**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

ALEXANDRE SIMÕES GARCIA

**Valor prognóstico da imunoexpressão de podoplanina e de CD44v6
na recidiva locorregional dos pacientes com câncer de lábio**

**BAURU
2017**

ALEXANDRE SIMÕES GARCIA

**Valor prognóstico da imunoexpressão de podoplanina e de CD44v6
na recidiva locorregional dos pacientes com câncer de lábio**

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

**BAURU
2017**

G165v Garcia, Alexandre Simões
Valor prognóstico da imunoexpressão de
podoplanina e de CD44v6 na recidiva locorregional dos
pacientes com câncer de lábio / Alexandre Simões
Garcia – Bauru, 2017.
112 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética Hospital do Câncer A.C. Camargo – São Paulo
Protocolo nº: 1778
Data: 21 de maio de 2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho novamente aos meus pais,
José Garcia Filho e Neusa Maria Simões Garcia, meus eternos
apoadores, tudo que conquistei nessa vida devo a vocês.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,

por me conduzir nessa longa jornada da vida

A minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira**,

a qual serei eternamente grato. Não consigo mensurar o quanto a senhora me ensinou, não só sobre patologia, mas sobre o verdadeiro valor de tudo que fazemos em nossas vidas.

Aos meus pais, **José e Neusa** e meu irmão **Daniel**,

pois não importa a hora, o local e o motivo, vocês sempre estão comigo

A minha namorada, **Laura**,

minha companheira em toda essa jornada, sempre esteve presente e pacientemente me ouviu, aconselhou, deu força e me entendeu quando eu mais precisava. Eu te amo!

Aos professores responsáveis pelo departamento, **Dr^a. Ana Lúcia Álvares Capellozza e Dr. Osny Ferreira Júnior**,

sem o apoio de vocês jamais teria ingressado na pós graduação, obrigado por me deixarem realizar um sonho.

Aos meus grandes amigos de trabalho, **Andréa Amélia dos Santos Cruz, Fernanda Aparecida Daniel Cavalari, Luciana Zanon Fontes Lozano, Marco Aurélio Rosi de Podestá e Roberto Ponce Salles**,

pelo apoio irrestrito durante todo esse período de pós graduação, sem vocês nada disso teria acontecido.

A **Kellen Cristine Tjioe e Agnes Assao**,

pela amizade e inestimável ajuda durante a idealização e execução deste trabalho.

Ao meu grande amigo, **Diego Maurício Bravo Calderón**,

mesmo distante fisicamente, se fez presente durante todo esse período, me ajudando em todos os momentos que precisei.

Aos professores, **Dr. José Humberto Damante, Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Dr. Eduardo Sanches Gonçalves**,

grandes professores e também grandes amigos, obrigado por compartilharem seus ensinamentos durante todos esses dias comigo.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia,

Fátima Aparecida Silveira, Josieli Aparecida Tripodi, Maria Cristina Rabelo do Nascimento, Marina dos Santos Corrêa e Viviane Aparecida Parisi Santos

pela amizade e prazerosa convivência no dia-a-dia.

Aos professores do Departamento de Estomatologia, **Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, Dr^a Cássia Maria Fischer Rubira, Dr. Eduardo Sant'Ana, Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho, Dr. Renato Yassutaka Faria Yaedú, Dr. Alberto Consolaro e Dr^a Vanessa Soares Lara**,

pelos ensinamentos diários e agradável convivência.

Aos meus colegas de doutorado, **Natália Galvão Garcia, José “Pepe” Burgos Ponce, Silas Antonio Juvêncio de Freitas Filho**,

pelos momentos que dividimos e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos médicos do Hospital A.C. Camargo, **Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Fernando Augusto Soares**,
pela parceria que permitiu a realização desta tese de doutorado.

À química e farmacêutica, **Suely Nonogaki**,
pela realização de todas colorações, padronizações de anticorpos e
técnica imuno-histoquímica.

Ao **Dr. André Lopes de Carvalho** e ao estatístico **Cleyton Zanardi**,
do Hospital do Câncer de Barretos, pela imensa ajuda nos testes
estatísticos e suas implicações em nossa pesquisa.

A técnica, **Tânia Mary Cestari**,
pela ajuda na captura das imagens finais da tese

Ao funcionário do setor de compras da Faculdade de Odontologia de
Bauru - USP, **Anderson Pini**,
pela grande ajuda na aquisição e manutenção do materiais de
pesquisa.

A todos os amigos,
que de alguma maneira se fizeram presente em minha vida e me
ajudaram a me tornar uma pessoa melhor a cada dia

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”*

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira 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 da Universidade de São Paulo.

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

Ao Hospital do Câncer de Barretos, na pessoa do seu diretor-geral **Henrique Prata**.

A **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa que permitiu a realização desta tese de doutorado (2012/13411-6).

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou
sobre aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar a expressão imuno-histoquímica da podoplanina e do CD44v6 pelas células malignas, verificando a associação destas proteínas com as variáveis clínicas, microscópicas, com o índice histopatológico de malignidade e com a sobrevivência livre de doença de 91 pacientes portadores de carcinomas espinocelulares (CEC) de lábio inferior, tratados no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo. Os tumores foram corados, separadamente, com os anticorpos anti-podoplanina e anti-CD44v6, sendo avaliada a imunoexpressão destas proteínas pelas células neoplásicas, no *front* de invasão tumoral, por meio de um método semi-quantitativo de escores. A associação da expressão da podoplanina e do CD44v6 com as variáveis demográficas, clínicas e microscópicas foi feita pelo teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. As taxas de sobrevivência livre de doença, acumuladas em cinco e dez anos, foram calculadas pelo teste de Kaplan-Meier e a influência das variáveis clínicas e microscópicas no prognóstico avaliadas pelo modelo de regressão de Cox. A correlação entre a podoplanina e o CD44v6 foi analisada pelo teste de Spearman. Em todos os testes estatísticos utilizou-se um nível de significância de 5%. Os resultados mostraram uma predominância da forte expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina pelas células malignas. Verificou-se uma associação significativa da podoplanina citoplasmática com a recidiva locorregional ($p=0,028$) e da podoplanina membranosa com o índice histopatológico de malignidade tumoral ($p=0,026$). O CD44v6 foi fortemente expresso pelas células neoplásicas de 95,4% dos CECs e significativamente, associado com o estadiamento clínico T ($p=0,034$). Não houve correlação entre a podoplanina e o CD44v6 nos CECs de lábio inferior. A forte expressão de podoplanina membranosa ($p=0,016$) e citoplasmática ($p=0,030$) pelas células malignas foi fator de prognóstico favorável independente na sobrevivência livre de doença. Concluímos que a podoplanina e o CD44v6 são fortemente expressos pelas células neoplásicas e que a forte imunoexpressão membranosa e citoplasmática da podoplanina pode auxiliar na identificação do risco de recidiva locorregional nos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior.

Palavras-chave: Neoplasias Bucais. Podoplanina. CD44.

ABSTRACT

Prognostic value of podoplanin and CD44v6 immunoexpressions on locoregional recurrence of the patients with lip cancer

The aim of this study was evaluate the podoplanin and CD44v6 immunohistochemical expression by malignant cells and its association with the clinical and microscopic variables, tumor histopathological grading and disease-free survival of 91 patients with lip squamous cell carcinomas (SCC), submitted to surgical treatment at Research and Treatment Center of the Cancer Hospital A.C. Camargo, São Paulo. The tumors were stained separately, with the antibodies anti-podoplanin and anti-CD44v6, and the immunoexpression of these proteins, by the neoplastic cells in the invasion front, was evaluated by a semi-quantitative scores method. Chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the association of podoplanin and CD44v6 expression with demographic, clinical, and microscopic variables. Disease-free survival in five and ten years, were calculated by the Kaplan-Meier method and the influence of clinical and microscopic variables on prognosis were evaluated by the Cox regression model. The correlation between podoplanin and CD44v6 expression was analyzed by Spearman's test and a significance level of 5% was used in all statistical tests. The results showed a predominance of strong membranous and cytoplasmic podoplanin expression by malignant cells. An association between cytoplasmic podoplanin and locoregional recurrence ($p=0,028$) and membranous podoplanin with tumor histopathological grading ($p=0,026$). CD44v6 was strongly expressed in 95.4% of the SCCs neoplastic cells and significantly associated with the clinical staging T ($p=0,034$). There was no correlation between podoplanin and CD44v6 expression in the lower lip SCC. The strong expression of membranous ($p=0.016$) and cytoplasmic ($p=0.030$) podoplanin by malignant cells was a favorable independent prognostic factor in disease-free survival. Concluding, the podoplanin and CD44v6 are strongly expressed by neoplastic cells and the strong membranous and cytoplasmic immunoexpression of podoplanin can help the identification of locoregional recurrence risk in patients with squamous cell carcinoma of the lower lip.

Keywords: Mouth Neoplasms. Podoplanin. Antigens, CD44.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 -** Características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A mucosa bucal hiperplásica adjacente à área neoplásica e carcinoma espinocelular bem diferenciado. Em B carcinoma espinocelular bem diferenciado com formação de pérolas de queratina e padrão de invasão em ilhotas largas e cordões sólidos de células neoplásicas. Em C e D detalhes das ilhotas tumorais com bordas bem delimitadas permeadas por intenso infiltrado inflamatório mononuclear (Hematoxilina e Eosina; A e B = 40X; C e D = 100x). 61
- Figura 2 -** Imunoexpressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B forte imunoexpressão da podoplanina nas células do front de invasão tumoral. Intensa imunoexpressão de podoplanina nas células periféricas e centrais das ilhotas tumorais em C e na parede dos vasos linfáticos (setas). Em D detalhe da expressão predominantemente membranosa da podoplanina nas células neoplásicas (Imuno-histoquímica: anti-podoplanina, A = 40x, B e C = 100x e D=400x). 67
- Figura 3 -** Imunoexpressão do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B intensa imunoexpressão do CD44v6 nas células do front de invasão tumoral e ausência desta expressão nas pérolas de queratina. Em C e D detalhes da intensa expressão membranosa do CD44v6 nas células neoplásicas (Imuno-histoquímica: anti-CD44v6, A = 40x, B = 100x, C e D=400x). 69
- Figura 4 -** Imunoexpressão do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e na mucosa bucal adjacente ao tumor. Em A, B e C observa-se, em diferentes localizações uma redução da imunoexpressão do CD44v6 nas células neoplásicas quando comparadas com as células da mucosa bucal. (Imuno-histoquímica: anti-CD44v6, A B e C = 100x). 73
- Figura 5 -** Sobrevivência livre de doença dos 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, de acordo com a expressão de podoplanina membranosa nas células epiteliais neoplásicas. Porcentagem de sobrevivência acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier 81
- Figura 6 -** Sobrevivência livre de doença dos 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, de acordo com a expressão de podoplanina citoplasmática nas células epiteliais neoplásicas. Porcentagem de sobrevivência acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier 82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição das características demográficas, clínicas e microscópicas dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 59
- Tabela 2** - Distribuição da avaliação de malignidade tumoral dos 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 63
- Tabela 3** - Distribuição da expressão forte de podoplanina membranosa e citoplasmática e do CD44v6 pelas células malignas do front de invasão tumoral dos 91 pacientes com câncer de lábio, segundo as características clínicas e demográficas, vícios, tamanho da lesão, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 65
- Tabela 4** - Distribuição da expressão forte de podoplanina membranosa e citoplasmática e do CD44v6 pelas células malignas do front de invasão tumoral dos 91 pacientes com câncer de lábio, segundo as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 66
- Tabela 5** - Distribuição da intensidade de marcação do CD44v6 nas células do front de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e da mucosa bucal adjacente. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 71
- Tabela 6** - Comparação da intensidade de expressão forte e intensa do CD44v6 entre as células do front de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e a mucosa bucal adjacente. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 71
- Tabela 7** - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica da podoplanina membranosa e citoplasmática e o CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 75
- Tabela 8** - Análise da sobrevivência livre de doença acumulada em 5 e 10 anos, pelo método de Kaplan-Meier dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, clínicas e microscópicas. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009. 78

Tabela 9 - Análise da sobrevivência livre de doença acumulada por meio do modelo de Cox, envolvendo podoplanina membranosa e estadiamento clínico T, dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

79

Tabela 10 - Análise da sobrevivência livre de doença acumulada por meio do modelo de Cox, envolvendo podoplanina citoplasmática e estadiamento clínico T, dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009.

79

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
<	menor
≤	menor ou igual
:	proporção
=	igual
+	positivo
-	negativo
nº	número
µm	Micrometro
CA	Califórnia
Co	<i>Corporation</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
BSA	Albumina de soro bovino
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEC	carcinoma espinocelular
CECs	carcinomas espinocelulares
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
DAB	<i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERM	ezrin, radixin, moesin
EUA	Estados Unidos da América
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GTPase	Enzima hidrolase de Guanosina Trifosfato
HE	hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
h	hora
Il	Illinois
mL	mililitro
mM	milimol
MOCI	morte por intercorrência cirúrgica
MOCA	morte decorrente de câncer
MOASS	morte por intercorrência cirúrgica
NaN ₃	azida sódica
OMS	Organização Mundial de Saúde

p	nível de significância
PBS	solução salina fosfatada tamponada
pH	concentração hidrogeniônica
pN	comprometimento linfonodal histopatológico
pN0	ausência de comprometimento linfonodal histopatológico
pN+	presença de comprometimento linfonodal histopatológico
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SP	Estado de São Paulo
SPSS	Statistics Standard Edition Software
TNM	Sistema de Classificação Tumores Malignos (Tumor Node Metastasis)
T1	tumor com até 2 cm em sua maior extensão
T2	tumor com mais de 2 cm até cm em sua maior extensão
T3	tumor com mais de 4 cm em sua maior extensão
T4	Tumor com mais de 4 cm em sua maior extensão, invadindo estruturas adjacentes
UICC	Union for International Cancer Control
Vivo 000	vivo sem evidência de doença

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	PROTEÍNA PODOPLANINA E CÂNCER	27
2.2	PODOPLANINA E CÂNCER DE BOCA	28
2.3	CD44 E CÂNCER DE BOCA	33
3	PROPOSIÇÃO	39
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	43
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	45
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	46
4.3	VARIÁVEIS DE ESTUDO	46
4.4	ANÁLISE MICROSCÓPICA	47
4.4.1	Análise morfológica em Hematoxilina e Eosina e graduação histopatológica da malignidade tumoral	47
4.4.2	Técnica imuno-histoquímica	48
4.4.3	Avaliação imuno-histoquímica	50
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4.6	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	53
4.7	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	53
5	RESULTADOS	55
5.1	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	57
5.1.1	Casuística	57

5.1.2	Características demográficas, clínicas e microscópicas da população de estudo	57
5.1.3	Graduação histopatológica da malignidade tumoral	63
5.2	EXPRESSÃO DA PODOPLANINA E DO CD44v6 EM CÂNCER DE LÁBIO	64
5.2.1	Correlação entre a expressão de podoplanina e CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior	75
5.3	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA	75
6	DISCUSSÃO	83
7	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO	107

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de lábio inferior consiste em um tumor geralmente indolente, de pequena dimensão e com raras metástases, entretanto, a ocorrência de recidivas locorregionais permanece como um dos fatores que afeta diretamente a evolução clínica e o prognóstico dos pacientes (BON-MARDION et al., 2015; BIASOLI et al., 2016; BOZAN et al., 2016; OZKUL et al., 2016). Mesmo com evidências de que o desenvolvimento e a progressão dos carcinomas espinocelulares de boca, incluindo aqueles de lábio, consiste em um processo complexo de longa duração e múltiplas etapas, os mecanismos moleculares envolvidos nessa progressão tumoral ainda não foram totalmente estabelecidos (DE VICENTE et al., 2015; PARHAR et al., 2015; SAWANT et al., 2016). Devido a isso, as pesquisas envolvendo contribuições relativas ao comportamento das células neoplásicas, baseadas nas suas expressões proteicas continuam tendo um valor inestimável visando o entendimento da biologia tumoral.

Nas últimas décadas uma pequena glicoproteína transmembrana, reconhecida pelo anticorpo anti-D2-40, que foi inicialmente descrita por Wetterwald et al. (1996) com a denominação de antígeno E11, e posteriormente, denominada podoplanina por Breiteneder-Geleff et al. (1997), foi amplamente estudada em neoplasias malignas de cabeça e pescoço (BARTULI et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; SEKI et al., 2014; PARHAR et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016). Ela é especificamente expressa em células endoteliais linfáticas, porém não em endotélio vascular sanguíneo, tornando-a o principal marcador dos vasos linfáticos (WENINGER et al., 1999; BIRNER et al., 2000; BIRNER et al., 2001).

Estudos comprovaram que a alta expressão de podoplanina estava diretamente relacionada ao processo de invasão, individual (MARTIN et al., 2003; PUJUGUET et al., 2003) ou em grupo (WICKI et al., 2006), das células neoplásicas. Particularmente na região de cabeça e pescoço, a alta expressão da podoplanina no carcinoma espinocelular foi correlacionada com uma maior taxa de metástases linfonodais e menor sobrevivência livre de doença para os pacientes (YUAN et al.,

2006; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; MONTEIRO et al., 2016).

Por outro lado, uma recente pesquisa demonstrou, em linhagens de carcinomas espinocelulares de boca, que a podoplanina juntamente com o CD44 tem um papel primário no processo de adesão celular e, que as células neoplásicas sem expressão de podoplanina eram menos diferenciadas e invadiam mais frequentemente os vasos linfáticos. Com base nesses achados, os autores (TSUNEKI et al., 2013) sugeriram que a função fundamental da podoplanina consiste em mediar à adesão das células malignas a matriz extracelular. Posteriormente, outra investigação confirmou uma associação da expressão de podoplanina com o grau de diferenciação tumoral de carcinomas espinocelulares de boca, mostrando que os tumores menos diferenciados apresentavam menor expressão dessa proteína (DE VICENTE et al., 2015).

Estas constatações descritas acima reforçam que o papel exato da podoplanina no carcinoma espinocelular de boca permanece pouco esclarecido.

Em nossas primeiras investigações relacionadas à expressão de podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, detectamos uma expressão forte e conjunta dessa proteína com a molécula ezrina, uma das proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina, moesina), em biópsias incisionais de neoplasias malignas de lábio (GARCIA AS et al., 2014). Em outro estudo (ASSAO et al., 2016), de peças cirúrgicas de carcinomas espinocelulares de lábio, verificamos uma correlação da expressão da podoplanina, com a ezrina e com a GTPase RhoA, no *front* de invasão tumoral, sugerindo que estas proteínas participam, conjuntamente, nos processos de movimentação celular e invasão tumoral.

Um estudo interessante de Martin-Villar et al. (2010) demonstrou uma regulação conjunta aumentada da podoplanina e da isoforma padrão do CD44 durante a progressão maligna, na carcinogênese quimicamente induzida, em pele de camundongos. Estes pesquisadores comprovaram que, a podoplanina promoveu a persistência direcionada da mobilidade nas células epiteliais, uma característica que requer o CD44 e, que ambas as proteínas cooperaram no processo de migração das células do carcinoma espinocelular durante a carcinogênese.

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana que atua principalmente no processo de adesão entre as células e a matriz extracelular (LYONS; JONES, 2007; MACK; GIRES, 2008; NAGANO; OKAZAKI; SAYA, 2013). Além da alteração da

expressão desta proteína em neoplasias malignas, ela é utilizada como marcador de células tronco tumorais, que são células com propriedades de autorrenovação e tem relação com iniciação, progressão e resistência a tratamentos (ATSUMI et al., 2008; ISLAM et al., 2015; SAWANT et al., 2016). Dentre as isoformas do CD44, a variante CD44v6 possui grande influência na progressão dos tumores, invasão das células e formação de metástases (MONROE et al., 2011; YANAMOTO et al., 2014; PATEL; RAWAL, 2016).

Assim como ocorre com a podoplanina, são encontrados na literatura resultados controversos relatando aumento na expressão do CD44v6 em neoplasias malignas de cabeça e pescoço pouco diferenciadas e mais agressivas (ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIU et al., 2014; YANAMOTO et al., 2014; SAWANT et al., 2016), outros reportando uma redução da expressão da molécula nesses tipos de neoplasias (BAHAR et al., 1997; KUNISHI; KAYADA; YOSHIGA, 1997; SOUKKA et al., 1997; GARCIA-MONTESINOS-PEREA; VAL-BERNAL; SAIZ-BUSTILLO, 2005) e ainda, alguns estudos não relatando nenhuma relação entre a expressão da proteína com a agressividade dos tumores e/ou com o prognóstico dos pacientes (RAUTAVA et al., 2003; CRUZ et al., 2009; YU et al., 2015).

Entretanto, existe pouca evidência da distribuição conjunta da podoplanina e do CD44v6 em carcinomas espinocelulares de lábio e sua participação na evolução clínica tumoral e, portanto, para responder esta questão, nós propusemos o presente trabalho.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEÍNA PODOPLANINA E CÂNCER

A podoplanina humana é uma glicoproteína transmembrana tipo I constituída por 162 aminoácidos, sendo nove destes de domínio intracelular (SCHACHT et al., 2003; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; NODA et al., 2010; SWAIN et al., 2014), que foi inicialmente descrita por Wetterwald et al. (1996), sob a designação de antígeno E11. Atualmente, o marcador anti-podoplanina mais utilizado é o D2-40 (ORDONEZ, 2006).

Trabalhos envolvendo alterações na expressão de podoplanina em neoplasias malignas vêm se tornando cada vez mais comuns, porém o real papel dessa proteína na carcinogênese ainda é desconhecido (TSUNEKI et al., 2013; DE VICENTE et al., 2015; PARHAR et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016).

Pesquisas demonstraram que o aumento da expressão de podoplanina em células neoplásicas, resultava na perda de características epiteliais tornando estas, células com fenótipo mesenquimal, fenômeno conhecido como transição epitélio mesenquima (SCHOLL et al., 1999; MARTIN-VILLAR et al., 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2006). Essas alterações podem ser explicadas pela propriedade da porção intracelular da podoplanina se ligar as proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina e moesina), e posteriormente ativar a GTPase RhoA, induzindo alterações no citoesqueleto celular com formação de filopódios, característica essencial para o processo de invasão celular individual (MARTIN et al., 2003; PUJUGUET et al., 2003; MARTIN-VILLAR et al., 2006). A imunoexpressão da podoplanina juntamente com a ezrina e com GTPase RhoA em carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi demonstrada em um estudo anterior de nosso grupo, sugerindo a participação conjunta dessas proteínas no processo de movimentação e invasão das células malignas (ASSAO et al., 2016)

Por outro lado a pesquisa de Wicki et al. (2006) demonstrou, em uma cultura de células de carcinoma de mama (MCF7), que as células neoplásicas com expressão de podoplanina, não perdiam suas características epiteliais, mas sim invadiam os tecidos em grupos de células, demonstrando que a podoplanina pode atuar de maneiras diferentes na carcinogênese, dependendo do tecido que originou a neoplasia.

A recente busca por marcadores de células tronco tumorais revelou que a podoplanina pode ser uma proteína expressa por essas células pluripotentes em diferentes tipo de neoplasias malignas como gliomas (DAHLROT et al., 2013) e carcinomas espinocelulares de pulmão (SHIMADA et al., 2009), de pele (ATSUMI et al., 2008) e de esôfago (ISLAM et al., 2015), no entanto, os estudos ainda são escassos e outras pesquisas são necessárias para utilizar essa proteína para este fim.

2.2 PODOPLANINA E CÂNCER DE BOCA

Com as evidências científicas do envolvimento da podoplanina na carcinogênese bucal, alguns estudos investigaram se havia alteração da expressão dessa proteína em lesões potencialmente malignas orais, principalmente leucoplasias. Os estudos demonstraram no grupo controle marcação para podoplanina praticamente nula, algumas vezes aparecendo na camada basal do epitélio (DE VICENTE et al., 2013; LOGESWARI et al., 2014; PARHAR et al., 2015). Em apenas um estudo não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e as leucoplasias, no entanto, nesse mesmo estudo foi detectado diferença entre a expressão da podoplanina entre leucoplasias homogêneas e não homogêneas (D'SOUZA; NAYAK; KOTRASHETTI, 2016). Por outro lado, diversas pesquisas demonstraram um aumento da expressão da podoplanina relacionado com maior grau de displasia e maior risco de progressão tumoral, sugerindo a podoplanina como um potencial marcador de transformação tumoral em leucoplasias bucais (KAWAGUCHI et al., 2008; DE VICENTE et al., 2013; LOGESWARI et al., 2014; PARHAR et al., 2015; PATIL et al., 2015).

De 2006 a 2012 foram publicados os primeiros estudos (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012) relacionando a

intensidade da expressão da podoplanina pelas células neoplásicas com o prognóstico dos pacientes portadores de câncer bucal. Utilizando-se principalmente da técnica de imuno-histoquímica e analisando carcinomas espinocelulares bucais, os resultados destes diferentes estudos foram muito similares demonstrando uma relação da forte expressão da podoplanina com a evolução clínica desfavorável dos carcinomas espinocelulares de boca, ocorrência de metástases e pior prognóstico para os pacientes (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012). Além disso, foi sugerido que a interferência nas funções da podoplanina poderia representar uma nova estratégia terapêutica para o combate ao câncer em estágio avançado (CUENI et al., 2010), e que a expressão de podoplanina pelo tumor primário poderia indicar a presença de metástases ocultas em linfonodos regionais, recomendando-se o esvaziamento cervical do paciente (HUBER et al., 2011).

A partir de 2013, várias outras investigações relacionando a podoplanina em câncer de boca foram publicadas na literatura inglesa buscando entender a participação e o valor prognóstico deste biomarcador para os pacientes com carcinoma espinocelular de boca (DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; TSUNEKI et al., 2013; SEKI et al., 2014; DE VICENTE et al., 2015; PARHAR et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016; MERMOD et al., 2017).

Um estudo mais criterioso visando entender o papel da podoplanina na interação das células neoplásicas com a matriz extracelular foi realizado utilizando-se as técnicas de cultura de células, imunofluorescência, *western blotting*, PCR em tempo real e de imuno-histoquímica em 44 carcinomas espinocelulares de boca e em cinco linhagens de tumores epiteliais bucais (ZK-1, ZK-2, MK-1, ACC-2 e ACC-3). A avaliação imuno-histoquímica demonstrou que 68,1% dos tumores expressavam podoplanina e esses tumores positivos para a proteína foram associados significativamente com a idade dos pacientes (<50 anos), com os tumores bem diferenciados, com a menor recorrência local e a ausência de invasão linfática. Utilizando a linhagem ZK-1 de carcinoma espinocelular de boca, os autores notaram que tumores sem a expressão de podoplanina eram classificados como menos diferenciados e invadiam vasos linfáticos com mais frequência, além de ter as propriedades adesivas com a matriz extracelular, significativamente, inibidas. As propriedades de migração das células neoplásicas não foram alteradas na ausência da podoplanina. Os autores concluíram que a função primária da podoplanina em

neoplasias malignas da cavidade bucal esta relacionada à adesão das células a matriz extracelular, e os efeitos na proliferação e migração das células podem ser secundários a adesão estabelecida (TSUNEKI et al., 2013).

Também em nosso grupo de pesquisa, foi analisada a expressão de podoplanina e VEGF-C pela técnica de imuno-histoquímica em 42 carcinomas espinocelulares de boca. A imunomarcagem da podoplanina foi encontrada na membrana e/ou no citoplasma das células neoplásicas, já o VEGF-C foi predominantemente citoplasmático. A alta expressão de podoplanina foi associada com gênero masculino e com estadiamento clínicos T1 e T2. A alta intensidade de podoplanina foi frequentemente encontrada em pacientes com invasão perineural, no entanto, nem a intensa expressão dessa proteína como do VEGF-C foram associados com o prognóstico dos pacientes, somente uma tendência a maior intensidade desses marcadores em neoplasias recidivantes. Os autores concluíram que a podoplanina e o VEGF-C estavam associados com infiltração perineural nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca (DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013).

Um novo estudo com o intuito de desenvolver um modelo prático envolvendo intensidade de expressão de podoplanina e prognóstico, avaliou 82 carcinomas espinocelulares de boca pela técnica de imuno-histoquímica para podoplanina e Ki-67. Desse total de tumores, 66 eram bem diferenciados, 10 moderadamente diferenciados e 6 pouco diferenciados. Os resultados demonstraram que a idade do paciente, modo de invasão, intensidade da marcação da podoplanina (>50% de células imunomarcadas) e estadiamento T e N estavam relacionados com pior prognóstico para os pacientes. Os autores concluíram que a expressão de podoplanina estava correlacionada com estadiamentos clínicos avançados e com a expressão de Ki-67 e sugeriram a criação de um novo protocolo para avaliar o prognóstico dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca baseado na idade, no padrão de invasão tumoral, na expressão de podoplanina e no estadiamento clínico T (SEKI et al., 2014).

Recentemente, Parhar et al. (2015) avaliaram pela técnica de imuno-histoquímica a expressão da podoplanina e a densidade de vasos linfáticos em 10 fragmentos de mucosa oral, 30 leucoplasias (15 com displasia epitelial moderada e 15 com displasia epitelial severa) e 30 carcinomas espinocelulares de boca (10 bem diferenciados, 10 moderadamente diferenciados e 10 pouco diferenciados).

Enquanto a expressão da podoplanina foi quase nula na mucosa bucal normal, 76,6% das leucoplasias foram positivas para essa proteína, aumentando a intensidade juntamente com o grau de displasia epitelial. Diferenças significativas foram encontradas quando comparadas a mucosa bucal normal com as leucoplasias ($p<0.001$); as leucoplasias moderadamente diferenciadas com as pouco diferenciadas ($p<0.028$) e entre os carcinomas espinocelulares e as leucoplasias ($p<0.001$). Curiosamente, a intensidade da marcação da podoplanina foi diminuindo com a perda da diferenciação das células nos carcinomas espinocelulares de boca. Também foi notado um aumento na densidade de vasos linfáticos quando comparado à mucosa bucal normal com as leucoplasias e as leucoplasias com os carcinomas espinocelulares. Os autores concluíram que a podoplanina é um forte fator para o início do desenvolvimento do carcinoma espinocelular de boca, mas não parece ser essencial para a progressão desta neoplasia.

Também Vicente et al. (2015) avaliaram a imunoexpressão da podoplanina nos carcinomas de cabeça e pescoço em 92 carcinomas de espinocelulares de cabeça e pescoço (58 bem diferenciados, 28 moderadamente diferenciados e 6 pouco diferenciados). Os tumores foram avaliados levando em consideração a quantidade e a intensidade das células positivas para esta proteína, revelando forte marcação em 43% dos tumores bem e moderadamente diferenciados e em 12% dos tumores pouco diferenciados. A alta expressão de podoplanina foi relacionada com o grau histológico do tumor ($p=0,003$), no entanto, essa proteína não foi fator de prognóstico independente para os pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de boca. Os autores concluíram que a significância clínica da expressão da podoplanina ainda permanece obscura e mais estudos são necessários para saber se a expressão dessa proteína pode ser usada como biomarcador de metástases e de pior prognóstico (VICENTE et al., 2015).

A relação da podoplanina e de outros biomarcadores e seu significado no prognóstico de 60 pacientes portadores de carcinomas espinocelulares de boca foi descrita em um recente estudo avaliando-se a expressão da podoplanina, proteína p63, metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) e do CD44v6, pela técnica de imuno-histoquímica em 60 carcinomas espinocelulares de boca, com o intuito de entender o papel dessas moléculas no prognóstico dos pacientes. Os resultados mostraram que a podoplanina e o CD44v6 foram expressos na membrana das células neoplásicas em 94% dos tumores, p63 em 96,5% dos tumores com uma marcação

predominantemente nuclear e o MMP9 no citoplasma das células neoplásicas em 83,7% dos tumores analisados. A expressão de podoplanina foi associada com a de MMP9 ($p=0,01$) e ambos foram associados com metástase linfonodal ($p=0,011$ e $0,018$ respectivamente). A co-expressão da podoplanina com o MMP-9 foram fatores independentes associados ao pior prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular oral, tanto na sobrevida específica por câncer como na livre de doença. Os autores concluíram que todas as moléculas estudadas estão presentes em carcinomas espinocelulares de boca e que tumores com alta expressão de podoplanina e MMP-9 estão mais propensos a produzir metástases e com isso diretamente relacionados com pior prognóstico dos pacientes. A combinação dessas proteínas pode ser utilizada no futuro como biomarcador de prognóstico nesse tipo de neoplasia e essas proteínas devem ser analisadas como alvos para terapias moleculares (MONTEIRO et al., 2016).

A pesquisa mais recente nesse tema avaliou a correlação entre a expressão de podoplanina pelas células tumorais e a disseminação extracapsular, utilizando a técnica de imuno-histoquímica em carcinomas espinocelulares primários de cabeça e pescoço. Foram analisados 67 tumores sendo 34 (51%) desses pN0 e 33 pN+ (49%), sendo a expressão da podoplanina predominantemente membranosa, aparecendo no citoplasma das células tumorais eventualmente. Um total de 39 tumores primários (58%) demonstrou forte marcação para podoplanina, enquanto nas metástases linfonodais 21 das 33 avaliadas (63,6%) apresentaram forte expressão desta proteína. A expressão da podoplanina nos tumores primários foi associada, significativamente, com a metástase tumoral e o índice de malignidade de Bryne e nos linfonodos metastáticos a expressão de podoplanina foi relacionada somente com a disseminação extracapsular. Os autores concluíram que a alta expressão de podoplanina em linfonodos metastáticos de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço é fator independente relacionado com disseminação extracapsular (MERMOD et al., 2017).

2.3 CD44 E CÂNCER DE BOCA

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana, pertencente à família das moléculas de adesão, codificada por um único gene localizado no cromossomo 11p13, podendo se apresentar de diferentes formas, devido a alternância que os éxons são inseridos no RNAm, dando origem a diversas variantes dessa molécula (BORLAND; ROSS; GUY, 1998; NAOR et al., 2008; KAROUSOU et al., 2016; THAPA; WILSON, 2016).

Essa proteína atua como o principal receptor do ácido hialurônico, uma das moléculas da matriz extracelular, sendo assim, alterações em sua expressão influenciam diretamente a adesão e a migração das células epiteliais (LYONS; JONES, 2007; MACK; GIRES, 2008; NAGANO; OKAZAKI; SAYA, 2013). Dentre as variantes do CD44 a isoforma v6 possui grande influência na progressão dos tumores, invasão das células e formação de metástases (VAN HAL et al., 1999; MONROE et al., 2011) sendo uma das variantes mais expressas em células tronco tumorais derivadas de tumores de cabeça e pescoço (YANAMOTO et al., 2014; PATEL; RAWAL, 2016).

Células tronco tumorais consistem em uma subpopulação com características de auto renovação e certo grau de pluripotência, possuindo relação direta com a iniciação e a progressão tumoral, além de serem responsáveis pela resistência a tratamentos antineoplásicos convencionais (ATSUMI et al., 2008; MONROE et al., 2011; CHEN et al., 2014). Alguns estudos mostraram que carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço com alto número de células tronco tumorais, identificadas pelo CD44v6, apresentaram maior agressividade e pior prognóstico para os pacientes (YANAMOTO et al., 2014; SAWANT et al., 2016). Entretanto, a expressão individual do CD44v6 não é suficiente para identificar as células tronco tumorais nas neoplasias malignas, sendo necessário outros marcadores para confirmar a existência dessas células pluripotentes (MACK; GIRES, 2008; BIDAUD et al., 2010; MONROE et al., 2011).

Em relação à existência de uma interação entre as proteínas transmembrana CD44 com a podoplanina na carcinogênese foi demonstrado em estudo, com animais, que ambas as moléculas estariam relacionadas no processo de migração e invasão das células de carcinomas espinocelulares da pele de ratos (MARTIN-VILLAR et al., 2010). Essa interação foi confirmada em uma linhagem de

carcinomas espinocelulares de boca (ZK-1) onde pela técnica de imunofluorescência a expressão conjunta de ambas as proteínas foi observada na membrana das células neoplásicas pertencentes a ilhotas tumorais. Interessantemente, quando ocorria a separação dessas células neoplásicas das ilhotas a expressão da podoplanina e do CD44 era perdida, reforçando a teoria dos autores de que essas proteínas estariam envolvidas, primariamente, na adesão das células tumorais (TSUNEKI et al., 2013).

As evidências apresentadas acima, esclarecem os resultados encontrados nas pesquisas iniciais com carcinomas espinocelulares de boca com expressão de CD44v6, onde tumores com baixa expressão desta proteína apresentaram-se menos diferenciados e com maiores taxas de metástase, quando comparados aqueles com forte expressão dessa molécula (BAHAR et al., 1997; KUNISHI; KAYADA; YOSHIGA, 1997; SOUKKA et al., 1997).

A década de 90 ainda trouxe outros estudos avaliando a associação da imunoexpressão do CD44v6 com o desenvolvimento e progressão dos carcinomas espinocelulares de boca (HEROLD-MENDE et al., 1996; KUO et al., 1998; OLIVEIRA; SHERRIFF; ODELL, 1998; VAN HAL et al., 1999). Os resultados destas pesquisas concluíram que não havia alteração na expressão do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de boca avaliados (HEROLD-MENDE et al., 1996; KUO et al., 1998; OLIVEIRA; SHERRIFF; ODELL, 1998). Também, uma investigação onde foi utilizada três variantes de anticorpos para CD44v6 em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, constatou-se que havia uma pequena redução na expressão dessa proteína nas margens das neoplasias avaliadas, no entanto, essa redução não foi significativa quando comparada com a expressão dessa molécula nas amostras de mucosa bucal sem alterações (VAN HAL et al., 1999).

Os diferentes resultados encontrados nos estudos relatados acima, induziram uma busca mais ampla sobre o real papel do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de boca. A seguir, elaboramos uma breve revisão, incluindo as duas ultimas décadas, das principais pesquisas sobre este tema.

Com o intuito de analisar as alterações na imunoexpressão do CD44v6 e sua função no desenvolvimento dos carcinomas espinocelulares de boca, foram avaliadas 29 displasias epiteliais da cavidade bucal, 13 fragmentos de mucosa bucal sem alterações e 51 carcinomas espinocelulares primários de boca (21 bem

diferenciados, 26 moderadamente diferenciados e 4 pouco diferenciados). Nos fragmentos de mucosa bucal a marcação foi homogênea e negativa na camada córnea. Nas displasias epiteliais e carcinomas espinocelulares a imunomarcação demonstrou padrões heterogêneos. Não foi encontrado nenhuma relação estatisticamente significativa entre a marcação do CD44v6 e a progressão das displasias analisadas. Os autores concluíram que os níveis de expressão do CD44v6 não ajudaram a prever a evolução das displasias epiteliais encontradas na cavidade bucal (RAUTAVA et al., 2003).

Uma interessante pesquisa avaliou a imunomarcação do c-erb-B2, p53, bcl-2, Ki-67 e CD44v6 pelas células neoplásicas, e sua influência no prognóstico de pacientes com carcinoma espinocelular de lábio. Foram utilizados 79 tumores sendo 75% destes positivos para c-erb-B2, 70,6% para p53, 3,8% para bcl-2, 89,9% para CD44v6 e de 0 a 6,29% para o Ki-67. Todos os marcadores analisados não mostraram influência no prognóstico dos pacientes, com exceção do CD44v6 onde pacientes cujos tumores expressavam essa molécula tiveram maior sobrevida quando comparados aqueles com tumores negativos para essa marcação. Os pesquisadores concluíram que a análise imuno-histoquímica para esses marcadores nos carcinomas espinocelulares de lábio não deve ser utilizada na rotina de diagnósticos, devido ao seu alto custo e pouca relevância no prognóstico dos pacientes com câncer de lábio (GARCIA-MONTESINOS-PEREA; VAL-BERNAL; SAIZ-BUSTILLO, 2005).

Um importante estudo avaliou a expressão do CD44s e do CD44v6, pela técnica imuno-histoquímica em 10 fragmentos de mucosa bucal, 21 leucoplasias, 2 carcinomas *in situ* e 24 carcinomas espinocelulares de boca. Os resultados encontrados foram controversos, pois houve um aumento de expressão de ambas as proteínas quando foi comparado o epitélio da mucosa bucal normal e as leucoplasias bucais ($p=0,05$ para CD44s e $p=0,03$ para CD44v6), porém não houve alteração no nível das proteínas quando comparado a mucosa bucal normal com os carcinomas espinocelulares *in situ* e moderadamente diferenciados. Houve somente uma redução na imunexpressão das proteínas nos carcinomas espinocelulares pouco diferenciados. Com os resultados obtidos os autores concluíram que não se pode diferenciar tecidos sem alterações e neoplasias de origem epitelial proveniente de cabeça e pescoço com o auxílio da marcação do CD44s e CD44v6 e necessita-se de uma revisão para confirmar a utilização do CD44s como marcador de célula

tronco tumoral em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (MACK; GIRES, 2008).

Tentando investigar a associação entre a imunexpressão do CD44v6 e a E-caderina em carcinomas espinocelulares de boca foram analisados 15 tumores de língua e 15 tumores de lábio inferior. Os resultados demonstraram um padrão de marcação focal e heterogêneo para ambos os marcadores. Para E-caderina, 50% dos tumores de lábio apresentaram imunexpressão positiva em 26 a 50% das células neoplásicas e nas neoplasias de língua 50% dos tumores foram positivos para essa proteína, com menos de 25% das células neoplásicas marcadas. Em relação ao CD44v6, 50% dos tumores de lábio inferior e língua apresentaram menos de 25% das células positivas. Não houve diferença na marcação das proteínas quando comparados com ocorrência ou não de metástases linfonodais ($p>0,05$). Tumores com baixo grau de malignidade revelaram maior imunexpressão de ambas as proteínas quando comparados com os de alto grau de malignidade (E-caderina $p=0,005$; CD44v6 $p=0,003$). Os autores concluíram que não existia diferença na expressão da E-caderina e CD44v6 em carcinomas espinocelulares de língua e lábio e que ambos marcadores não ajudam a elucidar o comportamento biológico tumoral (CRUZ et al., 2009).

Utilizando cultura de células neoplásicas provenientes de carcinomas espinocelulares de boca e de cabeça e pescoço e empregando as técnicas de PCR em tempo real, citometria de fluxo e imunofluorescência, foram avaliadas a expressão de CD44v1,2, CD44v4 e CD44v6 em 10 diferentes linhagens de células neoplásicas e em queratinócitos normais. Enquanto o CD44v1,2 foi expresso somente nos queratinócitos sem alteração, as isoformas v4 e v6 foram expressas abundantemente nas linhagens de neoplasias de cabeça e pescoço, principalmente em células pequenas (característica associada com células tronco tumorais) e com morfologia mesenquimal (característica associada com perfil invasivo e migratório das células neoplásicas). Interessantemente, os tumores de cabeça e pescoço que obtiveram os maiores níveis de expressão do CD44v6 foram as neoplasias avançadas com ocorrências de metástases, e os tumores que apresentavam alto nível de expressão do CD44v4 foram resistentes a quimioterapia e recidivaram. A linhagem de carcinoma espinocelular de boca expressou altos níveis de CD44v4 e v6, sendo esses associados com o estadiamento dos pacientes e uma grande tendência a recorrência e metástase. Os autores concluíram que a expressão

dessas proteínas por carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço pode ser um indício de mudanças morfológicas nas células neoplásicas, levando a progressão tumoral (ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU et al., 2014).

Com base na agressividade dos carcinomas espinocelulares de língua foram avaliados a expressão de CD147, CD44v6, Tp63, Ki-67 e Glut-1, utilizando a técnica de micro arranjo e imuno-histoquímica em 32 amostras de carcinomas espinocelulares de língua. As marcações para CD147, CD44v6 e Glut-1 foram predominantemente na membrana das células tumorais, com marcação citoplasmática difusa e fraca. Por outro lado, a marcação para Tp63 e Ki-67 foi nuclear e em diferentes intensidades. A alta expressão de CD147 foi associada com tumores de estadiamento clínico avançado ($p=0,004$), sendo mais comuns em pacientes não fumantes. A alta expressão de Glut-1 foi associada com tumores com estadiamento T avançado ($p=0,01$) e alta marcação para Tp63 com tumores de tamanho maior ($p=0,04$) e neoplasias pouco diferenciadas ($p=0,001$). O Ki-67 obteve associação com graduação histológica tumoral e tamanho das neoplasias ($p<0,05$) além de menor sobrevida para os pacientes. O CD44v6 não obteve nenhuma associação com as variáveis analisadas. Os pacientes com tumores que apresentaram, conjuntamente, alta expressão de Ki-67 e CD147 tiveram uma menor sobrevida global ($p=0,045$). Com base nesses resultados os autores concluíram que os carcinomas espinocelulares de língua com alta expressão de Ki-67 e CD147 eram mais agressivos e de pior prognóstico (YU et al., 2015).

Com base nesta revisão de literatura pode-se verificar que o papel da expressão do CD44v6 e sua influência na iniciação e progressão dos carcinomas espinocelulares da cavidade bucal ainda não está claro e é alvo de muita discussão. Assim sendo, neste trabalho, nos propusemos a investigar a expressão do CD44v6 e da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio e verificar se existe correlação entre esses biomarcadores e se a expressão dessas proteínas podem influenciar na ocorrência de recidivas locorregionais.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

- A) A partir da análise microscópica de 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, com estadiamento clínico I, II, III e IV, propôs-se:
- avaliar e correlacionar a expressão imuno-histoquímica da podoplanina e do CD44v6 pelas células epiteliais neoplásicas;
 - analisar a associação entre a expressão da podoplanina e do CD44v6 com as variáveis clínico-patológicas e com o índice histopatológico de malignidade tumoral;
 - verificar a influência da expressão do CD44v6 e da podoplanina na sobrevivência livre de doença dos pacientes com câncer de lábio
- B) Contribuir com o conhecimento sobre a expressão concomitante da podoplanina e do CD44v6 nas células neoplásicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e seu significado na evolução clínica e no prognóstico dos pacientes.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi formada por pacientes submetidos à cirurgia de excisão total de lesões em lábio inferior, cujo resultado do exame anatomopatológico foi carcinoma espinocelular, independente do grau de diferenciação. Todos os pacientes foram tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia pertencente ao Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, no período de 1970 a 2009.

Todos os prontuários, com diagnóstico de carcinoma espinocelular em lábio inferior e as lâminas contendo os cortes microscópicos destes tumores, no período supracitado, foram incluídos em nosso levantamento, sendo aplicados os seguintes critérios de inclusão:

- pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular com estadiamento clínico I, II, III ou IV, localizados em lábio inferior, confirmado pela histopatologia;
- ausência de outros tumores primários simultâneos;
- seguimento clínico completo;
- ausência de tratamento prévio a cirurgia;
- disponibilidade e adequada conservação dos blocos de parafina dos tumores estudados;
- volume de material emblocado suficiente para a análise microscópica e imuno-histoquímica.

Após a aplicação dos critérios de inclusão, foram selecionados 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior para compor a amostra da pesquisa.

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações referentes aos pacientes e ao seguimento clínico foram obtidas a partir dos prontuários pertencentes ao Serviço de Arquivo Médico (SAME) do Centro de Tratamento de Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, de onde foram extraídas as seguintes informações: gênero, idade, raça, tabagismo, etilismo, diâmetro e tipo da lesão, comprometimento da linha média, estadiamento T e N, radioterapia pós-operatória e ocorrência de recidiva (local e regional). Dos laudos histopatológicos foram extraídas as informações sobre graduação da neoplasia, infiltração perineural, muscular e glandular, embolização vascular, margens comprometidas e presença ou não de linfonodos comprometidos, quantidade e localização desses linfonodos. Todas as informações foram contabilizadas em um formulário próprio (Anexo A) inclusive o seguimento clínico dos pacientes, no caso de pacientes vivos, a evolução clínica foi atualizada até o ano de 2014.

4.3 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As informações utilizadas neste estudo referem-se aos dados demográficos relativos aos pacientes como a idade, gênero (masculino e feminino) e raça (branca e não branca).

Quanto à história clínica do paciente pesquisou-se o tempo de evolução do tumor (meses), tabagismo (fumante ou não fumante) e etilismo (etilista ou não etilista).

Ao exame clínico locorregional, foi avaliada o tipo de lesão (úlcero-vegetante, ulcero-infiltrativa, outros), o comprometimento ou não da linha média, o diâmetro aproximado da lesão e o estadiamento clínico T e N.

A classificação clínica adotada pelo Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A. C. Camargo segue o sistema TNM/UICC (SOBIN; WITTEKIND, 2002) e, portanto, os pacientes do estudo foram classificados pelos estádios clínicos T (T1, T2, T3 ou T4), N (N0 ou N+) e M (M0 ou M+).

Quanto ao tratamento, foi levantada a data da cirurgia, a realização ou não de esvaziamento cervical dos linfonodos (ipsilateral, contralateral ou ipilateral e

contralateral simultâneos) e os dados referentes à radioterapia pós-operatória, se foi realizada ou não.

Sobre as informações dos laudos histopatológicos foram avaliados o diagnóstico do tumor primário, seguindo a nomenclatura sugerida pela OMS (BARNES et al., 2005) sendo CEC I para neoplasias bem diferenciadas, CEC II para neoplasias moderadamente diferenciadas, CEC III para neoplasias pouco diferenciadas e CEC SOE para neoplasias sem outra especificação, infiltração glandular, perineural, muscular e embolização vascular de células neoplásicas (presença ausência ou desconhecido). As margens cirúrgicas também foram classificadas (comprometida ou não comprometida), além do comprometimento linfonodal cervical histopatológico (sem esvaziamento, pN0 e pN+) e a quantidade de linfonodos dissecados e comprometidos.

Do seguimento clínico dos pacientes foi avaliada a ocorrência de recidiva e sua localização (ausente, local, pescoço ipsi, pescoço contralateral ou outra localização). Quando houve a ocorrência de segundo tumor primário, a data e a localização da nova neoplasia também foram registradas.

Por fim, foi registrada a data da última informação do paciente e a classificação do seu estado atual (vivo, vivo com câncer, morte por intercorrência cirúrgica, morte decorrente do tumor primário, morte sem evidência de recidiva do tumor primário e perdido de vista). Definiram-se pacientes perdidos de vista aqueles com menos de cinco anos de seguimento que deixaram de retornar por um período igual ao dobro do estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após cinco anos foram classificados como vivos 000.

4.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.4.1 Análise morfológica em Hematoxilina e Eosina e graduação histopatológica da malignidade tumoral

Para a análise morfológica da peça cirúrgica, utilizou-se um corte representativo de 3 µm de cada espécime tumoral, os quais foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE), seguindo os procedimentos de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

A graduação histopatológica de malignidade tumoral foi feita utilizando-se os parâmetros propostos por Brandwein-Gensler et al (2005), um índice de malignidade que leva em consideração o padrão de invasão tumoral, a intensidade do infiltrado inflamatório e a ocorrência ou não de invasão perineural.

A área do *front* de invasão tumoral foi analisada, sem o conhecimento dos dados clínicos dos pacientes, por dois examinadores (A.S.G e D.T.O), em um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS) com uma objetiva de 40x. Cada quesito avaliado foi quantificado em escores de 0 a 3 descritos a seguir.

Com relação ao padrão de invasão, tumores com invasão compressiva e bordas bem delineadas, cordões sólidos ou pequenos cordões com mais de 15 células determinavam escore 0, pequenos grupos com menos de 15 células ou células individuais escore 1 e infiltração tumoral vastamente dispersa, com pelo menos 1 mm de tecido sadio interposto entre as ilhas tumorais e a frente de invasão escore 3. A intensidade do infiltrado inflamatório linfocítico foi graduado em escore 0 para infiltrado inflamatório intenso (distribuição homogênea), escore 1 para infiltrado inflamatório moderado (grandes agregados) e escore 3 para infiltrado inflamatório discreto. Por fim, a ausência de invasão perineural determinava escore 0, a invasão de pequenos nervos escore 1 e de grandes nervos escore 3.

Ao final dessa avaliação os escores foram somados e o escore final do grau de malignidade determinado, sendo 0 baixo grau (melhor prognóstico), 1 ou 2 grau intermediário e 3 a 9 alto grau (pior prognóstico).

4.4.2 Técnica imuno-histoquímica

As marcações imuno-histoquímicas realizadas nessa pesquisa seguiram o protocolo de reações utilizado no Laboratório de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo – SP, com diluições dos anticorpos primários previamente padronizados, conforme descrito a seguir:

- ✓ Desparafinização dos cortes microscópicos dos tumores de lábio inferior de 3 µm de espessura em estufa a 60°C por 24 horas;

- ✓ Hidratação dos cortes microscópicos dos tumores:
 - Xilol a 60°C por 20 minutos;
 - Xilol a temperatura ambiente por 20 minutos;
 - Etanol 100% por 30 segundos;
 - Etanol 85% por 30 segundos;
 - Etanol 70% por 30 segundos.
- ✓ Lavagem das lâminas em água corrente e destilada;
- ✓ Ferver a solução de tampão citrato 10 mM, pH 6.0, em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina®) destampada e, em seguida, mergulhar as lâminas na solução em ebulição e lacrar a panela. Após 3 minutos, desligar a panela e esperar sua refrigeração gradual em água corrente. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada.
- ✓ Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, 4 trocas de 5 minutos cada. Lavagem em água corrente e destilada e, em seguida, com solução salina fosfatada tamponada (PBS), 10 mM pH 7.4 por 5 minutos;
- ✓ Incubação das lâminas com os anticorpos primários diluídos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, cat# A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida:
 - Podoplanina – Clone D2-40 – Diluição 1:200 – Dako cat# M3619, Glostrup, Dinamarca.
 - CD44v6 – Clone VFF-18 – Diluição 1:1000 – Abcam ab7890, Cambridge, Reino Unido.
- ✓ Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ✓ Incubação por 30 min a 37°C com *Post Primary Block* (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);
- ✓ Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ✓ Incubação com *NovoLink Polymer* por 30 min a 37°C (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);
- ✓ Lavagem em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;

- ✓ Incubação das lâminas em solução substrato, composta por: 100mg de 3,3' Diaminobenzidina Tetrahydroclorato (DAB) (Sigma, cat# D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1 mL de H₂O₂ 6%; e 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz;
- ✓ Observação ao microscópio óptico de luz, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação;
- ✓ Lavagem em água corrente e destilada por 3 minutos;

A contra-coloração dos tumores foi realizada com Hematoxilina de Harris e, posteriormente, as lâminas foram montadas em Entellan Neu (Merck, cat# 1.07961, Alemanha).

Em todas as séries de colorações foram incluídos um controle positivo e um negativo para cada marcador. Como controle positivo da podoplanina e do CD44v6 utilizou-se um corte de tonsila palatina. Como controle negativo para as marcações de ambos anticorpos, utilizou-se um corte do mesmo tecido com a omissão dos anticorpos primários.

O controle interno do anticorpo anti-podoplanina foi feito pela expressão nos vasos linfáticos presentes nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Para o CD44v6 o controle interno foi feito a partir da expressão da molécula na camada basal do epitélio da mucosa bucal (quando presente), localizada nas margens periféricas desta neoplasia maligna

4.4.3 Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação da expressão imuno-histoquímica da podoplanina e do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio foi feita na área mais profunda dos tumores (*front* de invasão), contendo células epiteliais neoplásicas, utilizando-se um sistema computadorizado de captura de imagens composto por uma câmera digital de alta resolução (Axiocam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha) contendo uma objetiva de 40X.

A câmera digital estava conectada a um microcomputador (Core i5 4440, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviando suas imagens a um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.9 ZEISS, Jena, Alemanha). Inicialmente foi feito um processo de padronização do campo, para não haver diferença de intensidade de expressão dos marcadores entre os campos analisados, após isso, dez campos microscópicos foram obtidos, sempre com o maior número de células neoplásicas possíveis e sem repetir a mesma célula em dois campos diferentes.

Esse processo foi feito separadamente para cada anticorpo (anti-podoplanina e anti-CD44v6) e as imagens foram salvas em arquivos distintos, separando-se por marcador e tumor analisado, com as imagens numeradas de 1 a 10.

A análise dos carcinomas espinocelulares de lábio foi feita por dois avaliadores independentes (A.S.G e D.T.O) a partir do software padrão de visualização de imagens do Microsoft Windows e no mesmo computador (ASUS X550L)

A expressão imuno-histoquímica da podoplanina e do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio foi avaliada por um método semi-quantitativo de escores adaptado de Faustino et al. (2008). O escore final da expressão da podoplanina e do CD44v6 pelas células neoplásicas foi determinado pela soma da porcentagem de células com imunomarcagem positiva (0 – nenhuma célula tumoral marcada, 1 – até 25% das células tumorais marcadas, 2 – de 26% a 50% das células tumorais marcadas, 3 – de 51% a 75% das células tumorais marcadas, 4 - mais de 75% das células tumorais marcadas) com a intensidade da imunomarcagem (0 – sem marcação, 1 – imunomarcagem fraca, 2 - imunomarcagem moderada, 3 - imunomarcagem forte e 4 imunomarcagem intensa).

A análise do CD44v6 foi feita na membrana das células neoplásicas, pois este é o local predominante de apresentação dessa proteína, por outro lado, a podoplanina foi analisada, separadamente, na membrana e no citoplasma das células neoplásicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

O escore final de cada marcador foi obtido pela moda dos valores registrados na análise dos 10 campos tumorais. Quando existia mais de um valor para a moda da neoplasia avaliada, padronizou-se utilizar o de maior valor. Os seguintes escores finais foram estabelecidos:

- 0 (escore 0) = imunomarcção ausente;
- 1 (escores de 1 a 5) = imunomarcção fraca;
- 2 (escores de 6 a 8) = imunomarcção forte.

Para fins da análise estatística, os resultados da imunomarcção ausente e fraca foram considerados juntos, e comparados com a imunomarcção tumoral forte.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador IBM SPSS *Statistics for Windows* versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$) para todos os testes.

Para associação da expressão imuno-histoquímica da podoplanina e do CD44v6 pelas células neoplásicas com as variáveis clínicas, demográficas e microscópicas utilizou-se o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado (χ^2).

Para o teste de frequências correlacionadas envolvendo a expressão forte e intensa do CD44v6 foi utilizado o teste de McNemar. A correlação entre a expressão dos marcadores podoplanina e CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi feita pelo teste de correlação de Spearman.

A análise da sobrevivência livre de doença foi realizada pelo estimador de produto-limite de Kaplan-Meier, considerando-se o tempo em meses, entre a cirurgia do tumor primário e a data da recidiva. Foram considerados indivíduos “não censurados” aqueles que apresentaram um evento de interesse (recidiva) e considerados “censurados”, aqueles em que até a data do último seguimento não apresentaram nenhum evento de interesse.

A comparação entre as curvas de sobrevivência foi feita pelo teste de *log-rank* e o modelo de regressão múltipla de Cox foi utilizado para avaliar a influência das variáveis estadiamento T, podoplanina membranosa e citoplasmática no prognóstico dos pacientes.

4.6 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do mesmo sistema de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.9 ZEISS, Jena, Alemanha) utilizadas para avaliação imuno-histoquímica.

4.7 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo (CAAE: 01594912.0.3001.5432) em reunião do dia 21 de maio de 2013, sob o nº 1778/13 (Anexo B).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

5.1.1 Casuística

As neoplasias malignas de lábio inferior analisadas nesse estudo são provenientes de um levantamento de 39 anos (1970-2009) do arquivo do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo – SP. Após a aplicação dos critérios de seleção previamente citados, foram selecionados 91 pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de lábio inferior em estádios clínicos I, II, III e IV.

5.1.2 Características demográficas, clínicas e microscópicas da população de estudo

A amostra analisada de carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi constituída principalmente de indivíduos da raça branca, na sua maior parte homens (82,4%) com mais de 45 anos e tabagistas e/ou etilistas (Tabela 1).

Quanto às características clínicas das neoplasias malignas avaliadas, em sua maior parte, os tumores apresentaram-se como lesões menores que 3 cm úlcero-vegetantes ou úlcero infiltrativa (84,4%) com tempo de evolução variando entre 1 a 120 meses (mediana de 12 meses). A linha média do lábio inferior estava comprometida em 45,8% dos pacientes com as neoplasias malignas avaliadas neste estudo (Tabela 1).

Em relação ao estadiamento clínico inicial a maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi classificado como T1 (42,7%) e T2 (38,2%) e somente 14 pacientes com câncer de lábio apresentavam N+ no momento do

diagnóstico clínico, como descrito na Tabela 1. Do total de 91 pacientes com câncer de lábio avaliados, 21 destes realizaram radioterapia pós-cirúrgica e 24 apresentaram recidiva tumoral local e/ou regional (Tabela 1).

Entre os 24 pacientes com recidiva do carcinoma espinocelular de lábio inferior nove foram submetidos ao esvaziamento linfonodal, e destes, sete apresentaram infiltração linfonodal positiva. Dos pacientes com câncer de lábio e recidiva locorregional somente oito receberam radioterapia pós-operatória. A ocorrência de um segundo tumor primário foi encontrada em 14,3% dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior.

As informações referentes às características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, descritas na Tabela 1, foram retiradas dos laudos histopatológicos da peça cirúrgica e, quando possível, confirmadas pela avaliação das lâminas em Hematoxilina/Eosina.

A graduação tumoral encontrada nos laudos histopatológicos revelou que quase metade da amostra de carcinomas espinocelulares de lábio inferior eram tumores bem diferenciados (42,9%) e fatores que demonstravam maior agressividade da neoplasia como embolização linfática, infiltração perineural, muscular e glandular não foram comuns na amostra, acometendo aproximadamente 30% das neoplasias malignas avaliadas, com exceção da infiltração glandular que ocorreu somente uma vez (4,8%). As margens histológicas encontravam-se comprometidas em dois pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior (Tabela 1).

Com relação à infiltração linfonodal histopatológica, de um total de 91 pacientes avaliados, aproximadamente um terço (27 pacientes) foram submetidos ao esvaziamento cervical e, 12 desses pacientes esvaziados não possuíam infiltração linfonodal pelas células tumorais, como pode ser visto na Tabela 1. Dos 27 pacientes esvaziados, 15 foram submetidos ao esvaziamento cervical ipsilateral e contralateral, 11 ao esvaziamento cervical ipsilateral e um ao esvaziamento cervical contralateral.

Uma classificação mais criteriosa dos tumores analisados neste estudo foi realizada usando-se a graduação histopatológica de malignidade tumoral conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas, clínicas e microscópicas dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Característica Clínica/Demográfica	Número de pacientes (%)	Característica Microscópica	Número de tumores (%)
IDADE*		TUMOR PRIMÁRIO	
≤ 45	24 (26,7)	CEC I	39 (42,9)
>45≤70	44 (48,9)	CEC II / III	11 (12,1)
>70	22 (24,4)	CEC SOE	41 (45,0)
GÊNERO		EMBOLOGIZAÇÃO LINFÁTICA*	
Masculino	75 (82,4)	Sim	09 (28,1)
Feminino	16 (17,6)	Não	23 (71,9)
TABAGISMO*		INFILTRAÇÃO PERINEURAL*	
Sim	65 (81,2)	Sim	11 (32,3)
Não	15 (18,8)	Não	23 (67,7)
ETILISMO*		INFILTRAÇÃO MUSCULAR*	
Sim	42 (53,8)	Sim	07 (31,8)
Não	36 (46,2)	Não	15 (68,2)
LINHA MÉDIA*		INFILTRAÇÃO GLANDULAR*	
Compromete	38 (45,8)	Sim	01 (4,80)
Não compromete	45 (54,2)	Não	20 (95,2)
DIÂMETRO LESÃO*		LINFONODOS (pN)	
≤ 1cm	28 (32,2)	Não Esvaziados	64 (70,3)
> 1cm <3cm	32 (36,8)	Negativo	12 (13,2)
≥ 3cm	27 (31,0)	Positivo	15 (16,5)
ESTADIAMENTO T*		MARGENS COMPROMETIDAS*	
T1/T2	72 (80,9)	Sim	02 (2,30)
T3/T4	17 (19,1)	Não	85 (97,7)
ESTADIAMENTO N*		GRADUAÇÃO DE MALIGNIDADE*	
N0	54 (79,4)	Baixo	42 (46,1)
N1/N2	14 (20,6)	Intermediário/ Alto	49 (53,9)
RECIDIVA			
Sim	24 (26,4)		
Não	67 (73,6)		
TOTAL	91 (100%)		91 (100%)

*Excluídos pacientes com informação ignorada.

Figura 1 - Características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A mucosa bucal hiperplásica adjacente à área neoplásica e carcinoma espinocelular bem diferenciado. Em B carcinoma espinocelular bem diferenciado com formação de pérolas de queratina e padrão de invasão em ilhotas largas e cordões sólidos de células neoplásicas. Em C e D detalhes das ilhotas tumorais com bordas bem delimitadas permeadas por intenso infiltrado inflamatório mononuclear (Hematoxilina e Eosina; A e B = 40X; C e D = 100x).

5.1.3 Graduação histopatológica da malignidade tumoral

A graduação histopatológica de malignidade tumoral foi realizada de acordo com os parâmetros propostos por Brandwein-Gensler et al. (2005), levando em consideração o padrão de invasão tumoral, a intensidade do infiltrado inflamatório e a ocorrência de invasão perineural. De acordo com os autores esse método pode ajudar a prever o risco histológico de recidiva local e a sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005).

Após a análise do índice de Brandwein-Gensler et al. (2005) nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, verificamos que a maioria dos tumores apresentava um padrão de invasão em ilhotas largas e cordões sólidos, um infiltrado inflamatório intenso (Figura 1) e geralmente sem a presença de invasão perineural. Assim sendo, com base nestas características microscópicas, a maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi classificado como tumores de grau baixo ou intermediário de malignidade, como pode ser visualizado na Tabela 2 e Figura 1.

Tabela 2 - Distribuição da avaliação de malignidade tumoral dos 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior. Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

ÍNDICE DE BRANDWEIN-GENSLER	N	%
Baixo risco de malignidade (escore 0)	42	46,1
Risco intermediário de malignidade (escores de 1 a 2)	40	43,9
Alto risco de malignidade (escores de 3 a 9)	09	9,0%
TOTAL	91	100

5.2. EXPRESSÃO DA PODOPLANINA E DO CD44v6 EM CÂNCER DE LÁBIO

Uma forte expressão da podoplanina e do CD44v6 foi observada com frequência na maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior avaliados nesse estudo (Figuras 2 e 3 e Tabelas 3 e 4). A podoplanina apresentou índices de imunomarcacão forte acima de 60% tanto na membrana (61,5%) como no citoplasma (60,4%) das células malignas do *front* de invasão tumoral das neoplasias de lábio inferior (Tabelas 3 e 4 e Figura 2).

Em relação à imunoexpressão do CD44v6, o índice de forte expressão membranosa foi ainda maior, alcançando 95,4% no *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares avaliados, como descrito nas Tabelas 3 e 4 e ilustrado na Figura 3.

A análise estatística mostrou que não houve associação significativa entre a expressão da podoplanina membranosa pelas células malignas e os fatores demográficos e clínicos (Tabela 3). Por outro lado, a expressão da podoplanina citoplasmática foi significativamente associada, com etilismo ($p=0,024$) e com a recidiva ($p=0,028$). Dos 36 pacientes com câncer de lábio inferior que não eram etilistas, 27 (75,0%) apresentaram forte expressão citoplasmática desta proteína. Em relação à recidiva, dos 67 pacientes que não tiveram recidiva do carcinoma espinocelular de lábio inferior, 45 (67,2%) também mostraram uma forte expressão citoplasmática da podoplanina (Tabela 3).

A expressão membranosa do CD44v6 pelas células malignas do câncer de lábio foi associada, significativamente, apenas com o estadiamento clínico T ($p=0,034$), onde pode-se observar a perda da forte expressão nos tumores com estadiamento clínico avançado como os T4 (Tabela 3).

Na análise estatística das variáveis microscópicas com a expressão dos marcadores podoplanina e CD44v6 houve uma associação significativa apenas entre a expressão da podoplanina membranosa e índice de malignidade histopatológica dos tumores analisados ($p=0,026$), como pode ser observado na Tabela 4. Dos 42 carcinomas espinocelulares de lábio inferior com baixo grau de malignidade, 31 (73,8%) apresentaram forte expressão membranosa de podoplanina (Tabela 4).

Tabela 3 - Distribuição da expressão forte de podoplanina membranosa e citoplasmática e do CD44v6 pelas células malignas do front de invasão tumoral dos 91 pacientes com câncer de lábio, segundo as características clínicas e demográficas, vícios, tamanho da lesão, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Variável	Podoplanina membranosa			Podoplanina citoplasmática			CD44v6		
	N	FORTE N (%)	p	N	FORTE N (%)	p	N	FORTE N (%)	p
GÊNERO									
Masculino	75	46 (61,3)	0,931	75	45 (60,0)	0,853	73	70(95,9)	0,533
Feminino	16	10 (62,5)		16	10 (62,5)		15	14(93,3)	
IDADE*									
≤ 45	24	16 (66,6)	0,174	24	14 (58,3)	0,342	23	21(91,3)	0,560
> 45≤70	44	30 (68,2)		44	30 (68,2)		43	42(97,7)	
> 70	22	10 (45,4)		22	11 (50,0)		21	20(95,2)	
TABAGISMO*									
Sim	65	43 (66,1)	0,160	65	41 (63,1)	0,824	62	59(95,2)	1,000
Não	15	07 (46,6)		15	09 (60,0)		15	14(93,3)	
ETILISMO*									
Sim	42	27 (64,3)	0,772	42	21 (50,0)	0,024	42	39(92,8)	0,626
Não	36	22 (61,1)		36	27 (75,0)		33	32(97,0)	
DIÂMETRO*									
≤ 1cm	28	18 (64,3)	0,837	28	18 (64,3)	0,253	26	26(100)	0,190
> 1cm <3cm	32	19 (59,4)		32	16 (50,0)		32	31(96,9)	
≥ 3cm	27	18 (66,6)		27	19 (70,4)		26	23(88,5)	
LINHA MÉDIA*									
Compromete	38	23 (60,5)	0,713	38	25 (65,8)	0,250	36	35(97,2)	0,623
Não compromete	45	29 (64,4)		45	24 (53,3)		44	41(93,2)	
ESTADIAMENTO T*									
T1	38	24 (63,1)	1,000	38	21 (55,3)	0,730	36	35(97,2)	0,034
T2	34	21 (61,8)		34	23 (67,6)		33	32(97,0)	
T3	12	07 (58,3)		12	07 (58,3)		12	12(100)	
T4	05	03 (60,0)		05	03 (60,0)		05	03(60,0)	
ESTADIAMENTO N*									
N0	54	32 (59,2)	0,182	54	30 (55,5)	0,710	52	51(98,0)	0,111
N1/N2	14	11 (78,6)		14	07 (50,0)		14	12(85,7)	
RADIOTERAPIA*									
Sim	21	13 (61,9)	1,000	21	11 (52,4)	0,400	21	19(90,5)	0,254
Não	67	40 (59,7)		67	42 (62,7)		64	62(96,9)	
RECIDIVA									
Sim	24	11 (45,8)	0,065	24	10 (41,7)	0,028	24	22(91,7)	0,299
Não	67	45 (67,2)		67	45 (67,2)		64	62(96,9)	
TOTAL	91	56 (61,5)		91	55 (60,4)		88	84(95,4)	

N: Número de câncer de lábio *Excluídos pacientes com informação ignorada.

Tabela 4 - Distribuição da expressão forte de podoplanina membranosa e citoplasmática e do CD44v6 pelas células malignas do front de invasão tumoral dos 91 pacientes com câncer de lábio, segundo as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Variável	Podoplanina membranosa			Podoplanina citoplasmática			CD44v6		
	N	FORTE N (%)	p	N	FORTE N (%)	p	N	FORTE N (%)	p
TUMOR PRIMÁRIO									
CEC I	39	24 (61,5)	0,467	39	24 (61,5)	0,938	37	36(97,3)	0,777
CEC II / III	11	05 (45,4)		11	07 (63,6)		11	11(100)	
CEC SOE	41	27 (65,8)		41	24 (58,5)		40	37(92,5)	
EMBOLOGIZAÇÃO VASCULAR*									
Sim	09	07 (77,8)	0,642	09	04 (44,4)	0,282	09	07(77,8)	0,195
Não	23	16 (69,6)		23	15 (65,2)		22	21(95,4)	
INFILTRAÇÃO PERINEURAL*									
Sim	11	08 (72,7)	0,850	11	07 (63,6)	0,877	11	09(81,8)	0,252
Não	23	16 (69,6)		23	14 (60,9)		22	21(95,4)	
INFILTRAÇÃO MUSCULAR*									
Sim	07	05 (71,4)	1,000	07	05 (71,4)	1,000	07	06(85,7)	0,333
Não	15	12 (80,0)		15	10 (66,7)		14	14(100)	
INFILTRAÇÃO GLANDULAR*									
Sim	01	01 (100)	1,000	01	01 (100)	1,000	01	01(100)	1,000
Não	20	16 (80,0)		20	13 (65,0)		19	18(94,7)	
MARGENS COMPROMETIDAS*									
Sim	02	01 (50,0)	1,000	02	01 (50,0)	1,000	02	02(100)	1,000
Não	85	52 (61,2)		85	53 (62,3)		82	78(95,1)	
LINFONODOS (pN)									
Não Esvaziados	64	38 (59,4)	0,227	64	39 (60,9)	0,323	61	60(98,4)	0,084
Negativo	12	10 (83,3)		12	09 (75,0)		12	11(91,7)	
Positivo	15	08 (53,3)		15	07 (46,7)		15	13(86,7)	
GRADUAÇÃO DE MALIGNIDADE									
Baixo	42	31 (73,8)	0,026	42	26 (61,9)	0,791	41	40(97,6)	0,620
Médio/Alto	49	25 (51,0)		49	29 (59,2)		47	44(93,6)	
TOTAL	91	56 (61,5)		91	55 (60,4)		88	84(95,4)	

N: Número de câncer de lábio *Excluídos pacientes com informação ignorada.

Figura 2 - Imunoexpressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B forte imunoexpressão da podoplanina nas células do *front* de invasão tumoral. Intensa imunoexpressão de podoplanina nas células periféricas e centrais das ilhotas tumorais em C e na parede dos vasos linfáticos (setas). Em D detalhe da marcação membranosa e citoplasmática da podoplanina nas células neoplásicas (Imuno-histoquímica: anti-podoplanina, A = 40x, B e C = 100x e D=400x).

Figura 3 - Imunoexpressão do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Em A e B intensa imunoexpressão do CD44v6 nas células do *front* de invasão tumoral e ausência desta expressão nas pérolas de queratina. Em C e D detalhes da intensa expressão membranosa do CD44v6 nas células neoplásicas (Imuno-histoquímica: anti-CD44v6, A = 40x, B = 100x, C e D=400x).

A intensidade da expressão do CD44v6 nas células epiteliais neoplásicas do *front* de invasão tumoral foi comparada com aquela presente nas células da mucosa bucal adjacente ao tumor. Como pode ser observado na Tabela 5 e Figura 4, houve uma predominância da forte e intensa expressão desta proteína na grande maioria dos tumores e da mucosa bucal.

Quando comparamos as frequências forte e intensa da expressão do CD44v6 entre as duas localizações analisadas, utilizando-se o teste estatístico de McNemar, verificamos que houve uma redução da intensidade da imunomarcagem das células neoplásicas, quando comparadas com as células da mucosa bucal adjacente, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$), como descrito na Tabela 6 e ilustrado na Figura 4.

Tabela 5 - Distribuição da intensidade de marcação do CD44v6 nas células do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e da mucosa bucal adjacente. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Localização	CD44v6				
	Ausente	Fraco	Moderado	Forte	Intenso
Mucosa bucal	-	-	5	22	61
Tumor	2	-	14	39	33

Tabela 6 - Comparação da intensidade de expressão forte e intensa do CD44v6 entre as células do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e a mucosa bucal adjacente. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

CD44v6 Tumor	CD44v6 Mucosa Bucal Adjacente		
	Forte	Intenso	<i>p</i>
Forte	13	25	<0,001
Intenso	2	31	

p – nível de significância do teste de frequência de McNemar.

Figura 4 - Imunoexpressão do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e na mucosa bucal adjacente ao tumor. Em A, B e C observa-se, em diferentes localizações uma redução da imunoexpressão do CD44v6 nas células neoplásicas quando comparadas com as células da mucosa bucal. (Imuno-histoquímica: anti-CD44v6, A B e C = 100x).

5.2.1 Correlação entre a expressão de podoplanina e CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior

A correlação entre a expressão da podoplanina membranosa e citoplasmática com a expressão do CD44v6 pelas células do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi feita pelo Teste de Spearman (Tabela 7). Não houve correlação significativa entre a expressão das duas proteínas pelas células malignas nos tumores analisados, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica da podoplanina membranosa e citoplasmática e o CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

	Podoplanina Membranosa	Podoplanina Citoplasmática
CD44v6	$r = 0,163$ $p = 0,129$	$r = 0,157$ $p = 0,144$

r – coeficiente de correlação de Spearman; p – nível de significância do teste de correlação de Spearman.

5.3. ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA

O tempo médio de acompanhamento dos pacientes portadores de câncer de lábio inferior foi de 98 meses, variando de 0,03 a 394 meses. Ao final do período de acompanhamento, dois pacientes estavam vivos com câncer, quatorze pacientes morreram devido a doença, um paciente veio a óbito em decorrência do procedimento cirúrgico, dez pacientes morreram por outros motivos não relacionados ao câncer, vinte e oito pacientes estavam vivos livre de doença e trinta e seis pacientes foram considerados perdidos de vista.

Durante o período de acompanhamento dos pacientes ocorreram 24 recidivas locais do tumor e as taxas de sobrevivência livre de doença para 5 e 10 anos dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior foram de 75,7% e 67,1%, respectivamente (Tabela 8).

Para o teste de sobrevivência livre de doença foram avaliadas as variáveis: gênero, idade, tabagismo, estadiamento clínico T, radioterapia, infiltração muscular, infiltração linfonodal histopatológica (pN), graduação histopatológica de malignidade tumoral, expressão do CD44v6 e da podoplanina membranosa e citoplasmática, como pode ser visto na Tabela 8.

A análise multivariada mostrou que pacientes com estadiamento clínico T3/T4 tiveram uma probabilidade maior de evoluírem com recidiva locorregional, em um período de 5 e 10 anos, quando comparados com indivíduos T1 e T2, sendo estas diferenças estatisticamente significativas ($p=0,031$), conforme Tabela 8.

A infiltração muscular também foi associada com a sobrevida livre de doença. Os pacientes com câncer de lábio apresentando infiltração muscular pelas células neoplásicas tiveram mais recidivas tumorais ($p=0,016$), em um período de 5 e 10 anos, quando comparados com aqueles que não apresentavam infiltração muscular pelo tumor (Tabela 8).

Em relação à expressão de podoplanina pelas células neoplásicas no *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, verificamos que as taxas de sobrevivência livre de doença foram significativamente maiores, em 5 e 10 anos, para os pacientes que apresentaram forte expressão tumoral da proteína tanto na membrana ($p=0,014$) quanto no citoplasma ($p=0,035$), se comparados aqueles tumores com ausente/fraca expressão deste biomarcador (Tabela 8 e Figuras 5 e 6).

As análises da podoplanina e do estadiamento clínico T pelo modelo de regressão de Cox estão ilustradas nas Tabelas 9 e 10. A podoplanina (membranosa e citoplasmática) e o estadiamento clínico T foram fatores de prognóstico independente influenciando a sobrevivência livre de doença.

Quando analisamos a podoplanina e o estadiamento clínico T, verificamos que o paciente com carcinoma espinocelular de lábio inferior com expressão forte da podoplanina teve 0,344 vezes (podoplanina membranosa) ou 0,372 vezes (podoplanina citoplasmática) o risco de apresentar recidiva locorregional quando comparado com um paciente com ausente/fraca expressão desta proteína, independentemente de gênero, idade, tabagismo, radioterapia, infiltração muscular, pN, graduação histopatológica de malignidade e expressão do CD44v6 (Tabelas 9 e 10).

Também verificamos que o paciente com câncer de lábio inferior e estadiamento clínico T mais avançado (T3/T4) teve um pouco mais de três vezes o risco de apresentar recidiva locorregional quando comparado com o paciente com carcinoma espinocelular de lábio inferior e estadiamento clínico T1, independentemente de gênero, idade, tabagismo, radioterapia, infiltração muscular, pN, graduação histopatológica de malignidade e expressão do CD44v6 (Tabelas 9 e 10).

Tabela 8 - Análise da sobrevivência livre de doença acumulada em 5 e 10 anos, pelo método de Kaplan-Meier dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, segundo as características demográficas, clínicas e microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Variável		SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA		p
		5 anos(%)	10 anos(%)	
GÊNERO	Masculino	78,5	68,2	0,602
	Feminino	64,5	64,5	
IDADE*	≤ 45	80,5	80,5	0,637
	>45≤70	75,5	59,2	
	>70	65,0	65,0	
TABAGISMO*	Sim	78,4	72,3	0,250
	Não	71,8	52,4	
ESTADIAMENTO T*	T1	85,0	75,7	0,031
	T2	81,7	76,3	
	T3/T4	48,8	24,4	
RADIOTERAPIA	Sim	57,0	45,6	0,138
	Não	80,9	72,5	
INFILTRAÇÃO MUSCULAR*	Sim	53,6	26,8	0,016
	Não	90,9	90,9	
LINFONODOS (pN)	Não Esvaziados	80,0	71,0	0,189
	Negativo	78,8	78,8	
	Positivo	51,9	49,6	
GRADUAÇÃO MALIGNIDADE	Baixo	84,9	70,7	0,335
	Médio/Alto	68,3	64,5	
PODOPLANINA MEMBRANOSA	Ausente/Fraco	58,7	52,9	0,014
	Forte	86,2	76,1	
PODOPLANINA CITOPASMÁTICA	Ausente/Fraco	57,8	57,8	0,035
	Forte	86,8	72,2	
CD44v6	Ausente/Fraco	33,3	33,3	0,270
	Forte	76,8	66,9	
TOTAL		75,7	67,1	

p – nível de significância do teste de log-rank Kaplan-Meier *Excluídos pacientes com informação ignorada.

Tabela 9 - Análise da sobrevivência livre de doença acumulada, por meio do modelo de Cox, dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior com base na podoplanina membranosa e no estadiamento clínico T. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Variável	Sobrevida livre de doença		
	OR	IC (95%)	<i>p</i>
ESTADIAMENTO T			
T1 (0)	3,01	(1,074; 8,440)	0,036
T3/T4 (1)			
PODOPLANINA			
Ausente/Fraco (0)	0,344	(0,144; 0,821)	0,016
Forte (1)			

p – nível de significância do teste de Cox; OR: odds ratio; IC – Intervalo de confiança.

Tabela 10 - Análise da sobrevivência livre de doença acumulada, por meio do modelo de Cox, dos 91 pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior, com base na podoplanina citoplasmática e no estadiamento clínico T. Hospital do Câncer A.C.Camargo, São Paulo, 1970 a 2009

Variável	Sobrevida livre de doença		
	OR	IC (95%)	<i>p</i>
ESTADIAMENTO T			
T1 (0)	3,65	(1,266; 10,502)	0,017
T3/T4 (1)			
PODOPLANINA			
Ausente/Fraco (0)	0,372	(0,152; 0,910)	0,030
Forte (1)			

p – nível de significância do teste de Cox; OR: odds ratio; IC – Intervalo de confiança.

Figura 5 - Sobrevivência livre de doença dos 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, com base na imunoexpressão de podoplanina membranosa pelas células neoplásicas. Porcentagem de sobrevivência acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.

Figura 6 - Sobrevivência livre de doença dos 91 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, com base na imunoexpressão de podoplanina citoplasmática pelas células neoplásicas. Porcentagem de sobrevivência acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

A participação da glicoproteína transmembrana podoplanina nas neoplasias malignas de boca vem sendo intensamente investigada nos últimos dez anos (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; TSUNEKI et al., 2013; DE VICENTE et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016; MERMOD et al., 2017), no entanto, os resultados destas pesquisas são diversificados, sugerindo que essa molécula pode atuar de formas diferentes nos estágios de transformação e progressão tumoral (DE VICENTE et al., 2013; LOGESWARI et al., 2014; PARHAR et al., 2015).

Como demonstrado em prévias investigações (MARTIN-VILLAR et al., 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2006; RENART et al., 2015), a possibilidade da ligação da podoplanina com proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina, moesina) e posterior ativação da GTPase RhoA, induzindo um aumento da proliferação e da mobilidade individual das células neoplásicas, tem sido um dos focos dos estudos visando explicar as alterações destas proteínas em neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Especificamente em lábio inferior, estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram a expressão da podoplanina, da ezrina e da RhoA no *front* de invasão tumoral, sugerindo a participação conjunta destas proteínas nos processos de movimentação celular e invasão tumoral do câncer de lábio (GARCIA et al., 2014; ASSAO et al., 2016). Entretanto, além da participação na mobilidade de células individuais, outros estudos mostraram a atuação da podoplanina na invasão coletiva de células malignas (WICKI et al., 2006), sendo a ligação desta molécula ao CD44 responsável pela adesão das células neoplásicas a matriz extracelular (TSUNEKI et al., 2013).

Assim sendo, os objetivos deste trabalho se basearam na investigação da expressão da podoplanina e do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, verificando se existe correlação entre estas duas proteínas nestes tumores e seu significado clínico, particularmente sua influência na ocorrência das recidivas tumorais.

A população de estudo foi restrita a pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, pois embora existam inúmeros trabalhos na literatura abordando a influência da podoplanina na evolução e no prognóstico dos pacientes com neoplasias malignas de boca (YUAN et al., 2006; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; TSUNEKI et al., 2013; DE VICENTE et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016; MERMOD et al., 2017), as informações sobre a expressão desta proteína, em tumores localizados exclusivamente em lábio, são escassas na literatura inglesa (GARCIA et al., 2014; ASSAO et al., 2016).

Como pode ser visto na Tabela 1, as características demográficas, clínicas e microscópicas do nosso estudo, seguiram o padrão conhecido para neoplasias malignas de lábio inferior (BATISTA et al., 2010; BIASOLI et al., 2016; BOZAN et al., 2016; OZKUL et al., 2016), caracterizado em sua maior parte por lesões com menos de 3 cm, estadiamento clínico T1 e T2 e histologicamente bem diferenciadas. A recidiva locorregional ocorreu em pouco mais de 20% dos pacientes com câncer de lábio e dos 27 pacientes que foram submetidos ao esvaziamento linfonodal cervical, 15 apresentaram linfonodos positivamente comprometidos no exame histopatológico (pN+). Esta evolução clínica favorável encontrada na maioria dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior confirma as informações de outras casuísticas nacionais e internacionais (BATISTA et al., 2010; BIASOLI et al., 2016; BOZAN et al., 2016; OZKUL et al., 2016).

A avaliação da graduação histopatológica de malignidade tumoral (Tabela 2), com base no índice de Brandwein-Gensler et al. (2005), revelou que a maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior apresentou um padrão de invasão em ilhotas largas e cordões sólidos com bordas bem delineadas (Figura 1), com intensa resposta inflamatória linfocitária e rara invasão neural, sendo classificados como de risco baixo ou intermediário de malignidade e, portanto, de menor agressividade. Por outro lado, dos nove tumores classificados como de alto risco histopatológico de malignidade tumoral, quatro apresentaram recidiva e três possuíam infiltração linfonodal histopatológica positiva (pN+), reforçando a afirmativa de Santos et al. (2014) de que este índice de graduação de malignidade tumoral consiste em um método confiável para predizer o comportamento biológico dos carcinomas espinocelulares de lábio.

A análise da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior mostrou uma expressão predominantemente forte (Figura 2), tanto na membrana

(61,5%), como no citoplasma (60,4%), das células neoplásicas do *front* de invasão tumoral. Houve uma associação significativa entre a expressão citoplasmática da podoplanina com o etilismo ($p=0,024$) e com a recidiva locorregional tumoral ($p=0,028$), bem como, da podoplanina membranosa com a graduação histopatológica de malignidade tumoral ($p=0,026$) (Tabelas 3 e 4).

Uma associação significativa entre a ausente expressão da podoplanina e a ocorrência recidiva locorregional em carcinomas espinocelulares de boca, como observado em nossa casuística de câncer de lábio inferior, confirma os resultados de Tsuneki et al. (2013), contrariando aqueles encontrados por Kreppel et al. (2011), onde a maior frequência da recidiva locorregional foi associada com a forte expressão da podoplanina nas neoplasias malignas de boca. Em outras investigações não foi possível estabelecer esta associação da expressão de podoplanina no câncer de boca com a recidiva locorregional tumoral (DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DE VICENTE et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016) e com o etilismo (KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DE VICENTE et al., 2015).

Além disso, não encontramos na literatura estudos que relataram uma associação entre a expressão de podoplanina e o de índice de graduação histopatológica tumoral de Brandwein-Gensler et al. (2005), como utilizado no presente trabalho. Alguns autores descreveram que a forte expressão de podoplanina foi associada com carcinomas espinocelulares de boca, classificados histopatologicamente, como moderadamente ou pouco diferenciados (KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011), no entanto, em outros estudos, utilizando diferentes classificações histopatológicas de malignidade tumoral, esta associação não pode ser estabelecida (YUAN et al., 2006; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013).

Em relação ao CD44v6, houve uma forte expressão (Figura 3) em 84 dos 88 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, sendo esta imunoexpressão muito semelhante aquela da mucosa bucal adjacente ao tumor, confirmando o resultado descrito em outros estudos (HEROLD-MENDE et al., 1996; KUO et al., 1998; VAN HAL et al., 1999; MACK; GIRES, 2008).

Quando comparamos a intensidade do CD44v6 na mucosa bucal adjacente ao tumor com os carcinomas espinocelulares de lábio inferior (Tabela 5), notamos uma discreta, porém significativa ($p<0,001$), perda desta expressão nas

neoplasias malignas (Figura 4), detectada pelo teste de McNemar (Tabela 6), reforçando os achados de Van Hal et al. (1999).

Não houve nenhuma associação significativa da expressão do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior com as variáveis demográficas, clínicas e microscópicas avaliadas neste estudo (Tabelas 3 e 4), resultados estes descritos por outros (RAUTAVA et al., 2003; YU et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016), com exceção do estadiamento clínico T ($p=0,034$). Na presente análise observamos a perda da forte expressão do CD44V6 nos tumores com estadiamento clínico avançado (T4), contrariando os resultados dos autores que não encontraram esta associação com o estadiamento clínico T (YANAMOTO et al., 2014; YU et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016; SAWANT et al., 2016).

Sendo o CD44v6 uma proteína que influencia diretamente a adesão, a migração e a invasão das células neoplásicas, principalmente no processo de metástase (LYONS; JONES, 2007; MACK; GIRES, 2008; MONROE et al., 2011; NAGANO; OKAZAKI; SAYA, 2013), os resultados descritos acima eram esperados, pois nossa amostra foi constituída, principalmente, por carcinomas espinocelulares de lábio inferior bem diferenciados e com baixa ocorrência de metástase.

Nos últimos anos, o CD44v6 tem sido utilizado como um dos marcadores de células tronco tumorais, onde sua forte imunoexpressão no câncer de boca invasivo, associada com outros biomarcadores, vem sendo relacionada com a maior ocorrência de metástases linfonodais, maiores índices de recidiva tumoral e morte por câncer (ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU et al., 2014; YANAMOTO et al., 2014; SAWANT et al., 2016). Segundo Gonzales-Moles et al. (2013), a expressão do CD44 na carcinogênese pode ser perdida nas etapas de invasão das células neoplásicas, podendo voltar a ser expressa posteriormente, pelas células malignas, justificando assim os diferentes resultados das investigações que associam a presença da expressão do CD44 com a evolução clínica dos pacientes com câncer de boca (BAHAR et al., 1997; KUNISHI; KAYADA; YOSHIGA, 1997; GARCIA-MONTESINOS-PEREA; VAL-BERNAL; SAIZ-BUSTILLO, 2005; YANAMOTO et al., 2014; SAWANT et al., 2016).

Um dos objetivos de nosso estudo foi verificar se existia correlação entre a expressão membranosa ou citoplasmática da podoplanina com aquela do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e nossos resultados mostraram ausência de correlação entre estas duas proteínas, como descrito na Tabela 7.

Embora alguns autores tenham sugerido que o CD44 e a podoplanina podem se ligar atuando de forma conjunta nos processos de invasão das células neoplásicas (MARTIN-VILLAR et al., 2010; TSUNEKI et al., 2013), somente o presente estudo e o de Monteiro et al. (2016) investigaram, utilizando a imuno-histoquímica, a expressão simultânea destas proteínas no câncer de boca. Particularmente em carcinomas espinocelulares de lábio inferior, o presente estudo foi pioneiro na análise conjunta da expressão de podoplanina e de CD44v6 pelas células malignas. Portanto, outros estudos são necessários com técnicas de biologia molecular para confirmar se a isoforma CD44v6 participa, conjuntamente ou não, com a podoplanina nos processos de migração e invasão do câncer de lábio.

Outro objetivo deste estudo foi analisar a influência da expressão da podoplanina e do CD44v6 na sobrevivência livre de doença dos pacientes com câncer de lábio, onde o evento de interesse na evolução clínica é a ocorrência de recidiva.

A análise multivariada mostrou que não houve associação significativa entre a expressão do CD44v6 e a presença de recidiva nos pacientes com câncer de lábio. Entretanto, a expressão de podoplanina (membranosa e citoplasmática) (Figuras 5 e 6) e o estadiamento T foram fatores de prognóstico significativos na sobrevivência livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior. As taxas de sobrevivência livre de doença, em 5 e 10 anos, foram maiores para os pacientes com câncer de lábio que apresentaram forte expressão tumoral da podoplanina, tanto na membrana ($p=0,014$) quanto no citoplasma ($p=0,035$), se comparadas aqueles pacientes com tumores com ausente/fraca expressão deste biomarcador (Tabela 8).

O modelo de regressão de Cox mostrou que os pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior com forte expressão da podoplanina tiveram um pouco mais de 0,3 vezes o risco de apresentarem recidiva locorregional quando comparados com os pacientes com ausente/fraca expressão desta proteína, independentemente de gênero, idade, tabagismo, radioterapia, infiltração muscular, pN, graduação histopatológica de malignidade e CD44v6 (Tabelas 9 e 10).

Nossos resultados contrariam algumas investigações de outros autores onde a forte expressão da podoplanina foi significativamente associada a menor sobrevivência livre de doença dos pacientes (YUAN et al., 2006; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; MONTEIRO et al., 2016), ou não foi

possível encontrar associação significativa desta proteína na ocorrência de recidiva (VORMITTAG et al., 2009; HUBER et al., 2011; DE VICENTE et al., 2015). Entretanto, deve ser ressaltado que os estudos acima foram realizados em carcinomas espinocelulares invasivos de boca, a maioria localizado em língua e assoalho de boca.

Desde os primeiros trabalhos que analisaram a expressão de podoplanina em carcinomas espinocelulares de boca, a forte expressão desta proteína foi frequentemente relacionada com tumores mais agressivos e com maior probabilidade de ocorrência de recidivas locorregionais (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; MONTEIRO et al., 2016), no entanto, resultados do estudo de Tsuneki et al. (2013) mostraram que células de uma linhagem de carcinoma espinocelular de boca (ZK-1) com ausência da expressão de podoplanina tiveram suas propriedades adesivas reduzidas, eram menos diferenciadas e invadiam com mais frequência os vasos linfáticos. Além disso, verificaram que células neoplásicas, separadas das ilhotas tumorais, perdiam a expressão de podoplanina e de CD44 (TSUNEKI et al., 2013). Com base nos resultados acima e naqueles encontrados no presente estudo podemos sugerir que a ausência de expressão de podoplanina caracteriza carcinomas espinocelulares de boca mais indiferenciados e com maior risco de desenvolverem recidivas locorregionais.

Outro resultado interessante de nosso estudo foi verificar que o estadiamento clínico T também foi fator de prognóstico independente na sobrevivência livre de doença, onde pacientes com estadiamentos mais avançados (T3 e T4), tiveram pouco mais de três vezes o risco de apresentar recidiva locorregional quando comparado com os pacientes com carcinoma espinocelular de lábio inferior com estadiamento clínico T1, como descrito nas Tabelas 9 e 10. Esses resultados reforçam alguns achados da literatura, onde pacientes com estadiamento clínico T avançado apresentaram maior ocorrência de recidivas locorregionais (BATISTA et al., 2010; BIASOLI et al., 2016), entretanto, diferente de nosso estudo, estas investigações não analisaram a influência do estadiamento clínico T na ocorrência da sobrevivência livre de doença dos pacientes com câncer de lábio.

Uma análise geral de nossos resultados mostra que embora os carcinomas espinocelulares de lábio inferior sejam tumores geralmente indolentes, de pequenas dimensões e com raras metástases, as recidivas locorregionais podem

ocorrer, alterando a evolução clínica e o prognóstico destes pacientes (BIASOLI et al., 2016; BOZAN et al., 2016; OZKUL et al., 2016), sendo a utilização de biomarcadores como a podoplanina uma ferramenta auxiliar na identificação do risco de recidiva locorregional nestes pacientes.

Além disso, demonstramos também a forte expressão do CD44v6 nas células do câncer de lábio, reforçando sua participação no processo de adesão entre as células epiteliais neoplásicas, e portanto, a expressão desta proteína precisa ser melhor investigada nas diferentes etapas da carcinogênese bucal, principalmente em tumores mais avançados de lábio inferior.

Concluindo, por ser o presente estudo pioneiro na investigação conjunta da podoplanina e do CD44v6 no câncer de lábio, outras pesquisas se fazem necessárias para confirmar nossos resultados, inclusive envolvendo estudos *in vitro* com linhagens destas células para um maior entendimento do papel exato destas proteínas nestas neoplasias malignas.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise imuno-histoquímica da expressão da podoplanina e do CD44v6 em 91 carcinomas espinocelulares de lábio inferior demonstrou:

- uma forte expressão da podoplanina e do CD44v6 nas células do *front* de invasão tumoral;
- uma associação, estatisticamente significativa, entre a expressão citoplasmática da podoplanina com a recidiva da neoplasia e da podoplanina membranosa com a graduação histopatológica de malignidade tumoral;
- uma associação estatisticamente significativa entre a expressão do CD44v6 com o estadiamento clínico T;
- ausência de correlação entre a expressão da podoplanina e do CD44v6 nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior;
- que pacientes com estadiamento clínico T mais avançados (III e IV) tiveram mais de três vezes o risco de apresentarem recidiva locorregional do tumor quando comparados com pacientes com estadiamento clínico T-I;
- que a forte expressão da podoplanina membranosa ou citoplasmática foi fator de prognóstico favorável independente na sobrevivência livre de doença.

Estes resultados comprovam que a podoplanina e o CD44v6 são fortemente expressos pelas células neoplásicas e, sugerem que a expressão forte da podoplanina membranosa ou citoplasmática nas células do *front* invasão tumoral é fator de prognóstico favorável na sobrevivência livre de doença, podendo auxiliar na identificação do risco de recidiva locorregional nos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior.

Referências

REFERÊNCIAS

ASSAO, A. et al. Podoplanin, ezrin, and Rho-A proteins may have joint participation in tumor invasion of lip cancer. **Clin Oral Investig**, Sep 14 2016.

ATHANASSIOU-PAPAEFTHYMIOU, M. et al. Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 27, n. 3, p. 337-49, Jul-Sep 2014.

ATSUMI, N. et al. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 373, n. 1, p. 36-41, Aug 15 2008.

BAHAR, R. et al. CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 26, n. 6, p. 443-6, Dec 1997.

BARNES, L. et al., Eds. **Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, World Health Organization ed. 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.

BATISTA, A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. e74-9, Mar 2010.

BIASOLI, E. R. et al. Lip Cancer: A Clinicopathological Study and Treatment Outcomes in a 25-Year Experience. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 74, n. 7, p. 1360-7, Jul 2016.

BIDAUD, P. et al. Expression of p53 family members and CD44 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) in relation to tumorigenesis. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 3, p. 331-9, Mar 2010.

BIRNER, P. et al. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 1, p. 93-7, Jan 2001.

BIRNER, P. et al. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. **Anticancer Res**, v. 20, n. 5A, p. 2981-5, Sep-Oct 2000.

BON-MARDION, N. et al. Cervical lymph node metastases and T1 squamous cell carcinoma of the lips. **B-ENT**, v. 11, n. 2, p. 89-93, 2015.

BORLAND, G.; ROSS, J. A.; GUY, K. Forms and functions of CD44. **Immunology**, v. 93, n. 2, p. 139-48, Feb 1998.

BOZAN, N. et al. Lip cancer: A 16-year retrospective epidemiological study in Eastern part of Turkey. **J Pak Med Assoc**, v. 66, n. 11, p. 1433-1435, Nov 2016.

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. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. **Am J Pathol**, v. 151, n. 4, p. 1141-52, Oct 1997.

CHEN, J. et al. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. **BMC Cancer**, v. 14, p. 15, Jan 13 2014.

CRUZ, M. C. et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin and CD44v6 in squamous cell carcinomas of the lower lip and tongue. **Braz Dent J**, v. 20, n. 1, p. 64-9, 2009.

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.

D'SOUZA, B.; NAYAK, R.; KOTRASHETTI, V. S. Immunohistochemical Expression of Podoplanin in Clinical Variants of Oral Leukoplakia and Its Correlation With Epithelial Dysplasia. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, May 05 2016.

DAHLROT, R. H. et al. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? **Int J Clin Exp Pathol**, v. 6, n. 3, p. 334-48, 2013.

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

DE VICENTE, J. C. et al. Expression of podoplanin in the invasion front of oral squamous cell carcinoma is not prognostic for survival. **Virchows Arch**, v. 466, n. 5, p. 549-58, May 2015.

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.

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.

GARCIA, A. S. et al. Ezrin and podoplanin expressions are associated in invasion front of lip cancer. **Head Neck Oncology**, v. 3, n. 1, p. 3-8, May 2014.

GARCIA-MONTESINOS-PEREA, B.; VAL-BERNAL, J. F.; SAIZ-BUSTILLO, R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 10, n. 5, p. 454-61, Nov-Dec 2005.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. The cancer stem cell hypothesis applied to oral carcinoma. **Oral Oncol**, v. 49, n. 8, p. 738-46, Aug 2013.

HEROLD-MENDE, C. et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. **J Pathol**, v. 179, n. 1, p. 66-73, May 1996.

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 15 2011.

ISLAM, F. et al. Cancer stem cells in oesophageal squamous cell carcinoma: Identification, prognostic and treatment perspectives. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 96, n. 1, p. 9-19, Oct 2015.

KAROUSOU, E. et al. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. **Matrix Biol**, Oct 13 2016.

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 20 2008.

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.

KUNISHI, M.; KAYADA, Y.; YOSHIGA, K. Down-regulated expression of CD44 variant 6 in oral squamous cell carcinomas and its relationship to regional lymph node metastasis. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 26, n. 4, p. 280-3, Aug 1997.

KUO, M. Y. et al. Expression of CD44s, CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in betel quid chewing-associated oral premalignant lesions and squamous cell carcinomas in Taiwan. **J Oral Pathol Med**, v. 27, n. 9, p. 428-33, Oct 1998.

LOGESWARI, J. et al. Expression of podoplanin in oral premalignant and malignant lesions and its potential as a biomarker. **Indian J Dent Res**, v. 25, n. 3, p. 305-10, May-Jun 2014.

LYONS, A. J.; JONES, J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 8, p. 671-9, Aug 2007.

MACK, B.; GIRES, O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. **PLoS One**, v. 3, n. 10, p. e3360, 2008.

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.

MARTIN, T. A. et al. The role of the CD44/ezrin complex in cancer metastasis. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 46, n. 2, p. 165-86, May 2003.

MERMOD, M. et al. Correlation between podoplanin expression and extracapsular spread in squamous cell carcinoma of the oral cavity using subjective immunoreactivity scores and semiquantitative image analysis. **Head Neck**, v. 39, n. 1, p. 98-108, Jan 2017.

MONROE, M. M. et al. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. **J Oncol**, v. 2011, p. 762780, 2011.

MONTEIRO, L. S. et al. Prognostic significance of CD44v6, p63, podoplanin and MMP-9 in oral squamous cell carcinomas. **Oral Dis**, v. 22, n. 4, p. 303-12, May 2016.

NAGANO, O.; OKAZAKI, S.; SAYA, H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. **Oncogene**, v. 32, n. 44, p. 5191-8, Oct 31 2013.

NAOR, D. et al. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 4, p. 260-7, Aug 2008.

NODA, Y. et al. Immunohistochemical examination on the distribution of cells expressed lymphatic endothelial marker podoplanin and LYVE-1 in the mouse tongue tissue. **Acta Histochem Cytochem**, v. 43, n. 2, p. 61-8, May 1 2010.

OLIVEIRA, D. T.; SHERRIFF, M.; ODELL, E. W. Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 27, n. 7, p. 303-7, Aug 1998.

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

OZKUL, Y. et al. Early stage squamous cell carcinoma of the lower lip: predictive factors for recurrence. **J Laryngol Otol**, v. 130, n. 4, p. 369-72, Apr 2016.

PARHAR, S. et al. Role of podoplanin in potentially malignant disorders and oral squamous cell carcinoma and its correlation with lymphangiogenesis. **Indian J Cancer**, v. 52, n. 4, p. 617-22, Oct-Dec 2015.

PATEL, S.; RAWAL, R. Role of miRNA dynamics and cytokine profile in governing CD44v6/Nanog/PTEN axis in oral cancer: modulating the master regulators. **Tumour Biol**, v. 37, n. 11, p. 14565-14575, Nov 2016.

PATIL, A. et al. Evaluation of Podoplanin in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Scientifica (Cairo)**, v. 2015, p. 135298, 2015.

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.

RAUTAVA, J. et al. CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. **Oral Oncol**, v. 39, n. 4, p. 373-9, Jun 2003.

RENART, J. et al. New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. **Int Rev Cell Mol Biol**, v. 317, p. 185-239, 2015.

SAWANT, S. et al. Prognostic role of Oct4, CD44 and c-Myc in radio-chemo-resistant oral cancer patients and their tumourigenic potential in immunodeficient mice. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 1, p. 43-56, Jan 2016.

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.

SCHOLL, F. G. et al. Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. **J Cell Sci**, v. 112 (Pt 24), p. 4601-13, Dec 1999.

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 2014.

SHIMADA, Y. et al. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. **Cancer Sci**, v. 100, n. 11, p. 2054-9, Nov 2009.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C., Eds. **TNM Classification of Malignant Tumours**. New York: John Wiley & Sons, INCed. 2002.

SOUKKA, T. et al. Regulation of CD44v6-containing isoforms during proliferation of normal and malignant epithelial cells. **Cancer Res**, v. 57, n. 11, p. 2281-9, Jun 01 1997.

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

THAPA, R.; WILSON, G. D. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. **Stem Cells Int**, v. 2016, p. 2087204, 2016.

TSUNEKI, M. et al. Podoplanin-mediated cell adhesion through extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma. **Lab Invest**, v. 93, n. 8, p. 921-32, Aug 2013.

VAN HAL, N. L. et al. Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 82, n. 6, p. 837-45, Sep 09 1999.

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.

WENINGER, W. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. **Lab Invest**, v. 79, n. 2, p. 243-51, Feb 1999.

WETTERWALD, A. et al. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*, v. 18, n. 2, p. 125-32, Feb 1996.

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.

YANAMOTO, S. et al. Expression of the cancer stem cell markers CD44v6 and ABCG2 in tongue cancer: effect of neoadjuvant chemotherapy on local recurrence. **Int J Oncol**, v. 44, n. 4, p. 1153-62, Apr 2014.

YU, Y. H. et al. CD147 and Ki-67 overexpression confers poor prognosis in squamous cell carcinoma of oral tongue: a tissue microarray study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 119, n. 5, p. 553-65, May 2015.

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.

Anexo

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

Ficha de coleta de dados

**Valor prognóstico da podoplanina e do CD44v6
na recidiva locorregional de câncer de lábio**

I. 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

II. 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.

III. Exame locorregional:

9. Extensão do tumor: ☐ 0-não ☐ 1-uma área ☐ 2-duas áreas
☐ 3-três áreas ☐ 4- quatro áreas
10. Linha média: ☐ 0-não compromete ☐ 1-compromete ☐ 9- desc.
11. Tipo de lesão: ☐ 1-úlcerovogetante ☐ 2-úlceroinfiltrativa
☐ 3-outra _____
12. Diâmetro aproximado da lesão: _____ cm
13. Estádio T (UICC 2002): ☐ 1-T1 ☐ 2-T2 ☐ 3-T3 ☐ 4-T4
14. Estádio N (UICC 2002): ☐ 0-N0 ☐ 1- N1 ☐ 2-N2a
☐ 3-N2b ☐ 4-N2c ☐ 5-N3

IV. Cirurgia:

15. Data da cirurgia: ____/____/____
16. Cirurgia: ☐ 1- cirurgia sem esvaz. cervical
☐ 2- cirurgia com esvaz. cervical ipsilateral
☐ 3- cirurgia com esvaz. cervical contralateral (simult)
17. Data da alta hospitalar: ____/____/____

V. Radioterapia pós-operatória:

18. ☐ 0-não ☐ 1-sim

VI. Análise microscópica:

19. Número do AP: _____
20. Anatomopatológico do tumor primário: ☐ 1-CEC I ☐ 2-CEC II
☐ 3-CEC III ☐ 4-CEC SOE
21. Embolização vascular: ☐ 0-não ☐ 1-linfática ☐ 2-sangüínea ☐ 3-ambas ☐ 9-ignorado
22. Infiltração perineural: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
23. Infiltração muscular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
24. Infiltração óssea: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
25. Infiltração de glândulas salivares: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
26. Margens: ☐ 0-livres ☐ 1-presentes ☐ 2-comprometidas ☐ 9-ignorado
27. Número de linfonodos comprometidos ipsilaterais: _____ (99 se não esv.)
28. Número de linfonodos dissecados ipsilaterais: _____ (999 se não esv.)
29. Número de linfonodos comprometidos contralaterais: _____ (99 se não esv.)
30. Número de linfonodos dissecados contralaterais: _____ (999 se não esv.)
31. pN: ☐ 0-negativo ☐ 1-positivo ☐ 9-sem esvaziamento cervical

VII. Evolução:

32. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (em branco se não teve)
33. 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
34. Data do diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (em branco se não teve)
35. Local do segundo tumor primário: _____ (0 se não teve)
36. Data da última informação objetiva de seguimento: ____/____/____
37. Situação na última informação de seguimento:

- ☐ 1-Vivo 000 ☐ 2-vivo com CA ☐ 3-MOCI
☐ 4-MOCA ☐ 5-MOASS ☐ 6-Perdido de vista

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

ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer A.C. Camargo São Paulo – SP. **PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

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 de São Paulo ((FAPESP))
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ((CAPES))**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 295.497**Data da Relatoria:** 21/05/2013**Apresentação do Projeto:**

Projeto associado a dissertação de Mestrado, com o intuito de investigar a podoplanina como potencial biomarcador de carcinomas espinocelulares bucais agressivos, por meio de imunoistoquímica, correlacionando-a com a evolução tumoral e prognóstico dos pacientes.

A podoplanina é uma glicoproteína transmembrana que se expressa no epitélio e vem sendo reconhecida como um potencial biomarcador de carcinomas espinocelulares bucais agressivos, ou seja, associados a pacientes com pior prognóstico. O objetivo deste estudo é investigar a expressão da podoplanina no carcinoma espinocelular de lábio, correlacionando-a com a evolução tumoral e o prognóstico destes pacientes.

Desenho e metodologia do projeto: Cortes microscópicos de 3µm de espessura serão obtidos dos carcinomas espinocelulares, fixados em formalina e adequadamente preparados para coloração imuno-histoquímica, utilizando-se a técnica estreptoavidina-biotina-peroxidase e o anticorpo primário anti-podoplanina. A avaliação imunohistoquímica da podoplanina será realizada a partir do software ImageScope (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA), contabilizando a quantidade de células marcadas e a intensidade da imunomarcção, de acordo

Continuação do Parecer: 295.497

clínico dos mesmos. Não há contra-indicações éticas à realização do mesmo.

Prevê-se a inclusão de 100 sujeitos de pesquisa. Serão utilizados blocos de parafina e dados de prontuário do A.C. Camargo Cancer Center.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

De acordo com a Resolução CNS 196/96 e complementares. Foram apresentadas cartas de ciência dos respectivos colaboradores e departamentos envolvidos, assim como a carta de aprovação do projeto no CEP de origem.

Recomendações:

Observar o parecer da Comissão de Pesquisa (COPE), em 'Considerações Finais a Critério do CEP'.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem contra-indicações éticas à sua realização.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Análise da Comissão de Pesquisa (COPE): Aprovado com sugestões.

Comentários Gerais (COPE):

- A metodologia a ser empregada deveria ser mais detalhada. A imuno-marcação será realizada de forma manual ou automatiza?;
- Um ano é um prazo muito curto, considerando-se a seleção dos casos, coleta dos dados dos pacientes, realização da imunoistoquímica, interpretação dos resultados, análise estatística e preparação da dissertação;
- O projeto está bem escrito e embasado. Sugere-se o uso de mais marcadores para complementar o estudo.