<ul style="list-style-type: none"> Solução substrato: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA) 1 mL de Di-metil-sulfóxido (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) 1 mL de H2O2 a 6% 100 mL de PBS 	<ul style="list-style-type: none"> Solução substrato: 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, St Louis, MO, EUA) 1 mL de Di-metil-sulfóxido (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA) 1 mL de H2O2 a 6% 100 mL de PBS

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação da expressão imuno-histoquímica da podoplanina, da ezrina e da Rho-A pelas células neoplásicas, com as variáveis demográficas clínicas e microscópicas foi avaliada pelo teste qui-quadrado (χ^2) ou o teste exato de Fisher.

A correlação entre as expressões de podoplanina, ezrina e Rho-A nos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi feita pelo teste de correlação de Spearman.

A análise de sobrevivência global, acumuladas em 5 e 10 anos, foi realizada pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier, sendo a comparação entre a curva de sobrevida analisada pelo teste *log-rank*.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SPSS for Windows versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) e o nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi adotado para todos os testes.

4.6 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do software de aquisição e análise de imagens Axiovision 4.9, ZEISS.

4.7 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo em reunião do dia 10 de março 2014, sob o nº 555.531 – CAAE 01594912.2.0000.5417 (Anexo B).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Após o levantamento dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos a tratamento junto ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1970 a 2009, foram aplicados os critérios de inclusão e selecionados 91 pacientes para realização deste estudo.

A análise dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior revelou uma maior frequência de ocorrência em pacientes do gênero masculino (82,4%), sendo que 100% desta amostra foi constituída por pacientes da raça branca.

As idades, no momento do diagnóstico do câncer de lábio, variaram de 23 a 93 anos, sendo que a maioria (48,9%) apresentava-se distribuída na faixa entre 45 e 70 anos (Tabela 3).

Em relação à presença de vícios como o tabaco e álcool, a grande maioria dos pacientes com câncer de lábio (81,3%) era tabagista, enquanto que para o etilismo, houve uma distribuição entre 53,8% etilistas e 46,2% não etilistas, conforme ilustrado na Tabela 3.

De acordo com o estadiamento clínico dos tumores, avaliado no momento do exame clínico, observou-se que 42,2% foram classificados como T1; 37,5% como T2, 12,5% como T3 e 7,8% como T4, conforme os critérios de estadiamento clínico TNM, definidos pela UICC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Com relação ao comprometimento linfonodal clinicamente determinado, 79,4% dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior não apresentaram linfonodos regionais palpáveis durante o exame físico (N0) e somente 20,6% possuíam comprometimento linfonodal (N+), como pode ser verificado na Tabela 3.

Um total de 21 pacientes com câncer de lábio (23,9%) foi submetido à radioterapia pós-operatória, sendo que desses, oito eram N0, clinicamente (Tabela 3).

A presença de recidiva locorregional foi detectada em 26,4% dos pacientes, sendo 19 recidivas locais, 4 recidivas regionais e uma recidiva em outro local não especificado. A ocorrência de um segundo tumor primário foi detectada em 14,3% dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		Nº de pacientes	%
Gênero	Masculino	75	82,4
	Feminino	16	17,6
Idade*	≤ 45 anos	24	26,7
	>45 e ≤ 70 anos	44	48,9
	>70 anos	22	24,4
Tabagismo*	Sim	65	81,3
	Não	15	18,8
Etilismo*	Sim	42	53,8
	Não	36	46,2
Estadiamento T*	T1	27	42,2
	T2	24	37,5
	T3	8	12,5
	T4	5	7,8
Estadiamento N*	N0	54	79,4
	N+	14	20,6
Radioterapia*	Sim	21	23,9
	Não	67	76,1
Recidiva	Sim	24	26,4
	Não	67	73,6
Segundo Tumor	Sim	13	14,3
	Não	78	85,7
TOTAL		91	100

*Excluídos pacientes com informação ignorada

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

De acordo com as informações presentes nos laudos histopatológicos dos prontuários dos pacientes com câncer de lábio inferior, foram avaliadas a embolização vascular, as infiltrações perineural, muscular e glandular, as margens cirúrgicas e o comprometimento linfonodal histopatológico (pN).

Como pode ser observado na Tabela 4, após a análise dos laudos histopatológicos, verificou-se que as infiltrações perineural, muscular e glandular estavam presentes em 32,4%, 31,8% e 4,7% dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, respectivamente. A embolização linfática estava presente em 9 (28,2%) pacientes. Em apenas 2 pacientes as margens cirúrgicas encontravam-se comprometidas nos pacientes com câncer de lábio inferior (Tabela 4).

O comprometimento linfonodal histopatológico (pN+) foi positivo em 15 pacientes (16,5%) dos 27 pacientes com câncer de lábio que foram submetidos ao esvaziamento cervical. Desses, 15 pacientes foram submetidos ao esvaziamento ipsilateral e contralateral simultâneo, 11 somente ao esvaziamento cervical ipsilateral e um ao esvaziamento cervical contralateral. A maioria dos pacientes com câncer de lábio (70,3%) não foi submetida ao esvaziamento cervical (Tabela 4). Após a análise histopatológica (pN), obteve-se o estadiamento clínico dos 64 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, sendo 27 pacientes com estadiamento clínico I (T1N0M0), 18 com estadiamento clínico II (T2N0M0), 14 com estadiamento clínico III (T3N0M0; T1,T2,T3N+M0) e 5 com estadiamento clínico IV (T4N0M0; T4N+M0).

5.2.1 Graduação de Malignidade Tumoral

A graduação de malignidade tumoral foi realizada por meio da avaliação de risco histológico de recidiva local e de diminuição da sobrevivência global, de acordo com os parâmetros propostos por Brandwein-Gensler et al. (2005). Para esta avaliação três aspectos principais foram observados na região do *front* de invasão tumoral: o padrão de invasão, a graduação do infiltrado inflamatório e a presença da invasão perineural (Figura 1).

Os parâmetros analisados para graduação da malignidade foram quantificados em escores que variaram de 0 a 3, conforme ilustrado na Tabela 5.

De acordo com o padrão de invasão, 85,7% dos tumores foram classificados como sendo do tipo 1, 12,1% como do tipo 2 e 2,2% como do tipo 3 (Tabela 5). O infiltrado inflamatório, em sua maioria, foi intenso, ou seja, do tipo 1 (71,5%), seguidos por tipo 2 (23,1%) e tipo 3 (5,5%). Em relação a presença de invasão perineural, 76,9% dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior não apresentavam invasão de nervos e os 23,1% que apresentaram invasão perineural, foram classificados como pequenos nervos (Tabela 5).

O risco para recidiva local e diminuição da sobrevida global, com base nos critérios descritos acima e estabelecidos por Brandwein-Gensler et al. (2005), está ilustrado na Tabela 6. Dez pacientes (11% da amostra) foram classificados como de alto risco, 46,1% de risco intermediário e 42,9% de baixo risco.

Tabela 4 – Distribuição dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as variáveis microscópicas analisadas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		N	%
Embolização Vascular*	Presente	9	28,2
	Ausente	23	71,8
Infiltração perineural*	Presente	11	32,4
	Ausente	23	67,6
Infiltração muscular*	Presente	7	31,8
	Ausente	15	68,2
Infiltração glandular*	Presente	1	4,7
	Ausente	20	95,3
Margens cirúrgicas*	Livres	85	97,3
	Comprometidas	2	2,3
	N+	15	16,5
pN	N0	12	13,2
	Não esvaziados	64	70,3
TOTAL		91	100

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior.

Tabela 5 – Graduação de malignidade dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior proposta por Brandwein-Gensler et al (2005). Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Características				
Escores de Malignidade			N	%
Morfológicas				
Padrão de invasão	Tipo 1	0	78	85,7
	Tipo 2	1	11	12,1
	Tipo 3	3	2	2,2
Infiltrado Inflamatório	Tipo 1	0	65	71,5
	Tipo 2	1	21	23,1
	Tipo 3	3	5	5,5
Invasão Perineural	Nenhuma	0	70	76,9
	Pequenos nervos	1	21	23,1
	Grandes nervos	3	0	0
TOTAL			91	100

N: Número de carcinomas espinocelulares de lábio inferior

Tabela 6 – Distribuição da avaliação de risco histológico para recidiva local e diminuição da sobrevivência global dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Risco Histológico	N	%
<i>Baixo Risco</i>	39	42,9
<i>Risco Intermediário</i>	42	46,1
<i>Alto Risco</i>	10	11,0
TOTAL	91	100

N: Número de carcinomas espinocelulares de lábio inferior

Figura 1 – Padrão de invasão tumoral em carcinoma espinocelular de lábio inferior. Em A, padrão de invasão tumoral em borda compressiva. Em B, padrão de invasão de ilhotas neoplásicas largas e em C, de pequenas ilhotas tumorais. Em D e E invasão tumoral perineural de pequenos nervos. Em F, invasão muscular do carcinoma espinocelular de lábio inferior. (A, IHQ 10X; B, IHQ 20X; C, IHQ 20X; D, IHQ 20X; E, IHQ 40X; F, IHQ 40X).

5.2.2 Expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior

A expressão de podoplanina foi analisada na membrana e no citoplasma das células localizadas na região do *front* de invasão tumoral dos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Observou-se um padrão de expressão da proteína predominantemente forte, tanto na membrana, quanto no citoplasma (Figura 2).

Em 56 (61,5%) tumores houve uma forte expressão da proteína na membrana, sendo fraca ou ausente em 35 (38,5%) tumores (Figura 2). Uma expressão citoplasmática forte de podoplanina foi detectada em 55 (60,44%) carcinomas espinocelulares de lábio inferior, sendo esta expressão fraca ou ausente em 36 (39,6%) tumores. Ressalta-se que na região central das ilhotas tumorais, bem como nas pérolas córneas, não houve expressão membranosa ou citoplasmática de podoplanina (Figura 2).

As expressões fraca e ausente da podoplanina pelas células neoplásicas foram agrupadas para fins estatísticos.

A associação da expressão da podoplanina com as características clínicas, demográficas e microscópicas, pode ser analisada nas Tabelas 7, 8, 9 e 10.

Não houve associação da expressão membranosa da podoplanina com o gênero, a idade, o tabagismo, o etilismo, o estadiamento clínico T e N, a radioterapia e a recidiva locorregional (Tabela 7). Entretanto, a expressão citoplasmática da podoplanina foi significativamente associada com o etilismo ($p=0,024$) e com a recidiva locorregional ($p=0,028$), como ilustrado na Tabela 8.

De acordo com os vícios do tabaco e álcool, a maioria dos pacientes era tabagista e apresentou uma forte expressão da proteína na membrana e no citoplasma. Quanto ao etilismo a forte expressão citoplasmática de podoplanina foi encontrada com maior frequência nos tumores dos pacientes não etilistas, conforme descrito na Tabela 8.

Destaca-se ainda que a maioria dos pacientes que apresentou recidiva locorregional possuía uma expressão fraca/ausente de podoplanina na membrana e no citoplasma das células neoplásicas se comparado àqueles que não tiveram recidiva da doença (Tabelas 7 e 8). Em relação ao estadiamento clínico, tratamento e evolução desses pacientes, observou-se, porém sem associação estatisticamente significativa, em relação ao tamanho do tumor, que a expressão membranosa forte de podoplanina foi observada na maioria dos tumores T1 (47,5%) e a expressão citoplasmática forte da proteína dos tumores T2 (44,4%). Em relação

ao estadiamento N, a maioria dos tumores com forte expressão de podoplanina, tanto na membrana, quanto no citoplasma, foi classificado como N0 (Tabelas 7 e 8).

Segundo as características microscópicas analisadas, a maioria dos pacientes que não apresentaram embolização vascular, infiltração perineural, infiltração muscular e infiltração glandular, possuía uma forte expressão de podoplanina membranosa ou citoplasmática nas células malignas. Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão da podoplanina (membranosa ou citoplasmática) com as características microscópicas acima descritas (Tabelas 9 e 10).

Em relação ao comprometimento linfonodal cervical determinado pela análise histopatológica (pN), não foi encontrada associação estatisticamente significativa com a expressão de podoplanina na membrana. No entanto, quanto à expressão de podoplanina citoplasmática houve uma associação estatisticamente significativa ($p=0,010$) com o comprometimento linfonodal, ou seja, todos os pacientes com câncer de lábio inferior e pN+ apresentavam uma forte expressão da proteína, conforme descrito na Tabela 10.

Tabela 7 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina membranosa no *front* de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		PODOPLANINA MEMBRANOSA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Gênero	Masculino	29	82,9	46	82,1	0,931
	Feminino	6	17,1	10	17,9	
Idade*	≤ 45 anos	8	23,5	16	28,6	0,174
	>45 e ≤ 70	14	41,2	30	53,6	
	>70 anos	12	35,3	10	17,9	
Tabagismo*	Sim	22	73,3	43	86,0	0,160
	Não	8	26,7	7	14,0	
Etilismo*	Sim	15	51,7	27	55,1	0,772
	Não	14	48,3	22	44,9	
Estadiamento T*	T1	8	33,3	19	47,5	0,489
	T2	11	45,8	13	32,5	
	T3/T4	5	20,8	8	20,0	
Estadiamento N*	N0	22	88,0	32	74,4	0,182
	N+	3	12,0	11	25,6	
Radioterapia*	Sim	8	22,9	13	24,5	0,857
	Não	27	77,1	40	75,5	
Recidiva	Sim	13	37,1	11	19,6	0,065
	Não	22	62,9	45	80,4	
TOTAL		35	100	56	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior.
p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 8 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina citoplasmática no *front* de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável	PODOPLANINA CITOPLASMÁTICA					p
		Frac		Forte		
		N	%	N	%	
Gênero	Masculino	30	83,3	45	81,8	0,853
	Feminino	6	16,7	10	18,2	
Idade*	≤ 45 anos	10	28,6	14	25,5	0,342
	>45 e ≤ 70	14	40,0	30	54,5	
	>70 anos	11	31,4	11	20,0	
Tabagismo*	Sim	24	80,0	41	82,0	0,824
	Não	6	20,0	9	18,0	
Etilismo*	Sim	21	70,0	21	43,8	0,024
	Não	9	30,0	27	56,3	
Estadiamento T*	T1	13	46,4	14	38,9	0,405
	T2	8	28,6	16	44,4	
	T3/T4	7	25,0	6	16,7	
Estadiamento N*	N0	24	77,4	30	81,1	0,710
	N+	7	22,6	7	18,9	
Radioterapia*	Sim	10	28,6	11	20,8	0,400
	Não	25	71,4	42	79,2	
Recidiva	Sim	14	38,9	10	18,2	0,028
	Não	22	61,1	45	81,8	
TOTAL		36	100	55	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior; p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 9– Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina no *front* de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		PODOPLANINA MEMBRANOSA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Embolização Vascular*	Sim	2	22,2	7	30,4	0,642
	Não	7	77,8	16	69,6	
Infiltração Perineural*	Sim	3	30,0	8	33,3	0,850
	Não	7	70,0	16	66,7	
Infiltração Muscular*	Sim	2	40,0	5	29,4	0,999
	Não	3	60,0	12	70,6	
Infiltração Glandular*	Sim	0	0	1	5,9	0,619
	Não	4	100	16	94,1	
pN**	pN0	5	50,0	7	41,2	0,706
	pN+	5	50,0	10	58,8	
TOTAL		35	100	56	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior,

**Excluídos os pacientes não submetidos ao esvaziamento linfonodal;

p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 10 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de podoplanina no *front* de invasão dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		PODOPLANINA CITOPASMÁTICA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Embolização Vascular*	Sim	5	38,5	4	21,1	0,282
	Não	8	61,5	15	78,9	
Infiltração Perineural*	Sim	4	30,8	7	33,3	0,877
	Não	9	69,2	14	66,7	
Infiltração Muscular*	Sim	2	28,6	5	33,3	0,999
	Não	5	71,4	10	66,7	
Infiltração Glandular*	Sim	0	0	1	7,1	0,999
	Não	7	100	13	92,9	
pN**	pN0	5	100	7	31,8	0,010
	pN+	0	0	15	68,2	
TOTAL		36	100	55	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior;

**Excluídos os pacientes não submetidos ao esvaziamento linfonodal;

p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Figura 2 – Imunoexpressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B, padrão de expressão forte na membrana e no citoplasma das células do *front* de invasão tumoral. Em C e D detalhe da expressão membranosa de podoplanina nas células periféricas das ilhotas tumorais e com ausência de expressão da proteína na região central e pérolas córneas. Em E e F nota-se a ausência de expressão de podoplanina pelas células malignas e imunopositividade no endotélio linfático (seta). (A, IHQ 20X; B, IHQ 40X; C, IHQ 20X; D, IHQ 20X; E, IHQ 10X, F, IHQ 20x).

5.2.3 Expressão de ezrina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior

A expressão de ezrina foi predominantemente citoplasmática e forte, sendo distribuída de forma uniforme e homogênea, tanto na região central, como na região periférica dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (Figura 3). Dos 91 tumores analisados, 66 (79,1%) apresentaram uma forte expressão de ezrina e 25 destes (27,5%) uma fraca expressão desta proteína, não havendo ausência de expressão na amostra tumoral analisada (Figura 3).

Considerando-se que a região do *front* de invasão tumoral é o local de maior atividade das células neoplásicas, a análise da expressão de ezrina em relação às variáveis clínicas, demográficas, microscópicas, tratamento e evolução, baseou-se na região mais periférica dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. A associação da expressão da ezrina com as características clínicas, demográficas e microscópicas, pode ser analisada nas tabelas 11 e 12.

Não houve diferenças estatisticamente significativas entre a expressão da ezrina na região do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e as características clínicas, como gênero, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico T e N, radioterapia e recidiva locorregional (Tabela 11).

Em relação à idade, observou-se uma maior distribuição da expressão forte de ezrina na faixa compreendida entre os 45 e 70 anos. Em relação ao tabagismo e etilismo, observou-se que a maioria dos pacientes tabagistas e etilistas apresentou uma forte expressão de ezrina no *front* de invasão tumoral, como ilustrado na tabela 11.

Nos tumores com estadiamento clínico T1, T2, T3/T4, notou-se, na grande maioria, uma forte expressão de ezrina. Em relação ao estadiamento clínico N, os carcinomas espinocelulares de lábio inferior dos pacientes com comprometimento linfonodal apresentaram predominantemente uma forte expressão dessa proteína, conforme pode ser verificado na Tabela 11.

Entre os pacientes que foram submetidos à radioterapia pós-operatória, a maioria apresentou tumores com forte expressão de ezrina. Além disso, notou-se que os pacientes que apresentaram recidiva locorregional também mostraram uma forte expressão desta proteína (Tabela 11).

Não houve associação estatisticamente significativa entre a expressão de ezrina e as características microscópicas incluindo embolização vascular e as infiltrações perineural, muscular e glandular (Tabela 12). Entre os pacientes com comprometimento linfonodal histopatológico (pN+) observou-se que a maioria dos tumores apresentou uma forte expressão de ezrina, conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 11 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de ezrina pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		EXPRESSÃO DE EZRINA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Gênero	Masculino	22	88,0	53	80,3	0,389
	Feminino	3	12,0	13	19,7	
Idade*	≤ 45 anos	4	16,0	20	30,8	0,365
	>45 e ≤ 70	14	56,0	30	46,2	
	>70 anos	7	28,0	15	23,1	
Tabagismo*	Sim	18	81,8	47	81,0	0,936
	Não	4	18,2	11	19,0	
Etilismo*	Sim	15	68,2	27	48,2	0,111
	Não	7	31,8	29	51,8	
Estadiamento T*	T1	9	50,0	18	39,1	0,725
	T2	6	33,3	18	39,1	
	T3/T4	3	16,7	10	21,7	
Estadiamento N*	N0	17	89,5	37	75,5	0,201
	N+	2	10,5	12	24,5	
Radioterapia*	Sim	4	16,7	17	26,6	0,332
	Não	20	83,3	47	73,4	
Recidiva	Sim	7	28,0	17	25,8	0,828
	Não	18	72,0	49	74,2	
TOTAL		25	100	66	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior.

p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 12 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de ezrina pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		EXPRESSÃO DE EZRINA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Embolização Vascular*	Sim	2	50,0	7	25,0	0,557
	Não	2	50,0	21	75,0	
Infiltração Perineural*	Sim	4	66,7	7	25,0	0,070
	Não	2	33,3	21	75,0	
Infiltração Muscular*	Sim	0	0	7	35,0	0,999
	Não	2	100	13	65,0	
Infiltração Glandular*	Sim	0	0	1	5,3	0,999
	Não	2	100	18	94,7	
pN**	pN0	3	42,9	9	45,0	1,000
	pN+	4	57,1	11	55,0	
TOTAL		25	100	66	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior;

**Excluídos os pacientes não submetidos ao esvaziamento linfonodal

p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Figura 3 – Imunoexpressão de ezrina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A, B, C e D, observar a expressão forte da ezrina pelas células neoplásicas do *front* de invasão tumoral, com ausência de expressão nas pérolas córneas. Em E e F, expressão fraca de ezrina na periferia e no centro dos tumores. (A, IHQ 20X; B, IHQ 40X; C, IHQ 20X; D, IHQ 40X; E, IHQ 20X, F, IHQ 40x).

5.2.4 Expressão de Rho-A nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior

A expressão de Rho-A na periferia dos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi, predominantemente, forte em 57 (62,6%) destes e ausente ou fraca em 34 (37,4%) dos tumores (Figura 4). Para fins estatísticos, a expressão fraca e ausente de Rho-A foi agrupada.

Nas Tabelas 13 e 14 pode ser observada a distribuição da expressão da Rho-A em relação às características clínicas, demográficas e microscópicas. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a Rho-A e o gênero, a idade, o tabagismo, o etilismo, o estadiamento clínico T e N, a radioterapia e a recidiva locorregional, conforme descrito na Tabela 13.

Em relação à idade, a expressão forte da Rho-A foi detectada, principalmente, na faixa compreendida entre os 45 e 70 anos. Além disso, a maioria dos pacientes que era tabagista ou etilista apresentou uma forte expressão da proteína (Tabela 13).

A distribuição da expressão forte da Rho-A foi verificada na maioria dos tumores presentes nos diferentes estadiamentos clínicos T (Tabela 13).

Observou-se também que entre os pacientes com câncer de lábio que apresentavam comprometimento linfonodal (N+), que foram submetidos à radioterapia pós-operatória e que tiveram recidiva locorregional, houve mais frequentemente uma expressão forte de Rho-A pelas células malignas, como ilustrado na Tabela 13.

Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre a expressão de Rho-A e as características microscópicas analisadas, incluindo a embolização vascular ($p=0,264$), as infiltrações perineural ($p=0,693$), muscular ($p=0,648$) e glandular ($p=0,999$) e o comprometimento linfonodal histopatológico ($p=0,260$). Entretanto, nos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior que apresentavam embolização vascular, infiltração perineural, muscular e glandular, houve uma tendência de forte expressão da Rho-A pelas células neoplásicas (Tabela 14).

O comprometimento linfonodal histopatológico foi encontrado em 15 pacientes e destes, 12 apresentaram uma forte expressão de Rho-A pelas células malignas do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (Tabela 14).

Tabela 13 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de Rho-A pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		EXPRESSÃO DE RHO-A				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Gênero	Masculino	31	91,2	44	77,2	0,900
	Feminino	3	8,8	13	22,8	
Idade*	≤ 45 anos	10	30,3	14	24,6	0,786
	>45 e ≤ 70	16	48,5	28	49,1	
	>70 anos	7	21,2	15	26,3	
Tabagismo*	Sim	25	80,6	40	81,6	0,912
	Não	6	19,4	9	18,4	
Etilismo*	Sim	19	61,3	23	48,9	0,284
	Não	12	38,7	24	51,1	
Estadiamento T*	T1	12	44,4	15	40,5	0,643
	T2	11	40,7	13	35,1	
	T3/T4	4	14,8	9	24,3	
Estadiamento N*	N0	24	85,7	30	75,0	0,282
	N+	4	14,3	10	25,0	
Radioterapia*	Sim	6	18,2	15	27,3	0,333
	Não	27	81,8	40	72,7	
Recidiva	Sim	7	20,6	17	29,8	0,333
	Não	27	79,4	40	70,2	
TOTAL		34	100	57	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior; p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Tabela 14 – Distribuição da expressão imuno-histoquímica de Rho-A pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		EXPRESSÃO DE RHO-A				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Embolização Vascular*	Sim	2	16,7	7	35,0	0,264
	Não	10	83,3	13	65,0	
Infiltração Perineural*	Sim	4	28,6	7	35,0	0,693
	Não	10	71,4	13	65,0	
Infiltração Muscular*	Sim	2	22,2	5	38,5	0,648
	Não	7	77,8	8	61,5	
Infiltração Glandular*	Sim	0	0	1	8,3	0,999
	Não	9	100	11	91,7	
pN**	pN0	4	57,1	8	40,0	0,662
	pN+	3	42,9	12	60,0	
TOTAL		34	100	57	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada; N: número de câncer de lábio inferior;

**Excluídos os pacientes não submetidos ao esvaziamento linfonodal;

p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Figura 4 – Imunoexpressão de Rho-A nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B, padrão de expressão forte da Rho-A na periferia e no centro das ilhotas tumorais. Em C e D detalhe da expressão citoplasmática forte nas células malignas periféricas e ausência de expressão da Rho-A na região central e pérolas córneas. Em E e F, ausência de expressão de Rho-A no *front* de invasão tumoral. (A, IHQ 40X; B, IHQ 20X; C, IHQ 40X; D, IHQ 20X; E, IHQ 20X, F, IHQ 40x).

5.2.5 Associação da podoplanina, ezrina e Rho-A com o índice de malignidade dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior

Uma forte expressão de podoplanina (membranosa ou citoplasmática), de ezrina e de Rho-A foi observada nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, classificados como de baixo ou de risco intermediário/alto.

Houve uma associação, estatisticamente significativa, entre a expressão de podoplanina membranosa e a graduação de malignidade tumoral ($p=0,026$) sendo que a maioria (68,6%) dos 35 carcinomas espinocelulares de lábio inferior com expressão membranosa fraca de podoplanina, foi classificada como de risco intermediário/alto e 55,4% dos 56 tumores com expressão membranosa forte de podoplanina classificados como de baixo risco para recidiva local e sobrevivência global, como pode ser verificado na Tabela 15.

Não houve associação significativa entre a expressão de podoplanina citoplasmática, de ezrina e de Rho-A pelas células malignas com a graduação histopatológica de malignidade dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (Tabela 15). Entretanto, uma forte expressão destas proteínas foi observada na maioria dos tumores.

Tabela 15 – Distribuição da expressão de podoplanina, ezrina e Rho-A, pelas células malignas dos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, segundo a graduação da malignidade tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		Graduação da Malignidade		Total	p
		Baixo risco	Intermediário/alto		
		N (%)	N(%)		
Podoplanina Membranosa	Fraca	11 (31,4%)	24 (68,6%)	35	0,026
	Forte	31 (55,4%)	25 (44,6%)	56	
Podoplanina Citoplasmática	Fraca	16 (44,4%)	20 (55,6%)	36	0,791
	Forte	26 (47,3%)	29 (52,7)	55	
Ezrina	Fraca	10 (40,0%)	15 (60,0%)	25	0,469
	Forte	32 (48,5%)	34 (51,5%)	66	
Rho-A	Fraca	14 (41,2%)	20 (58,8%)	34	0,462
	Forte	28 (49,1%)	29 (50,9%)	57	

N: número de carcinomas espinocelulares de lábio inferior;

p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

5.2.6 Correlação da expressão de podoplanina, ezrina e Rho-A nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior

A correlação das expressões de podoplanina, de ezrina e de Rho-A pelas células neoplásicas periféricas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi feita pelo teste de correlação de Spearman, com nível de significância de 5%.

Foi encontrada uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a expressão de podoplanina membranosa, com a expressão de ezrina ($p=0,000$ e $r=0,384$) e com a expressão de Rho-A ($p=0,006$ e $r=0,282$), conforme descrito na Tabela 16.

Também houve uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a expressão de podoplanina citoplasmática e de ezrina ($p=0,000$ e $r=0,344$) pelas células neoplásicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior (Tabela 16).

No entanto, não foi encontrada correlação entre a expressão de podoplanina citoplasmática e de Rho-A ($p=0,068$ e $r=0,191$) e entre a expressão de ezrina e de Rho-A ($p=0,170$ e $r=-0,144$), como pode ser verificado na Tabela 16.

Tabela 16 – Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de podoplanina membranosa e citoplasmática, de ezrina e de Rho-A pelas células malignas dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

	Podoplanina Membranosa	Podoplanina Citoplasmática	Rho-A
Ezrina	$r=0,384$ $p=0,000$	$r=0,344$ $p=0,000$	$r=0,144$ $p=0,170$
Rho-A	$r=0,282$ $p=0,006$	$r=0,191$ $p=0,068$	

r: coeficiente de correlação de Spearman; p: nível de significância no teste de correlação de Spearman.

5.3 ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA

O período de seguimento clínico dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, estadiamento I, II, III e IV variou de 0,001 a 394 meses (média de 247 meses e desvio padrão de 23,3 meses). Ao final do período de seguimento, 28 pacientes estavam vivos e sem a doença, dois pacientes estavam vivos e com câncer, um paciente morreu por decorrência da cirurgia, 14 pacientes morreram devido à doença, 10 pacientes foram à óbito por outras causas não relacionadas ao câncer e 36 pacientes encontravam-se perdidos de vista.

As variáveis analisadas para os testes de sobrevivência foram gênero, tabagismo, etilismo, radioterapia, comprometimento linfonodal histopatológico (pN), expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina, da ezrina e da Rho-A, como descrito na Tabela 17.

Podemos observar que as taxas de sobrevida, acumuladas em 5 e 10 anos, dos pacientes com câncer de lábio que foram submetidos a radioterapia pós-operatória foram significativamente menores ($p=0,000$) se comparadas aquelas dos pacientes que não receberam este tratamento (Tabela 17).

Ao analisarmos a sobrevivência global, acumulada em 5 e 10 anos, em relação ao comprometimento linfonodal histopatológico dos pacientes com câncer de lábio inferior, detectamos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos pN0 e pN+ e aqueles que não foram submetidos ao esvaziamento linfonodal (Tabela 17). Verificamos que os pacientes com câncer de lábio sem comprometimento linfonodal histopatológico ou que não foram submetidos ao esvaziamento cervical apresentaram maiores taxas de sobrevivência global se comparados àqueles com comprometimento linfonodal (pN+).

As expressões de podoplanina (membranosa ou citoplasmática), de ezrina e de Rho-A, no *front* de invasão tumoral, não influenciaram a sobrevivência global dos pacientes com câncer de lábio inferior.

Tabela 17 – Análise da sobrevivência global acumulada em 5 e 10 anos, por meio da técnica de Kaplan-Meier, dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, vícios, comprometimento linfonodal histopatológico e expressão de podoplanina, de ezrina e de Rho-A. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

Variável		SOBREVIVÊNCIA GLOBAL		<i>p</i>
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Gênero	Masculino	86,3	77,7	0,158
	Feminino	79,4	51,5	
Tabagismo*	Sim	85,5	73,5	0,119
	Não	92,9	92,9	
Etilismo*	Sim	85,5	73,5	0,345
	Não	90,5	81,7	
Radioterapia*	Sim	57,1	35,9	0,000
	Não	98,0	90,1	
pN*	pN0	89,8	80,7	0,001
	pN+	67,0	34,4	
	Não esvaziados	92,0	81,0	
Podoplanina Membrana	Fraca	86,0	81,1	0,724
	Forte	84,7	66,0	
Podoplanina Citoplasma	Fraca	75,1	71,0	0,694
	Forte	91,2	70,2	
Ezrina	Fraca	94,1	86,3	0,223
	Forte	82,4	66,7	
Rho-A	Fraca	88,2	78,9	0,330
	Forte	83,1	65,6	
TOTAL		100	100	

*Excluídos pacientes com informação ignorada

p= nível descritivo do teste log-rank

Figura 5 – Sobrevivência global dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, de acordo com o comprometimento linfonodal histopatológico. Porcentagem de sobrevivência acumulada por meio da técnica Kaplan Meier.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Embora o câncer de lábio seja um tumor mais indolente quando comparado àqueles que ocorrem no interior da boca, sua evolução clínica pode estar associada à ocorrência de metástases em fases mais tardias da doença (VUKADINOVIC et al., 2007; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012). A participação das proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina e moesina) neste processo de metástase, particularmente na movimentação e migração celular, a partir da regulação da sinalização intercelular da Rho-A e da ativação da actina do citoesqueleto tem sido amplamente investigada nos últimos anos (ARPIN et al., 2011; KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012; CLUCAS, VALDERRAMA; 2014;).

Alguns estudos prévios mostraram que a expressão aumentada da podoplanina, uma proteína transmembrana, que se liga à proteína ezrina da família ERM, está relacionada com a ocorrência de metástases linfonodais, evolução clínica desfavorável e pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013).

Também em relação à ezrina, as investigações em câncer de boca, mostraram que sua forte expressão revelou um fenótipo invasivo e com maior potencial metastático das células malignas (SCHLECHT et al., 2012; WU et al., 2013; SAITO et al., 2013), sendo associada à menor sobrevivência dos pacientes (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007).

Em 2005, Martin-Villar et al. propuseram *in vitro* uma via de conexão da podoplanina à actina do citoesqueleto celular. Os autores sugeriram que a ativação da podoplanina na membrana celular, via ligação e redistribuição da ezrina no citoplasma da célula e fosforilação da Rho-A, induzia um rearranjo da actina e uma maior mobilidade da célula tumoral.

No entanto, mesmo com esta sugestão da participação conjunta da podoplanina, ezrina e Rho-A, no processo de movimentação celular e metástases, nenhum estudo sobre a investigação da expressão simultânea e/ou da correlação destas três proteínas no *front* de invasão tumoral de carcinomas espinocelulares de boca foi encontrado, o que motivou a realização deste trabalho.

Neste presente estudo, além de investigar o padrão e a localização celular da expressão de podoplanina, de ezrina e de Rho-A pelas células dos carcinomas espinocelulares de lábio

inferior, procuramos verificar a correlação entre as expressões dessas proteínas e sua associação com as características clínicas dos pacientes e evolução da doença.

A amostra utilizada foi constituída por 91 pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos a tratamento no Departamento de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2009. Ressalta-se que todos os tumores foram previamente analisados, com base nos aspectos microscópicos, procurando incluir tumores que permitissem uma análise imuno-histoquímica de, no mínimo, dez campos microscópicos, na região do *front* de invasão tumoral, e cujos pacientes tivessem seguimento clínico completo, conforme estabelecido nos critérios de inclusão deste estudo.

Nossa amostra de carcinoma espinocelular de lábio inferior foi constituída, principalmente, de pacientes do gênero masculino (82,4%), com idades entre 45 e 70 anos (48,9%) e estadiamentos clínicos iniciais T1N0M0 (42,2%) e T2N0M0 (37,5%), como ilustrado na Tabela 3. Além disso, todos os pacientes desta amostra eram da raça branca. Este perfil para o câncer de lábio reflete o que tem sido encontrado em outros estudos sobre a doença, como por exemplo, aquele encontrado na amostra de Santos et al., 2014.

Em relação às características microscópicas analisadas nos carcinomas espinocelulares de lábio (Tabela 4), observou-se que a maioria não apresentava infiltração perineural (67,6%), muscular (68,2%), glandular (95,3%) e embolização vascular (71,8%) e as margens cirúrgicas estavam livres em 93,4% dos tumores, reforçando que a maioria de nossos tumores encontrava-se em fases iniciais e muitos pacientes foram tratados sem esvaziamento linfonodal (Tabela 4).

Inicialmente, foi estabelecido o índice de malignidade tumoral dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, nos cortes corados em Hematoxilina e Eosina, segundo a avaliação de risco histológico (risco de recidiva local e menor sobrevivência dos pacientes), proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005). Utilizamos este índice de malignidade histopatológico porque, de acordo com o estudo de Santos et al. (2014), ao avaliarem o grau de malignidade, com base em três sistemas de graduação histopatológica, em uma série de carcinomas espinocelulares de lábio, concluíram que este índice foi o que melhor refletiu o comportamento biológico destes tumores.

O padrão tumoral apresentado nessa amostra de carcinomas espinocelulares de lábio inferior, segundo a avaliação de risco histológico proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005), foi, principalmente, um padrão de invasão tipo 1 (compressão em borda, projeções digitiformes e grandes ilhotas separadas), com um infiltrado inflamatório denso linfocitário

(71,5%) na interface tumor/hospedeiro e sem invasão perineural (76,9%), como pode ser comprovado pela Figura 1 e Tabela 5. Assim sendo, 39 carcinomas espinocelulares de nossa amostra foram classificados como de baixo risco e 42 como de risco intermediário para recidiva local e menor probabilidade de sobrevivência global (Tabela 6). Esses resultados confirmam o perfil deste tipo de tumor encontrado por Santos et al (2014), no qual a maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio foi caracterizada por tumores com padrão de invasão menos infiltrativo e com menor frequência de comprometimento linfonodal, reforçando a evolução clínica favorável destes tumores.

A seguir iremos discutir, separadamente, nossos resultados referentes à expressão de podoplanina, de ezrina e de Rho-A pelas células do *front* de invasão dos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

Em relação à expressão imuno-histoquímica da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, observamos uma distribuição predominantemente forte na membrana e no citoplasma, limitada à região do *front* de invasão dos tumores e fraca ou ausente na região central, confirmando os achados em estudos prévios (CUENI et al., 2010; FUNAYAMA et al., 2011; BARTULLI et al., 2012; INOUE et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; CIRLIGERU et al., 2014; GARCIA et al., 2014). Nossos resultados reforçam aqueles de Yuan et al. (2006), ao afirmarem que a presença da proteína nas células do *front* de invasão tumoral indica uma fase ativa desta proteína e a expressão central fraca, indica um estado mais inativo da podoplanina, tendo em vista que as células periféricas são as responsáveis pela invasão local neoplásica. Além disso, áreas centrais mais maduras e com células quiescentes, como as pérolas córneas, não apresentaram, positividade para a podoplanina em nosso estudo (Figura 2).

A expressão membranosa de podoplanina pelas células do câncer de lábio inferior não foi associada com as características clínicas e microscópicas analisadas (Tabelas 7 e 9), entretanto, a expressão citoplasmática desta proteína foi, significativamente, associada com o estímulismo ($p= 0,024$), com a recidiva locorregional ($p= 0,028$) e com o comprometimento linfonodal histopatológico ($p= 0,010$), como descrito nas Tabelas 8 e 10. Estas diferenças entre a podoplanina membranosa e citoplasmática encontrada nas células neoplásicas reforçam que, não somente seu padrão de expressão, mas também sua localização na célula, deve ser cuidadosamente avaliada nos carcinomas espinocelulares pois pode indicar um estado de ativação desta proteína, influenciando a evolução clínica tumoral.

Adicionalmente, este resultado em relação ao etilismo, onde a maioria dos pacientes não etilistas apresentava uma forte expressão citoplasmática de podoplanina, precisa ser confirmado em outros estudos visando uma interpretação mais consistente deste achado.

Embora entre os pacientes que apresentaram recidiva locorregional, a maioria possuía uma fraca expressão citoplasmática de podoplanina no *front* de invasão tumoral (Tabela 8), todos os pacientes com pN+ apresentaram carcinomas espinocelulares de lábio inferior com forte expressão citoplasmática desta proteína (Tabela 10), corroborando os resultados de outros autores que associaram a forte expressão de podoplanina pelas células neoplásicas com a maior ocorrência de metástases linfonodais em câncer de boca (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULLI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013).

Outra proteína investigada nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi a ezrina e sua forte expressão citoplasmática foi observada, homogeneamente, tanto nas células periféricas, como nas células centrais desses tumores (Figura 3), sendo este padrão de imunomarcção também descrito no câncer de boca por Madan et al. (2006); Mhaweche-Fauceglia et al. (2007); Schlecht et al. (2012); Saito et al. (2013) e Garcia et al. (2014).

A localização subcelular da ezrina parece ser um aspecto interessante a ser analisada no comportamento celular, pois em células epiteliais escamosas normais e que não estão em proliferação, a ezrina, em seu estado funcional ativo, é expressa principalmente na membrana celular (MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012; GARCIA et al., 2014) entretanto, sua redistribuição citoplasmática em alguns tumores como no carcinoma espinocelular, incluindo o câncer de lábio da presente amostra, vem sendo associada com o comportamento tumoral e com sua participação no processo de movimentação celular e metástase (MADAN et al., 2006; GARCIA et al., 2014).

Não houve associação significativa da expressão da ezrina pelas células do câncer de lábio com as características clínicas e demográficas, com a evolução tumoral e com as características microscópicas analisadas como ilustrado nas Tabelas 11 e 12, confirmando os achados de Madan et al. (2006), onde não foi possível encontrar associação da ezrina com as variáveis clínico-patológicas de sua amostra de câncer de boca.

Um resultado interessante mostrou um maior número de tumores com forte expressão de ezrina nos pacientes com câncer de lábio que apresentaram pN+ (Tabela 12) e naqueles onde ocorreram recidiva locorregional (Tabela 11), embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa em relação aos tumores que não apresentavam estas características. Estes achados sugerem uma forte expressão de ezrina em tumores mais

agressivos e com potencial de invasão e metástase, reforçando as afirmativas de que esta proteína participa da carcinogênese bucal, particularmente da progressão destes tumores (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013).

Em relação à expressão da Rho-A pelas células neoplásicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, observamos uma predominância da forte expressão citoplasmática desta proteína no *front* de invasão tumoral (Figura 4) e nas células centrais uma expressão ora fraca, ora ausente. Também não houve associação significativa da expressão de Rho-A com as características clínicas e microscópicas analisadas (Tabelas 13 e 14). Este aumento da expressão de Rho-A como observado em nossa amostra de câncer de lábio, também foi descrita em células neoplásicas de diferentes origens (FRITZ, 1999; KLEER, 2000; KAMAI et al., 2001; HORIUCHI et al., 2008), incluindo o carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço (ABRAHAM et al., 2001).

Ao analisarmos a associação das três proteínas (podoplanina, ezrina e Rho-A) com o índice de malignidade tumoral proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005), verificamos uma associação, estatisticamente significativa, entre a expressão de podoplanina membranosa e a graduação de malignidade tumoral ($p=0,026$). Conforme descrito na Tabela 15, a maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior com expressão membranosa fraca de podoplanina, foi classificada como de risco intermediário/alto e aqueles com tumores com expressão membranosa forte de podoplanina classificados como de baixo risco para recidiva local e sobrevivência global.

Estes resultados de nosso estudo clínico, descritos acima, parecem concordar com alguns achados recentes *in vitro* de Tsuneki et al. (2013), onde o bloqueio transitório da podoplanina, via silenciamento do RNA (siRNA) em células de câncer de língua, não afetaram a migração celular e curiosamente, os tumores sem células positivas para a podoplanina foram histopatologicamente classificados como carcinomas espinocelulares menos diferenciados e com maior potencial de invasão de vasos linfáticos. Além disso, estes autores (TSUNEKI et al., 2013) concluíram que a função fundamental da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca está relacionada com sua participação na adesão das células neoplásicas à matriz extracelular. Assim sendo, a forte expressão membranosa da podoplanina encontrada nas células neoplásicas do *front* de invasão dos tumores classificados como de baixo risco histológico para recidiva e sobrevivência global, reforça que esta proteína, provavelmente está participando das conexões intercelulares e adesivas das células,

contribuindo com o mecanismo de adesão das células à matriz extracelular nestes carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

Estes resultados suscitaram também alguns outros questionamentos: Estaria a podoplanina membranosa participando de funções celulares diferentes daquelas da podoplanina citoplasmática nas células neoplásicas do câncer de lábio? A ativação membranosa desta proteína poderia ocasionar sua migração para o citoplasma? A resposta a estes questionamentos requer a realização de outros estudos *in vitro* e *in vivo*, visando entender melhor a participação desta proteína na carcinogênese bucal.

Em relação às expressões celulares de podoplanina citoplasmática, de ezrina e de Rho-A, nenhuma associação significativa foi encontrada com o índice de malignidade tumoral do câncer de lábio, como ilustrado na Tabela 15.

Para verificarmos se existia uma correlação entre a expressão das três proteínas no *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi realizado o teste de Spearman (Tabela 16). Os resultados mostraram uma correlação positiva e estatisticamente significativa da expressão de podoplanina membranosa com a expressão de ezrina ($p=0,000$ e $r=0,384$) e com a expressão de Rho-A ($p=0,006$ e $r=0,282$).

Estes achados clínicos corroboram os resultados *in vitro* das investigações de Martin-Villar et al. (2005) e Wicki et al. (2006) que sugeriram a participação da podoplanina no processo de movimentação celular a partir da conexão com as proteínas da família ERM, como a ezrina, e fosforilação da Rho-A citoplasmática, ativando a actina do citoesqueleto com formação de pseudópodes na membrana. Além disso, estes autores (MARTIN-VILLAR et al., 2005; WICKI et al., 2006) comprovaram que a atividade da Rho-A está envolvida no fenótipo pró-migratório observado em células cancerosas que expressam podoplanina.

Foi sugerido que quando as células apresentam uma baixa demanda da remodelação do citoesqueleto, a podoplanina, a ezrina e a Rho-A permanecem expressas, respectivamente, no citoplasma, membrana celular ou ambas (porém não fosforilada), ou até mesmo ausentes (MADAN et al., 2006; SAITO et al., 2013; GARCIA et al., 2014). Porém, frente à necessidade de movimentação celular, suas localizações transferem-se para a membrana plasmática (podoplanina) e citoplasma (ezrina e Rho-A) (MARTIN-VILLAR et al., 2006; MADAN ET AL., 2006). Portanto, as evidências do presente estudo mostrando uma correlação positiva entre a expressão de podoplanina membranosa, ezrina e Rho-A, confirmam, do ponto de vista clínico, a participação conjunta destas proteínas na área invasiva do câncer de boca, provavelmente, atuando no processo de migração e movimentação celular.

Também houve correlação da expressão da podoplanina citoplasmática com a expressão de ezrina ($p=0,000$ e $r=0,344$), sendo que este resultado corrobora aqueles de Martin-Villar et al. (2006), ao afirmarem que a ezrina se liga à porção citoplasmática da podoplanina e confirma os achados de Garcia et al. (2014) ao descreverem uma associação positiva entre a podoplanina e a ezrina no *front* de invasão do câncer de lábio, porém sem significância estatística, provavelmente em função do pequeno número de tumores analisados.

Ao analisarmos a influência das expressões no *front* de invasão tumoral de podoplanina, de ezrina e de Rho-A, no prognóstico dos pacientes com câncer de lábio inferior, verificamos que estas proteínas não influenciaram a sobrevivência global destes pacientes (Tabela 17).

A associação da forte expressão de podoplanina com um pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca foi descrito em algumas investigações prévias (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013), entretanto, esta evidência não foi confirmada em nossa amostra de câncer de lábio.

Também em relação à expressão de ezrina no câncer de lábio e sua influência no prognóstico dos pacientes, nossos resultados não corroboram com aqueles encontrados em câncer de boca por Madan et al. (2006); Mhawech-Fauceglia et al. (2007) e Schlecht et al. (2012), ao demonstrarem uma menor sobrevivência dos pacientes cujos tumores expressaram fortemente a ezrina.

A influência da expressão da Rho-A no prognóstico do câncer de lábio não pode ser comparada com outros estudos, pois não encontramos investigações com esta abordagem clínica nestes tumores.

O comprometimento linfonodal histopatológico (pN+) e a radioterapia pós-operatória se mostraram fatores de prognóstico significativos para os pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior (Tabela 17). Verificamos que os pacientes com câncer de lábio sem comprometimento linfonodal histopatológico ou que não foram submetidos ao esvaziamento cervical apresentaram maiores taxas de sobrevivência global se comparados àqueles com comprometimento linfonodal (pN+). Também observamos que as taxas de sobrevida, acumuladas em 5 e 10 anos, dos pacientes com câncer de lábio que foram submetidos a radioterapia pós-operatória foram significativamente menores ($p=0,000$) se comparadas àquelas dos pacientes que não receberam este tratamento (Tabela 17).

O presente estudo foi o primeiro a correlacionar a expressão conjunta da podoplanina, da ezrina e da Rho-A na carcinogênese de lábio inferior, reforçando, do ponto de vista clínico,

a participação das células neoplásicas contendo estas proteínas no mecanismo de migração e invasão tumoral. A confirmação destes resultados em outras amostras de câncer de boca se faz necessária para um entendimento mais amplo das vias de sinalização celulares que ativam estas proteínas, isolada ou conjuntamente, no processo de progressão tumoral.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir das análises das expressões de podoplanina, de ezrina e de Rho-A nos 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, verificamos que:

- ✓ a expressão de podoplanina foi predominantemente forte na membrana e no citoplasma das células periférica das ilhotas tumorais;
- ✓ a expressão de ezrina foi forte e homogeneamente distribuída na periferia e no centro dos tumores;
- ✓ a expressão de Rho-A foi predominantemente forte na periferia e fraca no centro dos tumores;
- ✓ houve uma associação, estatisticamente significativa, entre a expressão citoplasmática de podoplanina com o estadiamento ($p=0,024$), com a recidiva locorregional ($p=0,028$) e com o comprometimento linfonodal histopatológico ($p=0,010$);
- ✓ não houve uma associação significativa entre as expressões de ezrina e de Rho-A com as características clínicas e microscópicas analisadas;
- ✓ houve uma associação significativa entre a expressão membranosa de podoplanina e o índice de malignidade tumoral ($p=0,026$);
- ✓ houve uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre a expressão de podoplanina membranosa ($p=0,000$ e $r=0,384$) e citoplasmática ($p=0,000$ e $r=0,344$) com a expressão de ezrina e da podoplanina membranosa com a expressão de Rho-A ($p=0,006$ e $r=0,282$);
- ✓ estas proteínas não se mostraram fator de prognóstico significativo para os pacientes com estes tumores.

Com base nestes resultados, concluímos que a forte expressão de podoplanina membranosa pelas células malignas pode ajudar a identificar pacientes com câncer de lábio com baixo risco para recidiva locorregional. Além disso, a correlação entre as expressões da podoplanina, da ezrina e da Rho-A pelas células do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior sugere que estas proteínas estão participando, conjuntamente, nos processos de movimentação celular e invasão tumoral.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM M.T. et al. Motility-related proteins as markers for head and neck squamous cell cancer. **Laryngoscope**. v. 111, n.7, p.1285-9, Jul 2001.
- ARPIN, M. et al. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. **Cell Adh Migr**, v. 5, n. 2, p. 199-206, Mar-Apr 2011.
- BARRETT, A. W. et al. The differentiation profile of the epithelium of the human lip. **Arch Oral Biol**, v. 50, n. 4, p. 431-8, Apr 2005.
- BARTULI, F. N. et al. Podoplanin in the development and progression of oral cavity cancer: a preliminary study. **Oral Implantol (Rome)**, v. 5, n. 2-3, p. 33-41, Apr 2012.
- BAUMGARTNER, M. et al. The Nck-interacting kinase phosphorylates ERM proteins for formation of lamellipodium by growth factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 36, p. 13391-6, Sep 5 2006.
- BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 2, p. 167-78, Feb 2005.
- BREITENEDER-GELEFF S. et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. **Am J Pathol**. v.154, n. 2, p.385-94, Feb 1999.
- CANEL, M. et al. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. **J Cell Sci**, v. 126, n. Pt 2, p. 393-401, Jan 15 2013.
- CARVALHO, F. M. et al. Prognostic value of podoplanin expression in intratumoral stroma and neoplastic cells of uterine cervical carcinomas. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 12, p. 1279-83, 2010.
- CHIAPPETTA, C. et al. Correlation of the Rac1/RhoA pathway with ezrin expression in osteosarcoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 22, n. 3, p. 162-70, Mar 2014.
- CIRLIGERIU, L. et al. Dual role of podoplanin in oral cancer development. **In Vivo**, v. 28, n. 3, p. 341-7, May-Jun 2014.

CLARK, E. A. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. **J Cell Biol.** v.27, n.142(2), p.573. Jul 1998.

Classificação de Tumores Malignos. TNM/UICC. Ministério da Saúde. 6ª edição. 2004.

CLUCAS, J.; VALDERRAMA, F. ERM proteins in cancer progression. **J Cell Sci**, v. 127, n. Pt 2, p. 267-75, Jan 15 2014.

CUENI, L. N. et al. Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. **Am J Pathol**, v. 177, n. 2, p. 1004-16, Aug 2010.

DE VICENTE, J. C. et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. **Oral Oncol**, v. 49, n. 6, p. 598-603, Jun 2013.

DOS SANTOS ALMEIDA, A. et al. Podoplanin and VEGF-C immunoexpression in oral squamous cell carcinomas: prognostic significance. **Anticancer Res**, v. 33, n. 9, p. 3969-76, Sep 2013.

DUNKEL, J. et al. Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 123, n. 10, p. 2435-41, Oct 2013.

ELLENBROEK S., COLLARD J.G. Rho GTPases: functions and association with cancer. **Clin Exp Metastasis.** v.24, n.8, p. 657-72, Nov, 2007.

FAUSTINO, S. E. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 37, n. 4, p. 372-8, Apr 2008.

FERNANDEZ-MUNOZ, B. et al. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 6, p. 886-96, Jun 2011.

FOSCHINI, M P. et al. Podoplanin and E-cadherin expression in preoperative incisional biopsies of oral squamous cell carcinoma is related to lymph node metastases. **Int J Surg Pathol**, v. 21, n. 2, p. 133-41, Apr 2013.

FRITZ G.; JUST I.; KAINA B. Rho GTPases are over-expressed in human tumors. **Int J Cancer.** v.31, n.81, p. 682-7, May 1999.

FUNAYAMA, A. et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. **Pathobiology**, v. 78, n. 3, p. 171-80, 2011.

GARCIA, A.S. et al. Ezrin and podoplanin expressions are associated in invasion front of lip cancer. **Head Neck Oncol**, v.03; n. 6(1), p. 8 May 2014.

GILDEA, J.J. et al. RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. **Cancer Res.** v.15; n.62(22), p.641-823.Nov 2002.

GUTIÉRREZ-PASCUAL M. et al. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. **J Eur Acad Dermatol Venereol.** v.26, n. 9, p. 1116-21. Sep 2012.

HALON, A. et al. ERM/Rho protein expression in ductal breast cancer: a 15 year follow-up. **Cell Oncol (Dordr)**, v. 36, n. 3, p. 181-90, Jun 2013.

HORIUCHI, A. et al. Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with Lovastatin may be useful for ovarian cancer. **Cancer Sci**, v. 99, n. 12, p. 2532-9, Dec 2008.

HUBER, G. F. et al. Podoplanin expression correlates with sentinel lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v. 129, n. 6, p. 1404-9, Sep 2011.

HUNTER, K. W. Ezrin, a key component in tumor metastasis. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 5, p. 201-4, May 2004.

INOUE, H. et al. Podoplanin expression during dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity. **Tumour Biol**, v. 33, n. 1, p. 183-94, Feb 2012.

ISACKE, C. M.; YARWOOD, H. The hyaluronan receptor, CD44. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34, n. 7, p. 718-21, Jul 2002.

ITO, S. et al. Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 422, n. 1, p. 194-9, May 25 2012.

JUNG, Y.; MCCARTY, J. H. Band 4.1 proteins regulate integrin-dependent cell spreading. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 426, n. 4, p. 578-84, Oct 2012.

KAMAI, T. et al. Overexpression of RhoA mRNA is associated with advanced stage in testicular germ cell tumour. **BJU Int**, v. 87, n. 3, p. 227-31, Feb 2001.

KAWAGUCHI, H. et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 3, p. 354-60, Jan 2008.

KHANNA C., et al. The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. **Nat Med**. v.10, n.2, p.182-6, Feb 2004.

KLEER, C. G.; VAN GOLEN, K. L.; MERAJVER, S. D. Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. **Breast Cancer Res**, v. 2, n. 6, p. 423-9, 2000.

KREPPEL M. et al. Podoplanin expression predicts prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant radiochemotherapy. **Oral Oncol**, v.47, n.9, p. 873-8, Sep, 2011.

KREPPEL, M. et al. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. **Virchows Arch**, v. 456, n. 5, p. 473-82, May 2010.

KRISANAPRAKORNKIT, S.; IAMAROON, A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **ISRN Oncol**, v. 2012, p. 681469, 2012.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 7ª Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, 2006. 1592p.

LAN, M. et al. Phosphorylation of ezrin enhances microvillus length via a p38 MAP-kinase pathway in an immortalized mouse hepatic cell line. **Exp Cell Res**, v. 312, n. 2, p. 111-20, Jan 15 2006.

LEE, J. A. et al. D2-40, Podoplanin, and CD31 as a Prognostic Predictor in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. **J Breast Cancer**, v. 14, n. 2, p. 104-11, Jun 2011.

LI, Q. et al. Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells. **Cancer Lett**, v. 261, n. 1, p. 55-63, Mar 8 2008.

LOUVET-VALLEE, S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. **Biol Cell**, v. 92, n. 5, p. 305-16, Aug 2000.

MA, L. et al. Relationship of RhoA signaling activity with ezrin expression and its significance in the prognosis for breast cancer patients. **Chin Med J (Engl)**, v. 126, n. 2, p. 242-7, Jan 2013.

MADAN, R. et al. Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 28, n. 11, p. 1018-27, Nov 2006.

MARGARITESCU, C. et al. Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 6, p. 701-11, Jun 2010.

MARHABA, R.; ZOLLER, M. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. **J Mol Histol**, v. 35, n. 3, p. 211-31, Mar 2004.

MARJORAM, R. J.; LESSEY, E. C.; BURRIDGE, K. Regulation of RhoA activity by adhesion molecules and mechanotransduction. **Curr Mol Med**, v. 14, n. 2, p. 199-208, Feb 2014.

MARTIN-VILLAR, E. et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 24, p. 4387-99, Dec 2010.

MARTIN-VILLAR, E. et al. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 21, p. 4541-53, Nov 1 2006.

MARTIN-VILLAR, E. et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. **Int J Cancer**, v. 113, n. 6, p. 899-910, Mar 1 2005.

MCCLATCHEY, A. ERM proteins at glance. **J Cell Sci**, v.1, n.127, p.3199, Aug, 2014.

MHAWECH-FAUCEGLIA, P. et al. Value of ezrin, maspin and nm23-H1 protein expressions in predicting outcome of patients with head and neck squamous-cell carcinoma treated with radical radiotherapy. **J Clin Pathol**, v. 60, n. 2, p. 185-9, Feb 2007.

MUSIAL, J.; SPORNY, S.; NOWICKI, A. Prognostic significance of E-cadherin and ezrin immunohistochemical expression in prostate cancer. **Pol J Pathol**, v. 58, n. 4, p. 235-43, 2007.

NGUYEN, D. X.; MASSAGUE, J. Genetic determinants of cancer metastasis. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 5, p. 341-52, May 2007.

NOGUTI, J. et al. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 9, n. 5, p. 329-35, Sep-Oct 2012.

ORDONEZ, N. G. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. **Adv Anat Pathol**, v. 13, n. 2, p. 83-8, Mar 2006.

PARRI, M.; CHIARUGI, P. Rac and Rho- GTPases in cancer cell motility control. **Cell Commun Signal**, v. 8, p. 23, 2010.

PUJUGUET, P. et al. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 5, p. 2181-91, May 2003.

SAHAI, E.; MARSHALL, C. J. RHO-GTPases and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 2, n. 2, p. 133-42, Feb 2002.

SAITO S. et al. Mechanisms underlying cancer progression caused by ezrin overexpression in tongue squamous cell carcinoma. **PLoS One**. v.8, n.1, p. 54881, Jan 2013.

SANTOS H.B. et al. Histopathological grading systems and their relationship with clinical parameters in lower lip squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.43, n.5, p.539-45, May 2014.

SCHACHT, V. et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. **EMBO J**, v. 22, n. 14, p. 3546-56, Jul 15 2003.

SCHLECHT, N. F. et al. Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol**, v. 6, n. 2, p. 232-43, Jun 2012.

SCHUBBERT S.; SHANNON K.; BOLLAG G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nat Rev Cancer**. v. 7, n. 7, p. 563, Jul 2007.

SEKI, S. et al. Prognostic value of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma--a regression model auxiliary to UICC classification. **Pathol Oncol Res**, v. 20, n. 3, p. 521-8, Jul 2013.

STEEG, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55-63, Jan 2003.

SUZUKI, H. et al. High podoplanin expression in cancer cells predicts lower incidence of nodal metastasis in patients with lung squamous cell carcinoma. **Pathol Res Pract**, v. 207, n. 2, p. 111-5, Feb 15 2011.

SWAIN, N. et al. Podoplanin-a novel marker in oral carcinogenesis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 9, p. 8407-13, Sep 2014.

TONG, L. et al. Role of podoplanin expression in esophageal squamous cell carcinoma: a retrospective study. **Dis Esophagus**, v. 25, n. 1, p. 72-80, Jan 2012.

TSUNEKI, M. et al. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 434, n. 1, p. 124-30, Apr 26 2013.

TURUNEN, O.; WAHLSTROM, T.; VAHERI, A. Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. **J Cell Biol**, v. 126, n. 6, p. 1445-53, Sep 1994.

VORMITTAG, L. et al. Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 73, n. 3, p. 913-8, Mar 1 2009.

VUKADINOVIC M, Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 65, n.4, p.675-9, Apr 2007.

WENNERBERG, K.; ROSSMAN, K. L.; DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 5, p. 843-6, Mar 1 2005.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. **Br J Cancer**, v. 96, n. 1, p. 1-5, Jan 15 2007.

WICKI, A. et al. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. **Cancer Cell**, v. 9, n. 4, p. 261-72, Apr 2006.

WU, G. et al. Ezrin gene expression and protein production in the CD44(+) subpopulation of SCC-9 cells in a malignant oral cancer cell line in vitro. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 3, p. e151-7, Mar 2013.

YAMANASHI, T. et al. Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. **Oncology**, v. 77, n. 1, p. 53-62, 2009.

YU, Y. et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. **Nat Med**, v. 10, n. 2, p. 175-81, Feb 2004.

YUAN, P. et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. **Cancer**, v. 107, n. 3, p. 563-9, Aug 1 2006.

Anexos

ANEXO A – Formulário utilizado na coleta dos dados clínicos e microscópicos relativos aos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, estadiamentos clínicos I, II, III e IV.

Registro da coleta de dados

Faculdade de Odontologia de Bauru / USP

Departamento de Estomatologia - Área de Patologia

Fundação Antônio Prudente / Hospital do Câncer

Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia

Departamento de Anatomia Patológica

**Correlação da expressão da podoplanina, ezrina
e Rho-A em carcinomas espinocelulares de lábio inferior.**

Dra. Denise Tostes Oliveira, Agnes Assao, Ms. Kellen Cristine Tijoe; Ms. Alexandre Simões Garcia, Dr. Fernando Augusto Soares; Dr. Luiz Paulo Kowalski

Identificação e dados demográficos:

1. Número no estudo: _____
2. RGH: _____
3. Idade: _____ anos
4. Gênero: ☐ 1-masculino ☐ 2-feminino
5. Raça: ☐ 1-branca ☐ 2-não branca

História clínica:

6. Tempo de história: _____ meses (999 se desconhecido)
7. Tabagismo: ☐ 0-não ☐ 1- Sim ☐ 9-desc.
8. Etilismo: ☐ 0-não ☐ 1- Sim ☐ 9-desc.

Exame Loco-regional:

9. Tipo de lesão: ☐ 1-úlcero-vegetante ☐ 2-úlcero-infiltrativa ☐ 3-outra

10. Diâmetro aproximado da lesão: _____ cm
11. Estádio T (atualizar UICC 02): ☐ 1-T1 ☐ 2-T2 ☐ 3-T3 ☐ 4-T4
12. Estádio N (atualizar UICC 02): ☐ 0-N0 ☐ 1-N+

Cirurgia:

13. Data da cirurgia: ____/____/____
14. Cirurgia:
☐ 1-Cirurgia sem esvaziamento cervical

- ☐ 2- Cirurgia com esvaziamento cervical ipsilateral
☐ 3- Cirurgia com esvaziamento cervical contralateral (simult)

15. Data da alta hospitalar: ____/____/____

Radioterapia pós-operatória:

16. ☐ 0-não ☐ 1- sim

Análise Microscópica:

17. Número do AP: _____

18. Anatomopatológico do tumor primário: ☐ 1- CEC I ☐ 2- CEC I
☐ 3- CEC III ☐ 4- CEC SOE

19. Embolização vascular: ☐ 0-não ☐ 1-linfática ☐ 2- sanguínea
☐ 3-ambas ☐ 9-ignorado

20. Infiltração perineural: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado

21. Infiltração muscular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado

22. Infiltração óssea: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado

23. Infiltração de glândulas salivares: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado

24. Margens: ☐ 0-livres ☐ 1-presentes ☐ 2-comprometidas ☐ 9-ignorado

25. Número de linfonodos comprometidos ipsilaterais: _____ (99 se não esv.)

26. Número de linfonodos dissecados ipsilaterais: _____ (999 se não esv.)

27. Número de linfonodos comprometidos contralaterais: _____ (99 se não esv.)

28. Número de linfonodos dissecados contralaterais: _____ (99 se não esv.)

29. pN: ☐ 0-negativo ☐ 1- positivo ☐ 9- sem esvaziamento

Evolução:

30. Data da primeira recidiva: ____/____/____

31. Locais de recidiva: ☐ 0-não teve ☐ 1-local ☐ 2-pescoço ipsi

☐ 3-pescoço contra ☐ 4-pulmão ☐ 5-osso ☐ 6-fígado

☐ 7-outra à distância _____ ☐ 8-teve recidiva, local ignorado

32. Data do diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (0/0/0 se não teve)

33. Local do segundo tumor primário: _____ (0 se não teve)

34. Data da última informação objetiva de seguimento: ____/____/____

35. Situação na última informação de seguimento:

☐ 1-vivo 000 ☐ 2-vivo com CA ☐ 3-morte pós-op. ☐ 4-MOCA

☐ 5-Moass _____ ☐ 6-perdido de vista

(definição: para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como vivos 000)

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Podoplanina em carcinomas espinocelulares de lábio e sua relação com a evolução tumoral

Pesquisador: Alexandre Simões Garcia

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 01594912.2.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
FUNDO COORD DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUP

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Inclusão de Pesquisador

Justificativa: A inclusão visa ampliar o projeto inicial, com diferentes análises microscópicas da

Data do Envio: 16/12/2013

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 555.531

Data da Relatoria: 10/03/2014

Apresentação da Notificação:

Esta dentro das normas que regem o Comitê.

Objetivo da Notificação:

Inclusão de pesquisador para ampliar o projeto com diferentes análises microscópicas da mesma amostra.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Adequada, dentro da proposta.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITÁRIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8358 **Fax:** (14)3235-8358 **E-mail:** cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 555.531

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Curriculo do novo pesquisador que auxiliará no projeto, anexado.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

APROVADA em reunião extraordinária deste CEP de 10.3.2014, a inclusão da pesquisadora Agnes Assao na referida pesquisa, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Lembramos que ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados.

BAURU, 13 de Março de 2014

Assinador por:

Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br