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

ALEXANDRE SIMÕES GARCIA

**Correlação da imunoexpressão de podoplanina e ezrin em
carcinomas espinocelulares de lábio**

**BAURU
2013**

ALEXANDRE SIMÕES GARCIA

**Correlação da imunoexpressão de podoplanina e ezrin em
carcinomas espinocelulares de lábio**

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Versão corrigida

**BAURU
2013**

G165c Garcia, Alexandre Simões
Correlação da imunoexpressão de podoplanina e
ezrin em carcinomas espinocelulares de lábio /
Alexandre Simões Garcia – Bauru, 2013.
113 p. : il. ; 31cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
Protocolo nº: 17194
Data: 02 de maio de 2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,

José Garcia Filho e Neusa Maria Simões Garcia, que me apoiaram em todas as decisões e continuam me incentivando nesta longa jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

por ter me concedido o dom da vida e a oportunidade de chegar onde estou.

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

por serem as pessoas mais importante em minha vida, sem vocês não sou nada.

A minha namorada, Fernanda,

pela companhia e todo incentivo que você me deu durante esses anos, além dos inúmeros momentos em que tive que me dedicar aos estudos e você pacientemente me entendeu. Amo você!

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

que me recebeu de portas abertas desde a primeira vez que fui até a Patologia. Por todos ensinamentos, conversas, apoio nas horas difíceis e por instigar em mim o senso crítico e o valor do conhecimento científico.

A professora, Dr^a. Ana Lúcia Álvares Capelozza,

Obrigado por acreditar em mim e pelo apoio incondicional em todos os momentos, sem a senhora jamais teria feito esse curso.

Ao professor, Dr. José Humberto Damante,

professor nato a quem muito admiro. Obrigado pela amizade e por pacientemente me ensinar e compartilhar seu vasto conhecimento.

*Aos meus grandes amigos de trabalho, **Andréa Amélia dos Santos Cruz, Fernanda Aparecida Daniel Cavallari e Roberto Ponce Salles,***
pelo incentivo e ajuda durante todo esse tempo, sem vocês jamais teria conseguido chegar ao fim.

*A minha amiga, **Kellen Cristine Tjioe,***
por sua ajuda essencial do início ao fim dessa jornada, obrigado pela paciência e pelo conhecimento compartilhado.

*Ao meu amigo, **Diego Maurício Bravo Calderón,***
primeiramente pela amizade e pelos momentos descontraídos que passamos, mas principalmente pela sua constante disposição em ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

*A **Fátima Aparecida Silveira “Fatiminha”,***
por ter me recebido tão bem em seu laboratório e pelo auxílio na parte experimental do meu trabalho, além das inúmeras conversas e conselhos.

*Aos demais funcionários do Departamento de Estomatologia, **Josiel Aparecida Tripodi, Luciana Zanon Fontes Lozano, Maria Cristina Carrara Felipe, Marília Gião e Marina dos Santos Corrêa,***
pela amizade e por terem me recebido tão bem neste Departamento.

*Aos professores, **Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos, Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Dr. Eduardo Sanches Gonçalves,***
além de grandes mestres, grandes amigos. Muito obrigado pela constante disposição em me ensinar e me ajudar a entender a odontologia.

Aos responsáveis pelo Departamento, Prof. Dr. Osny Ferreira Júnior e Prof^{ra}. Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen, pela convivência e pelos ensinamentos compartilhados, além da oportunidade que me concederam de cursar o mestrado.

Aos demais professores do Departamento de Estomatologia, Dr. Luiz Eduardo Montenegro Chinellato, Dr. Eduardo Sant'Ana, Dr. Paulo Sérgio Perri de Carvalho, Dr. Renato Yassutaka Faria Yaedú, Dr. Alberto Consolaro e Dr^a Vanessa Soares Lara, pela convivência e pelos ensinamentos que me foram passados.

Aos meus colegas de turma do mestrado, Heloísa Marchi dos Anjos Soria, Natália Galvão Garcia e Mariana Rates Gonzaga Santos, pelos bons momentos que passamos juntos e pela constante ajuda e compreensão.

Aos alunos do curso de pós graduação em Patologia Bucal, Bruna, Taísa, Francisco, Ana Paula, Rafaela, Felipe, Thaiane, Karen, Pepe, Heliton, Agnes, Paula e Regina, pela prazerosa convivência e pelos bons momentos que passamos juntos.

A todos alunos de Mestrado e Doutorado do curso de Estomatologia com quem convivi desde que entrei na FOB, pela amizade e por sempre me incentivarem a buscar o que eu queria.

Ao Dr. Cléverson Teixeira Soares pela sua atenção, disponibilidade em ajudar e colaboração na padronização da técnica imuno-histoquímica

À química e farmacêutica, Sueley Nonogaki, pela realização da técnica imuno-histoquímica.

*Ao professor, José Roberto Pereira Lauris,
pela realização da análise estatística do trabalho.*

*Aos funcionários do setor de compras da faculdade, Anderson e Rafael,
pela grande ajuda na aquisição do material de pesquisa.*

*Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru,
pela instruções e ajuda durante esse período.*

*Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru,
por todos esclarecimentos e eficiência no atendimento prestado.*

*Aos meus grandes amigos, Rafael, Daniel, Thiago, Eduardo, Guilherme, Felipe,
Edinho, Bruno, Daniele, Natália, Carina, Juliana, Talita e Viviane,
pela amizade ímpar que nós temos e por todos os momentos que passamos juntos.*

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, diretor desta instituição.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

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.

A **FAPESP**, pelo auxílio pecuniário.

*“Penso noventa e nove vezes e nada descubro. Deixo de pensar,
mergulho no silêncio, e a verdade me é revelada.”*

Albert Einstein

RESUMO

A podoplanina humana consiste em uma proteína associada ao processo de invasão das células epiteliais neoplásicas, sendo sua alta expressão correlacionada com um pior prognóstico para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço. A porção citoplasmática da podoplanina pode se ligar a ezrin, uma proteína que vem sendo associada com a ocorrência de metástases e menor sobrevida para os pacientes com neoplasias malignas. O objetivo do presente estudo foi avaliar em 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior a expressão imuno-histoquímica da podoplanina e da ezrin, nas células do *front* de invasão tumoral, e verificar a correlação entre a expressão das duas proteínas nas células epiteliais neoplásicas. A expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina e da ezrin foi avaliada nas células neoplásicas periféricas e centrais das ilhotas tumorais, por meio de um método semi-quantitativo de escores. A associação entre a expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina e da ezrin nos tumores foi feita pelo teste de qui-quadrado, com nível de significância de 5% e a correlação entre a expressão das duas proteínas foi realizada pelo teste de correlação de Spearman. Os resultados demonstraram uma forte expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina nas células periféricas do *front* de invasão tumoral com ausência desta expressão na região central das ilhotas tumorais. A imunomarcação da ezrin foi homogênea nos tumores e predominantemente citoplasmática. Uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a expressão da podoplanina nas células neoplásicas periféricas e centrais ($p < 0,001$), como também entre a expressão da ezrin membranosa e citoplasmática ($p < 0,001$) nos carcinomas espinocelulares de lábio. Houve uma correlação positiva, porém sem significância estatística, entre a expressão da podoplanina membranosa e da ezrin membranosa ou citoplasmática nas células neoplásicas periféricas. Estes resultados comprovam que a podoplanina e ezrin são fortemente expressas pelas células neoplásicas do *front* de invasão tumoral e sugerem que ambas proteínas podem estar participando do processo de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio.

Palavras-chave: Câncer da Boca. Carcinoma de Células Escamosas. Biomarcadores Farmacológicos.

ABSTRACT

Correlation of podoplanin and ezrin immunoexpression in lip squamous cell carcinoma

The human podoplanin consists in a protein associated to the invasion process of the epithelial malignant cells, being your high expression correlated with poor prognosis in patients with head and neck cancer. The cytoplasmic tail of the podoplanin can bind to ezrin, a protein that have been associated with metastasis and lower survival rate in patients with malignant neoplasms. The aim of this study was evaluate in 48 squamous cell carcinomas of the lower lip, the immunohistochemical expression of podoplanin and ezrin, in the invasive front, and verify correlation between the expression of both proteins by epithelial neoplastic cells. The membranous and cytoplasmic expression of podoplanin and ezrin was evaluated in peripheral and central areas of the tumor islets, using a semi-quantitative score method. The association between the membranous and cytoplasmic expression of podoplanin and ezrin in the tumors was performed by chi-square test, using a significance level of 5% and the correlation between the expression of both proteins was performed by Spearman correlation test. The results showed a high membranous and cytoplasmic podoplanin expression in the peripheral cells of the invasive front, with no expression of this protein in the central cells. The ezrin immunostaining was homogeneous and observed mainly in the cytoplasm of malignant cells. A statistically significant difference was found between the expression of podoplanin in peripheral and central tumor cells ($p < 0,001$), as well between the membranous and cytoplasmic expression of ezrin ($p < 0.001$) in squamous cell carcinoma of the lip. There was a positive correlation, but without statistical significance, between the expression of membranous podoplanin and membranous or cytoplasmic ezrin in the peripheral tumor cells. These results prove that podoplanin and ezrin are strongly expressed by malignant cells of the invasive front tumor and suggest that both proteins may be participating in the invasive process of the squamous cell carcinoma of the lip.

Keywords: Oral Cancer. Squamous Cell Carcinoma. Pharmacological Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 -** Representação esquemática do processo de ativação da ezrin. No citoplasma a ezrin está inativa em forma de monômero ou dímero. Quando ativada após a fosforilação por diferentes moléculas (PIP2, PKC, ROCK, entre outras), a ezrin pode se ligar a proteínas transmembrana em sua extremidade N-terminal, enquanto que a outra extremidade, C-terminal, se liga a filamentos de actina promovendo a manutenção da polaridade e forma da célula. Por outro lado, a ezrin também pode se ligar ao inibidor da molécula Rho A (RhoGDI) liberando a porção ativa da Rho, o que ativa fatores de transcrição envolvidos na proliferação, mobilidade e menor adesão entre células. Assim sendo, a via de sinalização da Rho-GTPase pela ezrin pode contribuir para a disseminação de células neoplásicas e o processo de metástases. A GTPase Rho A também pode ativar a molécula de Rho Kinase (ROCK), uma proteína que pode fosforilar a ezrin inativa em sua forma ativa, desenvolvendo assim um mecanismo de retroalimentação entre as duas proteínas. 35
- Figura 2 -** Imagem capturada de um campo microscópico no programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS). 53
- Figura 3 -** Avaliação da imunomarcagem do anticorpo anti-podoplanina na região do front de invasão tumoral. A: Imunomarcagem negativa; B: Imunomarcagem Fraca; C: Imunomarcagem Forte. (A, B e C = 400x). 55
- Figura 4 -** Características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio. Em A mucosa bucal hiperplásica e ortoqueratinizada, adjacente à área neoplásica. Em B e C carcinoma espinocelular bem diferenciado, com formação de pérolas de queratina, baixo grau de pleomorfismo e padrão de invasão em ilhotas e cordões grossos. Em D infiltrado inflamatório mononuclear permeando as ilhotas de células neoplásicas (Hematoxilina e Eosina; A e B = 50X; C e D = 200x). 65

Figura 5 - Imunoexpressão da podoplanina. Em A mucosa bucal demonstrando forte expressão da podoplanina na camada basal. Observar, o front tumoral com padrão de invasão em cordões grossos e ilhotas apresentando expressão para podoplanina nas células malignas periféricas (B). Em C, detalhe da expressão membranosa da podoplanina nas células neoplásicas e ausência de imunomarcagem desta proteína nas pérolas de queratina (D). Os vasos linfáticos (setas) do estroma tumoral foram utilizados como controle interno positivo para a podoplanina (Imuno-histoquímica: anti-podoplanina, A, C e D = 200x, B = 50x). 71

Figura 6 - Imunoexpressão da ezrin. Em A mucosa bucal demonstrando forte expressão membranosa da ezrin principalmente na camada espinhosa do epitélio. Em B e C intensa expressão citoplasmática da ezrin nas células do front de invasão tumoral do CEC de lábio. Em D, forte expressão membranosa e citoplasmática da ezrin nas células neoplásicas centrais e periféricas das ilhotas tumorais com imunomarcagem negativa nas pérolas de queratina. Notar, em B e C, a presença do infiltrado inflamatório mononuclear positivamente corado para ezrin. (Imuno-histoquímica: anti-ezrin, A, B e D = 200x, C = 400x). 77

- GRÁFICOS

Gráfico 1 - Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcagem, da podoplanina nas diferentes localizações. 69

Gráfico 2 - Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcagem da ezrin, na membrana e no citoplasma das células neoplásicas. 75

Gráfico 3 - Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcagem da podoplanina e da ezrin membranosa. 81

Gráfico 4 Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcagem da podoplanina e da ezrin membranosa. 83

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 62
- Tabela 2** - Distribuição dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e das estruturas adjacentes de acordo com as características microscópicas analisadas em Hematoxilina e Eosina. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 64
- Tabela 3** - Expressão da podoplanina membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior de acordo com a intensidade da imunomarcacão. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 67
- Tabela 4** - Expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina nas células neoplásicas periféricas e centrais dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 69
- Tabela 5** - Expressão da ezrin membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior de acordo com a intensidade da imunomarcacão. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 73
- Tabela 6** - Expressão membranosa e citoplasmática da ezrin nas células neoplásicas periféricas e centrais dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 75
- Tabela 7** - Associação entre a expressão da ezrin membranosa e a expressão da podoplanina membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 81
- Tabela 8** - Associação entre a expressão da ezrin citoplasmática e a expressão da podoplanina membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 83
- Tabela 9** - Correlação entre a expressão periférica da podoplanina membranosa e ezrin membranosa/citoplasmática nos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012. 85

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
<	menor
≤	menor ou igual
=	igual
+	positivo
-	negativo
n ^o	número
µm	micrometro
CA	Califórnia
BSA	albumina de soro bovino
CEC	carcinoma espinocelular
CECs	carcinomas espinocelulares
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
DAB	diaminobenzidina Tetrahydrocloroeto
DMSO	dimetilsulfóxido
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
EUA	Estados Unidos da América
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GTP	guanosina trifosfato
HE	hematoxilina e eosina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HP	Hewlett Packard
h	hora
mL	mililitro
mM	milimol
NaN ₃	azida sódica
p	nível de significância
PBS	solução salina fosfatada tamponada
PIP ₂	fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PKC	proteína quinase C
pH	concentração hidrogeniônica
ROCK	rho quinase
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SP	Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
X ²	qui-quadrado

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	PROTEÍNA EZRIN	32
2.4	PROTEÍNA EZRIN E CÂNCER	33
3	PROPOSIÇÃO	41
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	45
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	47
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	48
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	48
4.3.1	Caracterização dos carcinomas espinocelulares em Hematoxilina e Eosina	48
4.3.2	Técnica imuno-histoquímica	48
4.3.3	Avaliação imuno-histoquímica	50
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4.5	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	57
4.6	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	57
5	RESULTADOS	59
5.1	CASUÍSTICA	61
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	61
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	63

5.3.1	Caracterização dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e das estruturas adjacentes em Hematoxilina e Eosina	63
5.3.2	Expressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio	67
5.3.3	Expressão da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio	73
5.3.4	Associação entre a expressão da podoplanina e a ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio	79
5.3.5	Correlação entre a expressão da podoplanina e da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio	80
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO	111

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A podoplanina humana consiste em uma glicoproteína transmembrana que é muito utilizada como marcador de vasos linfáticos por se expressar nas células endoteliais linfáticas, mas não em células endoteliais de vasos sanguíneos (WENINGER et al., 1999; BIRNER et al., 2000; BIRNER et al., 2001). Nos últimos anos, além dos vasos linfáticos, alguns estudos mostraram que a podoplanina apresenta um amplo espectro de imunoexpressão, sendo encontrada tanto em tecidos humanos normais como em tumores benignos e malignos de diferentes origens (DUMOFF et al., 2006; DURCHDEWALD et al., 2008; SHIMADA et al., 2009).

Nas neoplasias malignas, particularmente nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, a expressão da podoplanina pelas células epiteliais neoplásicas tem sido correlacionada com o prognóstico e a sobrevida dos pacientes. Os resultados destas investigações associaram a maior intensidade de expressão dessa proteína com a ocorrência de metástases e com o pior prognóstico para os pacientes (LEE et al., 2011; CHAO et al., 2012; ITO et al., 2012; TONG et al., 2012).

Além disso, os altos níveis de expressão da podoplanina vêm sendo relacionados com o maior grau de displasia epitelial e com o risco aumentado de progressão tumoral, sugerindo que esta proteína pode ser considerada um potencial marcador de transformação tumoral em leucoplasias bucais (KAWAGUCHI et al., 2008; DE VICENTE et al., 2013). Foi demonstrado também que a podoplanina é altamente expressa em alguns epitélios hiperplásicos e displásicos adjacentes aos tumores primários, o que reforça sua expressão precoce na tumorigênese da cabeça e pescoço (YUAN et al., 2006; MARGARITESCU et al., 2010; FUNAYAMA et al., 2011).

Mesmo sendo vastamente estudada nas últimas décadas, a função exata ou a influência da podoplanina no comportamento das células neoplásicas, presentes nos tumores malignos, ainda não foi totalmente esclarecida (KREPPEL et al., 2010; BARTULI et al., 2012; TSUNEKI et al., 2013).

Investigações moleculares mostraram que a porção intracelular da podoplanina pode se ligar as proteínas da família ERM (*e_zrin*, *radixin* e *moesin*) (SCHOLL et al., 1999; MARTIN-VILLAR et al., 2005; WICKI; CHRISTOFORI, 2007). Este complexo proteico ERM ativa com frequência a GTPase RhoA participando por esta via de sinalização dos processos de proliferação, diferenciação, transformação e mobilidade celular, em tecidos normais e em neoplasias malignas (MARTIN-VILLAR et al., 2006; FERNANDEZ-MUNOZ et al., 2011).

Uma das proteínas deste complexo ERM, a *e_zrin* está envolvida em muitas funções celulares fisiológicas incluindo a regulação da actina do citoesqueleto, o controle da forma da célula, a adesão, a mobilidade e a modulação de vias de transdução de sinais celulares (ARPIN; ALGRAIN; LOUVARD, 1994; WINCKLER et al., 1994; TSUKITA; YONEMURA, 1997; BRAMBILLA; FAIS, 2009).

No epitélio da mucosa bucal em condições de normalidade, a expressão da *e_zrin* tem sido observada principalmente na membrana das células da camada espinhosa, sendo mais intensa quando comparada com a expressão citoplasmática (MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013). Entretanto, quando a expressão dessa proteína foi analisada em carcinomas espinocelulares de boca, o padrão de imunoexpressão foi inverso, com predominância da intensa marcação citoplasmática (SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013). Foi observado ainda que exista uma associação positiva entre a alta expressão da *e_zrin* com a ocorrência de metástases e menor sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de boca (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007; SCHLECHT et al., 2012).

Intrigantemente em cultura de células neoplásicas de língua (linhagem HSC-3), o bloqueio da síntese da *e_zrin* induziu as células malignas a diminuir drasticamente sua proliferação, a migração e conseqüentemente, seu poder de invasão (SAITO et al., 2013). Esses resultados sugerem que essa proteína pode estar ligada diretamente a neoplasias mais agressivas, porém seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido.

Embora a expressão marcante de podoplanina e de ezrin seja associada ao pior prognóstico dos pacientes com carcinomas espinocelulares de boca, nenhum estudo avaliando a imunoexpressão conjunta dessas proteínas em câncer de lábio foi encontrado na literatura científica. Assim sendo, nos propusemos a investigar a expressão da podoplanina e da ezrin no câncer de lábio, visando contribuir com o conhecimento sobre a imunolocalização destas proteínas no microambiente tumoral.

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; AL-RAWI; MANSEL; JIANG, 2005; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; NODA et al., 2010). Ela foi inicialmente descrita por Wetterwald et al. (1996), sob a designação de antígeno E11, tendo sido relatada sua ocorrência em células ósseas (osteoblastos e osteócitos), células endoteliais linfáticas, células epiteliais do plexo coroide, células alveolares do tipo I e células mesoteliais do peritônio.

O nome podoplanina foi consagrado em uma pesquisa renal onde se estudou um tipo de nefropatia que diminuía em cerca de 30% a produção desta glicoproteína causando planificação das células epiteliais glomerulares, os podócitos (BREITENEDER-GELEFF et al., 1997). Atualmente o marcador anti-podoplanina mais utilizado é o D2-40 (ORDONEZ, 2006).

A expressão da podoplanina nas células endoteliais linfáticas, mas não em células endoteliais de vasos sanguíneos, foi o alvo inicial das pesquisas desta proteína como um importante marcador de vasos linfáticos que geralmente são de difícil identificação em colorações de rotina. (BREITENEDER-GELEFF et al., 1999; WENINGER et al., 1999; BIRNER et al., 2000; BIRNER et al., 2001).

Estudos posteriores demonstraram a presença dessa proteína em diversos outros tecidos como: as células do ducto biliar, as mioepiteliais glandulares, o epêndima, as células foliculares dendríticas, os condrócitos entre outras, porém sua função, em muitas destas células, ainda não está bem esclarecida (SCHACHT et al., 2005; MARTIN-VILLAR et al., 2006; ORDONEZ, 2006).

Pesquisas demonstraram que a porção intracelular dessa molécula se liga as proteínas da família ERM (*ezrin*, *radixin* e *moesin*) (SCHOLL et al., 1999; MARTIN-VILLAR et al., 2005; WICKI; CHRISTOFORI, 2007), ativando a GTPase

RhoA, associando essa glicoproteína no processo de proliferação, diferenciação, transformação e mobilidade celular, em tecidos normais e em neoplasias malignas (MARTIN-VILLAR et al., 2006; FERNANDEZ-MUNOZ et al., 2011). Com o objetivo de entender o papel da podoplanina em neoplasias malignas, Wicki et al. (2006) demonstraram que células neoplásicas que expressam podoplanina tendem a invadir tecidos adjacentes em grupos de células e não em células individuais. Assim sendo, foi sugerido que a podoplanina poderia não ativar a GTPase RhoA e sim contribuir de outra maneira no processo de invasão tumoral.

Diversas pesquisas analisaram a associação da podoplanina com o prognóstico das neoplasias malignas de diferentes origens como: esôfago (CHAO et al., 2012; TONG et al., 2012), pulmão (SUZUKI et al., 2011; ITO et al., 2012), mama (LEE et al., 2011), útero (CARVALHO et al., 2010), colorretal (YAMANASHI et al., 2009) entre outros. No entanto, esses resultados são controversos: em algumas pesquisas a expressão da podoplanina pelas células neoplásicas foi associada com um pior prognóstico para os pacientes (LEE et al., 2011; CHAO et al., 2012; ITO et al., 2012; TONG et al., 2012), em outras foi indicativa de uma melhor evolução do paciente (YAMANASHI et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; SUZUKI et al., 2011). Esses resultados mostram que pouco se sabe sobre o papel da podoplanina na evolução tumoral, e que provavelmente ela possa ter funções diversas em diferentes tipos de tecidos.

Nos últimos anos, a investigação da podoplanina em neoplasias malignas vem sendo incrementada, entretanto, o papel exato desta proteína nestes tumores ainda não foi totalmente esclarecido.

2.2 PODOPLANINA E CÂNCER DE BOCA

A expressão da podoplanina em lesões potencialmente malignas da cavidade bucal (leucoplasias com diversos graus de displasia) foi avaliada por duas pesquisas relacionando-se o grau de displasia e o risco de progressão tumoral com os níveis de marcação da podoplanina. Altos níveis de expressão dessa molécula foram relacionados com maior grau de displasia e maior risco de progressão tumoral, sendo que na análise multivariada somente a expressão da podoplanina demonstrou um risco aumentado para progressão em carcinoma espinocelular de

boca, sugerindo a podoplanina como um potencial marcador de transformação tumoral em leucoplasias bucais (KAWAGUCHI et al., 2008; DE VICENTE et al., 2013).

Esta glicoproteína é altamente expressa em alguns epitélios hiperplásicos e displásicos adjacentes aos tumores primários, o que reforça sua expressão precoce na tumorigênese da cabeça e pescoço (YUAN et al., 2006; MARGARITESCU et al., 2010; FUNAYAMA et al., 2011).

Yuan et al. (2006) investigou a expressão imuno-histoquímica da podoplanina em carcinomas espinocelulares localizados na hipofaringe e cavidade bucal (35 tumores, T-III ou T-IV) mais 60 tumores especificamente na língua. Os autores observaram que a podoplanina começava a ser expressa em áreas hiperplásicas e/ou displásicas adjacentes às neoplasias. Na amostra de 35 carcinomas espinocelulares, 20 expressaram forte marcação para podoplanina e em 85% destes foi comprovada a presença de metástase linfonodal. Nos carcinomas de língua a relação foi ainda mais forte, onde 60% dos tumores obtiveram forte expressão para a podoplanina e 89% destes evoluíram com metástases linfonodais. Esses resultados sugeriram que a expressão de podoplanina teria uma forte relação com a evolução dos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço e mais especificamente com os tumores da cavidade bucal.

Outros estudos como o de Vormittag et al. (2009) também avaliaram a expressão da podoplanina e do gene Bmi-1 utilizando a imuno-histoquímica, em 63 tumores de cabeça e pescoço e 12 espécimes de mucosa oral normal. Na mucosa bucal normal a expressão da podoplanina foi detectada somente na camada basal do epitélio, entretanto, nos carcinomas espinocelulares observou-se uma forte expressão (86% da amostra), predominantemente na área do front de invasão tumoral. A forte expressão da podoplanina sozinha ou associada à marcação para o gene Bmi-1 foi correlacionada estatisticamente com pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes deste estudo. Intrigantemente os tumores bem diferenciados foram os que apresentaram maior porcentagem de expressão da podoplanina. Os autores sugeriram então, baseados nestes resultados, que a invasão dos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço não ocorria pelo processo de desdiferenciação das células epiteliais.

Em 2010, uma extensa pesquisa feita por Cueni et al. (2010) investigou a expressão da podoplanina *in vivo* e *in vitro*. Os estudos *in vitro* foram realizados a

partir de uma linhagem de carcinoma de mama (MCF7) e demonstraram que a alta expressão da podoplanina induzia um aumento de mobilidade das células neoplásicas. O estudo com 427 carcinomas espinocelulares de boca (252 tumores primários, 128 metástases linfonodais, 29 tumores recorrentes e 20 amostras de mucosa normal), avaliados a partir da técnica de microarranjo e imuno-histoquímica, demonstraram uma marcação predominantemente membranosa e mais forte no front de invasão tumoral. Dos tumores primários 54% tiveram forte expressão da podoplanina e foram correlacionados com o estágio T avançado, com o linfonodo sentinela comprometido e com a menor sobrevida global e específica por doença, além de um aumento da linfangiogênese tumoral. Os autores sugeriram que uma interferência nas funções da podoplanina poderia representar uma nova estratégia terapêutica para o combate ao câncer em estágio avançado.

A associação entre altos níveis de podoplanina em 80 tumores de boca (assoalho bucal, língua, gengiva, palato duro e mucosa jugal), determinados pela imuno-histoquímica e o maior índice de metástase foi analisado por Kreppel et al. (2010). Os resultados demonstraram que nenhum tumor negativo para podoplanina foi associado à metástase, enquanto 79% dos tumores que expressaram fortemente essa proteína sofreram disseminação metastática. A podoplanina foi o único parâmetro analisado que exibiu relação estatística com menor sobrevivência global e específica pela doença, em análise uni e multivariada, demonstrando estatisticamente a relação entre altos níveis de podoplanina e pior prognóstico. Com base nestes resultados os autores concluíram que essa glicoproteína é frequentemente expressa em carcinomas espinocelulares de boca, e essa expressão é correlacionada com ocorrência de metástases e o pior prognóstico para os pacientes.

Também Huber et al. (2011), analisaram a imunomarcagem da podoplanina em 120 carcinomas espinocelulares de boca e orofaringe, a partir da técnica de microarranjo e imuno-histoquímica. A ocorrência de metástase no linfonodo sentinela foi estatisticamente correlacionada com a imunomarcagem de podoplanina nos tumores primários. Outro resultado interessante foi a marcação predominantemente membranosa, porém quanto mais indiferenciado a neoplasia, mais se notava uma tendência a marcação citoplasmática da molécula. Os autores concluíram que a expressão de podoplanina pelo tumor primário pode indicar a

presença de metástases ocultas em linfonodos regionais, indicando-se o esvaziamento cervical do paciente.

Posteriormente, Bartuli et al. (2012) analisaram o papel da podoplanina no desenvolvimento e progressão de 20 carcinomas espinocelulares de boca, pela técnica imuno-histoquímica. Os resultados demonstraram que 45% dos tumores com forte expressão de podoplanina foram correlacionados estatisticamente com maior número de metástase linfonodal e menor sobrevida específica por câncer. A expressão da podoplanina foi focal (periferia da lesão) ou difusa por toda área neoplásica, e com base nos resultados obtidos, os autores sugeriram que a podoplanina pode ser um fator preditivo para metástases em carcinomas espinocelulares de boca e a análise histológica desse biomarcador pode ser útil para prever o risco de desenvolvimento, progressão e invasão nessas neoplasias.

Para testar a possibilidade da podoplanina estar envolvida no processo de transição epitélio-mesenquimal, Foschini et al. (2013) analisaram a expressão de podoplanina e E-caderina utilizando a técnica de imuno-histoquímica, em 102 biópsias incisionais de carcinomas espinocelulares de boca. Os resultados demonstraram que, quando as biópsias apresentavam E-caderina alta ou podoplanina baixa, o índice de metástases era baixo. Baseado nestes resultados os autores denominaram o “Perfil Favorável”, que demonstrava alta expressão de E-caderina e baixa expressão de podoplanina, e o “Perfil Desfavorável”, o inverso do último citado. Marcações fortes para podoplanina quase dobravam o risco de ocorrência de metástase (de 25% para 43,9%), sendo que 77,8% dos casos que apresentaram metástases durante o acompanhamento tinham forte marcação nas biópsias incisionais. Esses resultados demonstraram uma correlação estatística entre alta expressão de podoplanina/baixa expressão de E-caderina com presença de metástases linfonodais. Os autores sugeriram que a avaliação desses biomarcadores em biópsias incisionais de carcinomas espinocelulares de boca pode revelar uma maior possibilidade de metástases futuras.

2.3 PROTEÍNA EZRIN

A proteína ezrin faz parte do complexo ERM (*ezrin, radixin, moesin*), um conjunto de proteínas associadas à membrana citoplasmática e ao citoesqueleto, muito conservada entre as espécies (SATO et al., 1992; TSUKITA et al., 1994; FIEVET; LOUVARD; ARPIN, 2007; ARPIN et al., 2011).

Em células normais, a ezrin parece existir no estado inativo no citoplasma (monômeros, dímeros) e por meio de um processo de fosforilação ela passa para um estado funcional ativo ligando-se a proteínas da membrana citoplasmática ou a outras proteínas no citoplasma (FIEVET; LOUVARD; ARPIN, 2007; NEISCH; FEHON, 2011). Esta proteína está envolvida em muitas funções fisiológicas incluindo a regulação da actina do citoesqueleto, o controle da forma da célula, adesão, mobilidade e modulação de vias de transdução de sinais celulares (BRAMBILLA; FAIS, 2009; ARPIN; ALGRAIN; LOUVARD, 1994; WINCKLER et al., 1994; TSUKITA; YONEMURA, 1997). Estas funções são de fundamental importância durante as fases iniciais do desenvolvimento e na homeostasia de tecidos e órgãos (POLESELLO; PAYRE, 2004).

Em humanos, a proteína ezrin se expressa na membrana celular e no citoplasma do epitélio gastrointestinal (estômago, intestino e cólon) onde está altamente concentrada. Além disso, sua expressão também pode ser observada em ductos de vários órgãos (ducto biliar, túbulos seminíferos, glândulas salivares) e na membrana de células inflamatórias (MADAN et al., 2006).

Na Figura 1 encontra-se um esquema do processo de ativação e algumas das funções da ezrin. Após o processo de ativação (fosforilação), a porção amino-terminal da ezrin se liga a proteínas da membrana plasmática (porção altamente conservada da molécula - FERM) e a porção carboxi-terminal se liga ao citoesqueleto de actina (RECZEK; BERRYMAN; BRETSCHER, 1997; BRETSCHER; EDWARDS; FEHON, 2002; MORALES et al., 2004). Portanto, esta proteína pode receber comandos da membrana plasmática e transduzi-los para o citoesqueleto, controlando a movimentação da célula. Pelo fato da extremidade FERM ser altamente conservada durante a evolução, ela pode se ligar a diferentes proteínas transmembrana (CD44, CD43, Podoplanina, entre outras) (TSUKITA et al., 1994; YONEMURA et al., 1998; MARTIN-VILLAR et al., 2005). Por outro lado, a ezrin em seu estado ativo, pode participar indiretamente do processo de ativação da Rho,

uma GTPase que participa da regulação dos processos de movimentação, divisão e migração celular, em um processo de retroalimentação, onde a proteína ezrin se liga a inibidores da Rho (RhoGDI) liberando a porção ativa dessa GTPase, que além de efetuar os processos citados, pode fosforilar indiretamente mais molécula de ezrin por meio da ativação da Rho quinase (ROCK) (TAKAHASHI et al., 1997; BRETSCHER; EDWARDS; FEHON, 2002). A ativação da via de sinalização da GTPase RhoA nas células malignas é crucial para a disseminação tumoral e ocorrência de metástases (HUNTER, 2004).

Na mucosa bucal normal, a expressão membranosa da ezrin tem sido observada, frequentemente, na camada espinhosa, sendo mais intensa quando comparada com a expressão citoplasmática. Na camada basal e parabasal da mucosa bucal, raramente a expressão membranosa da ezrin pode ser detectada com focos de marcação citoplasmática na camada espinhosa. Portanto, na mucosa bucal normal a expressão desta proteína se localiza na membrana de células epiteliais escamosas mais diferenciadas e que não estão em proliferação (MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013).

Nas últimas duas décadas a proteína ezrin vem sendo investigada no processo de invasão de células malignas em diferentes tipos de neoplasias.

2.4 PROTEÍNA EZRIN E CÂNCER

Várias pesquisas mostraram que a proteína ezrin tem uma função positiva na transformação celular, na sobrevivência e mobilidade e também no processo de invasão de células neoplásicas (TRAN QUANG et al., 2000; NESTL et al., 2001; WICK et al., 2001).

Um dos genes responsáveis pela codificação da ezrin é o Vil2 e, intrigantemente, algumas pesquisas demonstraram que os altos níveis de expressão desse gene em neoplasias infantis como o osteosarcoma e o rabdomiossarcoma estavam associados a uma maior ocorrência de metástases (KHANNA et al., 2004; YU et al., 2004).

Figura 1 - Representação esquemática do processo de ativação da ezrin. No citoplasma a ezrin está inativa em forma de monômero ou dímero. Quando ativada após a fosforilação por diferentes moléculas (PIP₂, PKC, ROCK, entre outras), a ezrin pode se ligar a proteínas transmembrana em sua extremidade N-terminal, enquanto que a outra extremidade, C-terminal, se liga a filamentos de actina promovendo a manutenção da polaridade e forma da célula. Por outro lado, a ezrin também pode se ligar ao inibidor da molécula Rho A (RhoGDI) liberando a porção ativa da Rho, o que ativa fatores de transcrição envolvidos na proliferação, mobilidade e menor adesão entre células. Assim sendo, a via de sinalização da Rho-GTPase pela ezrin pode contribuir para a disseminação de células neoplásicas e o processo de metástases. A GTPase Rho A também pode ativar a molécula de Rho Kinase (ROCK), uma proteína que pode fosforilar a ezrin inativa em sua forma ativa, desenvolvendo assim um mecanismo de retroalimentação entre as duas proteínas.

Pesquisas revelaram que a ativação da proteína transmembrana CD44 pela ligação com a ezrin, pode levar a uma mudança na localização das E-caderinas, saindo da membrana plasmática e se acumulando no citoplasma o que diminui a adesão célula a célula e contribui com o processo de metástases (MARTIN et al., 2003; PUJUGUET et al., 2003).

Um estudo realizado por Cui et al. (2009), a partir de análise proteômica de neoplasias de pâncreas revelou que o aumento das proteínas radixin e moesin juntamente com a mudança do estado de fosforilação da ezrin estava correlacionada com tumores que sofreram metástase. Em tecido mamário sem alterações, a ezrin se localiza sempre na porção apical das células epiteliais, porém em tumores invasivos ela muda sua localização, perdendo sua polarização na membrana, ou até mesmo se concentrando no citoplasma das células tumorais. Esses resultados sugeriram que a alteração da localização dessa proteína também pode ser um indício de pior prognóstico para os pacientes com tumor mamário (SARRIO et al., 2006).

As constatações de que há uma correlação entre a expressão da ezrin e a ocorrência de metástases e/ou pior prognóstico para os pacientes com alguns tipos de neoplasias malignas estão cada vez mais consistentes. Em neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço, especialmente aquelas que ocorrem na cavidade bucal, poucos estudos sobre a expressão da ezrin foram encontrados na literatura científica (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013; WU et al., 2013).

A expressão da proteína ezrin e sua associação com a evolução tumoral foram analisadas em 18 carcinomas espinocelulares de boca e 29 de laringe, por meio da técnica de microarranjo e imuno-histoquímica, por Madan et al. (2006). Os resultados demonstraram que houve expressão citoplasmática de ezrin pelas células malignas em 92,5% dos carcinomas espinocelulares, e a análise multivariada mostrou que a forte expressão de ezrin citoplasmática foi um fator independente associado com pior sobrevida dos pacientes. Os autores sugeriram que tanto a intensidade da expressão da ezrin, como sua localização, pode ser importante indicativo de prognóstico nessas neoplasias.

Posteriormente outro grupo de pesquisadores (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007) analisou uma amostra de 120 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (83 de boca e orofaringe e 37 de hipofaringe e laringe), por meio da técnica

de microarranjo e imuno-histoquímica, quanto à expressão da ezrin, maspin e nm23-H1 e sua correlação com a localização do tumor, grau de diferenciação histológico, metástases e sobrevida livre de doença. A análise estatística comprovou que a alta expressão de ezrin estava correlacionada somente com a menor sobrevida livre de doença, quando comparada com neoplasias com baixa expressão dessas proteínas. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que a ezrin pode ser um potencial marcador de prognóstico nas neoplasias de cabeça e pescoço.

Schlecht et al. (2012) investigaram a expressão de ezrin, moesin, merlin e willin, pela técnica de microarranjo e imuno-histoquímica, em 131 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço primários (43 localizados na cavidade bucal) e sua correlação com a evolução tumoral e sobrevida dos pacientes. Os resultados demonstraram que neoplasias com alta expressão de ezrin citoplasmática estão correlacionadas com um fenótipo invasivo das células, e consequentemente com uma menor sobrevida dos pacientes. Baseados nestes resultados os autores sugeriram que outros estudos com maiores amostras tumorais podem transformar a marcação de ezrin citoplasmática em um indicador de pior prognóstico nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, alterando assim o plano de tratamento dos pacientes portadores dessas neoplasias.

Em um recente estudo, Saito et al. (2013) analisaram a expressão da ezrin em 69 carcinomas espinocelulares de língua, além de 10 espécimes de tecido de língua normal, com a técnica de microarranjo e imuno-histoquímica. Nas amostras de tecido normal a expressão da ezrin era predominantemente membranosa, diferentemente dos carcinomas espinocelulares do mesmo tecido, onde ela se expressava na membrana e fortemente no citoplasma. Houve alta expressão dessa proteína em 46,4% dos carcinomas espinocelulares de língua analisados, sendo que 62,5% dos tumores positivos para ezrin evoluíram com metástases. Outro resultado interessante foi demonstrado em uma cultura de células neoplásicas de língua (linhagem HSC-3), por meio das técnicas de bloqueio de RNA, imunofluorescência, *PCR Real Time* e *Western Blotting*, onde na ausência da ezrin as células diminuíram drasticamente a proliferação, a migração e poder de invasão. Os resultados desse trabalho concordam com aqueles encontrados na literatura, e reforçam que a expressão da ezrin citoplasmática pode ser um potencial alvo terapêutico nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

Outro estudo recente de Wu et al. (2013) analisaram a expressão da ezrin, ABCG2, CD133, Oct-4 e BMI-1 em células CD44 positivas e negativas, por meio da técnica de citometria de fluxo, imunofluorescência e *PCR Real Time*, em uma linhagem de carcinoma espinocelular de boca (SCC-9). Os resultados revelaram uma expressão 38 vezes maior de ezrin em células neoplásicas CD44 positivas quando comparadas com as CD44 negativas. Os autores concluíram que a alta expressão de ezrin pela subpopulação de CD44 positiva da linhagem SCC-9 podem afetar suas funções, contribuindo com o comportamento metastático no carcinoma espinocelular de boca.

Com base nesta revisão de literatura pode-se verificar que existem fortes evidências de que a expressão de ezrin parece estar associada ao pior prognóstico para os pacientes com carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, incluindo aqueles de boca. Assim sendo, neste trabalho, nos propusemos a investigar a expressão da ezrin e sua possível correlação com a podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio onde estas proteínas têm sido pouco estudadas.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

- 1) A partir da análise microscópica de 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, propôs-se:
 - avaliar a expressão imuno-histoquímica da podoplanina e da ezrin pelas células epiteliais neoplásicas;
 - correlacionar a expressão membranosa e/ou citoplasmática da podoplanina e da ezrin pelas células malignas.
- 2) Contribuir com o conhecimento sobre o padrão de expressão da podoplanina e da ezrin na carcinogênese bucal, particularmente no carcinoma espinocelular de lábio inferior.

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 biópsia incisional de lesões em lábio inferior, cujo resultado do exame anatomopatológico foi carcinoma espinocelular. Todos os espécimes levantados foram obtidos do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, no período 1990 a 2012.

Todas as biópsias com diagnóstico de carcinoma espinocelular em lábio inferior, no período supracitado foram levantadas, sendo separadas as lâminas contendo os cortes microscópicos e a fichas de requisição do exame anatomopatológico. Ao final do levantamento 70 tumores formaram a população da pesquisa sendo aplicados os seguintes critérios de inclusão:

- pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular localizados em lábio inferior, confirmado pela histopatologia;
- disponibilidade e adequada conservação dos blocos de parafina dos tumores estudados e
- volume de material emblocado suficiente para a análise microscópica.

Após a aplicação dos critérios de inclusão, foram selecionados 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior para compor a amostra da pesquisa.

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações referentes aos pacientes e a biópsia, foram obtidas a partir das requisições dos exames anatomopatológicos contendo dados demográficos dos pacientes, história clínicas das lesões e dados da biópsia, pertencentes ao Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Bauru - USP. Estes registros incluíram informações referentes ao gênero, idade, raça, tempo de evolução e diagnóstico microscópico final.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.3.1 Caracterização dos carcinomas espinocelulares em Hematoxilina e Eosina

Os carcinomas espinocelulares de lábio inferior foram analisados em Hematoxilina e Eosina sendo mantida a graduação de malignidade encontrada no laudo histopatológico emitido.

Além da caracterização da área neoplásica com base nas características microscópicas, também foram avaliados as margens cirúrgicas displásicas e/ou mucosa normal adjacente à lesão com base na espessura do epitélio e no padrão de queratinização. Observou-se ainda, o tipo e a intensidade do infiltrado inflamatório, a presença de ulceração bem como a presença de pele com anexos cutâneos.

4.3.2 Técnica imuno-histoquímica

As marcações imuno-histoquímicas realizadas nessa pesquisa seguiram o protocolo de reações utilizado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, com diluições dos anticorpos primários previamente padronizadas. A técnica está descrita em detalhes a seguir:

- ❖ Desparafinizar os cortes microscópicos dos tumores de lábio inferior de 3 µm de espessura em estufa a 60°C por 24 horas;
- ❖ Hidratar os 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 e
 - Etanol 70% por 30 segundos.
- ❖ Lavar as 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. 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.
- ❖ Bloquear a peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, 4 trocas de 5 minutos cada. Lavar em água corrente e destilada e após esta etapa, lavar com solução salina fosfatada tamponada (PBS), 10 mM pH 7.4 por 5 minutos;
- ❖ Incubar as 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:
 - Ezrin – Clone 3C12 – diluição 1:1000 – Neomarkers cat# MS661, Fremont, CA, EUA.
 - Podoplanina – Clone D2-40 – Diluição 1:200 – Dako cat# M3619, Glostrup, Dinamarca.
- ❖ Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ❖ Incubar por 30 min a 37°C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);
- ❖ Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ❖ Incubar com NovoLink Polymer por 30 min a 37°C (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);

- ❖ Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ❖ Incubar as lâminas em solução substrato, composta por: 100mg de 3, 3' Diaminobenzidina Tetrahydrocloro (DAB) (Sigma, cat# D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1mL de H₂O₂ 6% e 100mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz;
- ❖ Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação;
- ❖ Lavar em água corrente e destilada por 3 minutos;
- ❖ Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- ❖ Lavar em água corrente e destilada;
- ❖ Imergir 2 vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada;
- ❖ Desidratar os cortes microscópicos:
 - Etanol 80% por 30 segundos;
 - Etanol 95% por 30 segundos;
 - Etanol 100% por 30 segundos, 2 vezes e
 - Xilol por 30 segundos, 4 vezes.
- ❖ Montar as lâminas em Entellan Neu (Merck, cat# 1.07961, Alemanha).

Como controle positivo utilizou-se um corte de tonsila palatina para o anticorpo anti-podoplanina e um corte de intestino delgado para o anticorpo anti-ezrin. Como controle negativo para ambas as marcações, utilizou-se um corte do mesmo tecido com a omissão dos anticorpos primários.

4.3.3 Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação da expressão imuno-histoquímica da podoplanina e da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio foi feita na área mais profunda dos tumores (*front* de invasão), contendo células epiteliais neoplásicas.

Utilizou-se um sistema computadorizado de captura de imagens visando registrar o maior número de campos microscópicos tumorais apresentando imunomarcção da podoplanina e da ezrin. Fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha) contendo uma objetiva de 40X.

A câmera digital foi conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviando suas imagens a um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6 ZEISS, Jena, Alemanha), como pode ser visto na Figura 2. Cada campo microscópico tumoral foi previamente padronizado neste programa com o intuito de evitar diferenças na intensidade de expressão dos anticorpos analisados. O controle interno da podoplanina foi feito pela coloração dos vasos linfáticos e o da ezrin pela coloração do infiltrado inflamatório mononuclear presente na lâmina.

Para cada carcinoma espinocelular de lábio, imunomarcado com podoplanina ou ezrin, foram capturados 15 campos microscópicos distintos na região do *front* de invasão tumoral, contendo o maior número de células epiteliais neoplásicas por campo. Para cada anticorpo (anti-podoplanina e anti-ezrin) foi criado um arquivo no Microsoft Windows contendo pastas específicas com o registro das imagens tumorais capturadas dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior.

A análise das imagens foi feita por dois avaliadores independentes (A.S.G e D.T.O) utilizando-se o mesmo software de visualização de imagens para ambos os anticorpos (Visualizador de fotos do Windows). O processo de avaliação dos campos foi feito sempre no mesmo ambiente e com mesmo computador (Core 2 Duo, HP).

A expressão imuno-histoquímica da podoplanina e da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio foi avaliada por um método semi-quantitativo de escores adaptado do trabalho de Soini et al. (2001). O escore final da expressão de podoplanina e ezrin pelas células malignas foi determinado pela soma da intensidade da imunomarcção (0 – sem marcação, 1 – imunomarcção fraca, 2 – imunomarcção moderada e 3 – imunomarcção forte;) com a porcentagem de células com imunomarcção 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 imunomarcadas).

Para cada campo capturado foram feitas duas análises distintas, células periféricas da ilhota e células centrais da ilhota. Em cada uma das localizações foram analisadas as imunomarcações membranosa e citoplasmática e os dados foram contabilizados em uma planilha do Microsoft Excel (Microsoft Co.).

O escore final de cada espécime foi dado pela moda dos valores obtidos na análise dos 15 campos capturados. Quando foi obtido mais de um valor como moda dos resultados, foi utilizado sempre o maior número. Por fim, o escore obtido dos tumores, na marcação membranosa e citoplasmática, foi classificado em três grupos (Figura 3):

- 0 (escore 0) = ausente;
- 1 (escores de 1 a 3) = fraco;
- 2 (escores de 4 a 7) = forte.

Ao final do processo de avaliação dos carcinomas espinocelulares de lábio, os valores foram contabilizados em uma planilha, discriminando a identificação de cada neoplasia, local da área analisada (periferia ou centro) e seu valor para imunomarkação citoplasmática e imunomarkação membranosa.

Para fins da análise estatística, os resultados fraco e forte (1 e 2) foram considerados juntos formando o grupo de imunomarkação tumoral positiva, e os com escore 0 formaram o grupo de imunomarkação tumoral negativa.

Figura 2 - Imagem capturada de um campo microscópico no programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS).

Figura 3 - Avaliação da imunomarcação do anticorpo anti-podoplanina na região do front de invasão tumoral. A: Imunomarcação negativa; B: Imunomarcação Fraca; C: Imunomarcação Forte. (A, B e C = 400x).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS *for Windows* versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

A associação entre a imunomarcção membranosa e citoplasmática da podoplanina e da ezrin nas células neoplásicas periféricas e centrais dos carcinomas espinocelulares de lábio foi realizada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

A correlação entre a expressão da podoplanina membranosa e da ezrin membranosa e citoplasmática nas células periféricas tumorais foi realizada pelo teste de correlação de Spearman com nível de significância de 5%.

4.5 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do mesmo sistema de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS) utilizadas para avaliação imuno-histoquímica.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo em reunião do dia 02 de maio de 2012, sob o nº 17194 (Anexo A).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

A amostra de estudo foi formada por 48 carcinomas espinocelulares localizados no lábio inferior, pertencentes ao arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, período 1990 a 2012.

As características teciduais e celulares avaliadas em coloração de rotina, ou seja, Hematoxilina e Eosina, bem como a expressão imuno-histoquímica da podoplanina e da ezrin no *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares de lábio, estão descritas a seguir e ilustradas em tabelas, gráficos e fotomicrografias.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A idade dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior variou entre 23 a 85 anos, com uma média de idade de 63 anos (Tabela 1).

Quanto ao gênero, os homens foram mais afetados pelo tumor, aproximadamente 80% da amostra (38 dos 48 pacientes). A raça estava especificada em somente 25 dos 48 pacientes, sendo que em 23 destes a raça era branca (92%) e nas duas outras a raça era negra (Tabela 1).

O tempo mínimo de evolução do carcinoma espinocelular de lábio foi de dois meses e o máximo de 60 meses, sendo a mediana de quatro meses (em um paciente o tempo foi descrito como indeterminado). Em 12 pacientes o tumor apresentava um tempo inferior ou igual a quatro meses, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Variável	Carcinoma Espinocelular de Lábio
	N (%)
Idade*	
≤ 63 anos	21 (47,7%)
> 63 anos	23 (52,3%)
Gênero	
Masculino	38 (79,2%)
Feminino	10 (20,8%)
Raça*	
Branca	23 (92,0%)
Negra	2 (8,0%)
Tempo de Evolução*	
≤ 4 meses	12 (57,1%)
> 4 meses	9 (42,9%)
Total	48 (100%)

N: número de carcinomas espinocelulares de lábio inferior; *: excluídos pacientes com informação ignorada.

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.3.1 Caracterização dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e das estruturas adjacentes em Hematoxilina e Eosina

Os carcinomas espinocelulares de lábio inferior foram classificados seguindo a graduação de malignidade encontrada no laudo histopatológico, sendo estes predominantemente bem diferenciados, alguns moderadamente diferenciados, com presença frequente de pérolas de queratina, baixo grau de pleomorfismo celular e poucas mitoses atípicas (Figura 4B e 4C). O padrão de invasão no *front* tumoral frequentemente observado foi o de cordões grossos.

A mucosa labial e/ou vermelhão do lábio foram encontrados nas margens cirúrgicas de 40 dos 48 tumores analisados, sendo que em 85% destes, o epitélio apresentava-se hiperplásico (Tabela 2 e Figura 4A). Em relação ao tipo de queratina encontrada nessa região, 23 espécimes apresentaram ortoqueratina e os outros 17 paraqueratina. Displasia de leve a moderada na mucosa bucal adjacente ao tumor foi encontrada em 14 espécimes (Tabela 2).

As regiões de epiderme com padrão de normalidade ocorreram nas margens cirúrgicas de 18 dos 40 tumores. As áreas ulceradas foram encontradas frequentemente, aparecendo em quase 73% dos tumores analisados, ou seja, 35 dos 48 tumores analisados, como ilustrado na Tabela 2.

O infiltrado inflamatório observado foi predominantemente mononuclear, porém focos de polimorfonucleares também foram constantemente encontrados próximos às áreas ulceradas. Na maioria dos tumores, a intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear foi intenso em 14,5% dos tumores, moderada em 73% dos tumores e discreto em 12,5% dos tumores (Tabela 2 e Figura 4D).

Tabela 2 - Distribuição dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior e das estruturas adjacentes de acordo com as características microscópicas analisadas em Hematoxilina e Eosina. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Características Microscópicas	Carcinoma Espinocelular de Lábio N (%)
Epitélio adjacente ao tumor*	
Hiperplásico	34 (85%)
Atrófico	06 (15%)
Displasia Epitelial*	
Ausente	26 (65%)
Leve	12 (30%)
Moderada	02 (05%)
Epiderme*	
Presente	18 (45%)
Ausente	22 (55%)
Queratinização*	
Ortoqueratinizado	23 (57,5%)
Paraqueratinizado	17 (42,5%)
Ulceração	
Presente	35 (73%)
Ausente	13 (27%)
Infiltrado Inflamatório	
Mononuclear	13 (27%)
Mononuclear + Polimorfonuclear	35 (73%)
Infiltrado Inflamatório Mononuclear	
Discreto	06 (12,5%)
Moderado	35 (73%)
Intenso	07 (14,5%)
Total	48 (100%)

N: número de carcinomas espinocelulares de lábio inferior; *: Para essas características o n total foi de 40.

Figura 4 - Características microscópicas dos carcinomas espinocelulares de lábio. Em A mucosa bucal hiperplásica e ortoqueratinizada, adjacente à área neoplásica. Em B e C carcinoma espinocelular bem diferenciado, com formação de pérolas de queratina, baixo grau de pleomorfismo e padrão de invasão em ilhotas e cordões grossos. Em D infiltrado inflamatório mononuclear permeando as ilhotas de células neoplásicas (Hematoxilina e Eosina; A e B = 50X; C e D = 200x).

5.3.2 Expressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio

A expressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi avaliada na região de *front* de invasão tumoral, tanto nas células periféricas dos cordões e ilhotas, como nas células centrais. Em alguns espécimes, a avaliação dessa proteína também foi realizada na mucosa bucal adjacente aos tumores e na epiderme da região labial, quando presentes.

A expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina na periferia e no centro das ilhotas dos carcinomas espinocelulares de lábio, com base no sistema de escore utilizado, pode ser observada na Tabela 3. Dos 45 espécimes positivos para essa proteína, 43 demonstraram forte e duas fraca imunomarcacão membranosa. A forte expressão citoplasmática da podoplanina foi detectada em 26 tumores, porém, em 13 CEC de lábio a imunomarcacão foi fraca (Tabela 3). A área central das ilhotas tumorais foi predominantemente negativa para esta proteína, tanto na membrana como no citoplasma das células neoplásicas.

No *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio, observou-se uma intensa marcação membranosa das células periféricas tumorais (93,8% dos espécimes), como pode ser visto na Tabela 4 e na Figura 5B e 5C. Nestas mesmas células neoplásicas periféricas a expressão citoplasmática da podoplanina ocorreu em 81,2% dos tumores (Tabela 4).

Tabela 3 - Expressão da podoplanina membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior de acordo com a intensidade da imunomarcacão. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Podoplanina	Periferia			Centro		
	Ausente	Fraco	Forte	Ausente	Fraco	Forte
Membrana	3	2	43	38	0	10
Citoplasma	9	13	26	39	2	7

Nas áreas de intensa queratinização como nas pérolas de queratinas presentes nos tumores não houve expressão da podoplanina (Figura 5D).

Na mucosa bucal adjacente ao tumor e/ou vermelhão do lábio, incluindo as áreas displásicas, a podoplanina se expressou predominantemente na membrana citoplasmática das células da camada basal do epitélio (Figura 5A). Esse mesmo padrão de expressão da proteína também foi encontrado na epiderme e no epitélio dos anexos cutâneos. Os vasos linfáticos presentes na submucosa labial foram fortemente marcados pela podoplanina, sendo utilizados como controle interno positivo (Figura 5).

Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a expressão (membranosa ou citoplasmática) da podoplanina nas células neoplásicas periféricas e centrais dos carcinomas espinocelulares de lábio (Tabela 4). Entretanto, a comparação da imunomarcção membranosa e citoplasmática da podoplanina (Gráfico 1) na mesma região tumoral (periferia ou centro) foi semelhante e sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,064$ para a periferia e $p = 0,798$ para o centro).

Tabela 4 - Expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina nas células neoplásicas periféricas e centrais dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Podoplanina	Periferia		Centro		Periferia X Centro
	(-)	(+)	(-)	(+)	
Membrana	3	45	38	10	p<0,001
	(6,2%)	(93,8%)	(79,1%)	(20,9%)	
Citoplasma	9	39	39	9	p<0,001
	(18,8%)	(81,2%)	(81,2%)	(18,8%)	

p: nível de significância da podoplanina no teste do qui-quadrado; (-): número de tumores negativos para marcação da podoplanina; (+): número de tumores positivos para marcação da podoplanina.

Gráfico 1 - Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcação, da podoplanina nas diferentes localizações.

Figura 5 - Imunoexpressão da podoplanina. Em A mucosa bucal demonstrando forte expressão da podoplanina na camada basal. Observar, o *front* tumoral com padrão de invasão em cordões grossos e ilhotas apresentando expressão para podoplanina nas células malignas periféricas (B). Em C, detalhe da expressão membranosa da podoplanina nas células neoplásicas e ausência de imunomarcagem desta proteína nas pérolas de queratina (D). Os vasos linfáticos (setas) do estroma tumoral foram utilizados como controle interno positivo para a podoplanina (Imuno-histoquímica: anti-podoplanina, A, C e D = 200x, B = 50x).

5.3.3 Expressão da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio

A avaliação da expressão da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio inferior, foi semelhante aquela realizada para a podoplanina, ou seja, analisou-se tanto as células neoplásicas periféricas como as da região central dos cordões e ilhotas na região de *front* de invasão tumoral.

A imunoexpressão da ezrin foi idêntica na região central e periférica dos carcinomas espinocelulares de lábio. Dos 44 tumores com imunopositividade para essa marcação, 38 apresentaram forte e 6 fraca imunomarcação citoplasmática (Tabela 5). Na maioria dos tumores, a expressão membranosa da ezrin foi ausente (30 CECs de lábio) e a imunopositividade foi forte em 13 espécimes (Tabela 5).

Uma forte expressão desta proteína foi detectada no citoplasma das células neoplásicas na grande maioria dos CEC de lábio (91,6% dos espécimes) conforme ilustrado na Tabela 6 e Figura 6B. A expressão membranosa da ezrin estava ausente em 62,5% dos tumores (Figura 6C) e foi positiva em 37,5% CEC de lábio, independente da localização, ou seja, periferia ou centro do tumor conforme ilustrado na Tabela 6 e Figura 6D.

Tabela 5 - Expressão da ezrin membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior de acordo com a intensidade da imunomarcação. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Ezrin	Periferia			Centro		
	Ausente	Fraco	Forte	Ausente	Fraco	Forte
Membrana	30	5	13	30	5	13
Citoplasma	4	6	38	4	6	38

Notou-se também uma forte marcação de ezrin nas células do infiltrado inflamatório mononuclear que acompanhava os tumores, entretanto, nas pérolas de queratina esta expressão estava ausente (Figura 6D).

Na mucosa bucal adjacente aos tumores, a ezrin foi detectada, predominantemente, na membrana das células da camada espinhosa do epitélio (Figura 6A) e, esporadicamente, no citoplasma das células da camada basal e espinhosa. Interessantemente esse último padrão de marcação foi constantemente associado a áreas displásicas encontradas nesse tecido. Na epiderme e nos anexos cutâneos a imunomarcação membranosa da ezrin também foi observada.

A expressão da ezrin nas células neoplásicas periféricas ou centrais dos CEC de lábio foi predominantemente citoplasmática quando comparada a sua expressão membranosa (Gráfico 2), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), como ilustrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Expressão membranosa e citoplasmática da ezrin nas células neoplásicas periféricas e centrais dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Ezrin	Periferia		Centro		Membrana X Citoplasma
	(-)	(+)	(-)	(+)	
Membrana	30	18	30	18	p<0,001
	(62,5%)	(37,5%)	(62,5%)	(37,5%)	
Citoplasma	4	44	4	44	
	(8,4%)	(91,6%)	(8,4%)	(91,6%)	

p: nível de significância da ezrin no teste do qui-quadrado; (-): número de tumores negativos para marcação da ezrin; (+): número de tumores positivos para marcação da ezrin.

Gráfico 2 - Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcagem da ezrin, na membrana e no citoplasma das células neoplásicas.

Figura 6 - Imunoexpressão da ezrin. Em A mucosa bucal demonstrando forte expressão membranosa da ezrin principalmente na camada espinhosa do epitélio. Em B e C intensa expressão citoplasmática da ezrin nas células do *front* de invasão tumoral do CEC de lábio. Em D, forte expressão membranosa e citoplasmática da ezrin nas células neoplásicas centrais e periféricas das ilhotas tumorais com imunomarcagem negativa nas pérolas de queratina. Notar, em B e C, a presença do infiltrado inflamatório mononuclear positivamente corado para ezrin. (Imuno-histoquímica: anti-ezrin, A, B e D = 200x, C = 400x).

5.3.4 Associação entre a expressão da podoplanina e a ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio

A associação entre a expressão da ezrin e da podoplanina pelas células neoplásicas no *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares de lábio inferior foi comparada, estatisticamente, pelo teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%.

A comparação da ezrin membranosa com a expressão da podoplanina membranosa ou citoplasmática pelas células neoplásicas, tanto na periferia como no centro das ilhotas tumorais pode ser observada na Tabela 7 e Gráfico 3.

Na maioria dos CEC de lábio a expressão membranosa da ezrin foi negativa independente da localização (periferia ou centro do tumor) e quando comparada com a expressão periférica da podoplanina (membranosa ou citoplasmática) observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), como descrito na Tabela 7.

Em relação às células neoplásicas do centro das ilhotas tumorais a expressão membranosa da ezrin e da podoplanina foi predominantemente negativa e sem diferença estatística significativa ($p = 0,072$). Houve uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,041$) entre a expressão membranosa da ezrin quando comparada com a expressão citoplasmática da podoplanina, como pode ser observado na Tabela 7 e no Gráfico 3.

A expressão citoplasmática da ezrin foi detectada na grande maioria dos CEC de lábio tanto na periferia como no centro das ilhotas tumorais e a associação desta proteína com a podoplanina (periférica ou central) pode ser visualizada na Tabela 8 e no Gráfico 4.

A expressão da ezrin citoplasmática não apresentou diferença significativa quando comparada com a expressão da podoplanina periférica (membrana $p = 0,695$ e citoplasma $p = 0,136$), como descrito na Tabela 8. No entanto, uma diferença foi encontrada entre a expressão da ezrin citoplasmática e a podoplanina localizada no centro dos cordões e ilhotas tumorais ($p < 0,001$), ou seja, a podoplanina mostrou uma presença marcante na periferia das ilhotas tumorais, sendo normalmente ausente nas células centrais, enquanto que a expressão de

ezrin foi semelhante no centro e na periferia das ilhotas tumorais do *front* de invasão tumoral (Gráfico 4).

5.3.5 Correlação entre a expressão da podoplanina e da ezrin nos carcinomas espinocelulares de lábio

A correlação entre a expressão nas células neoplásicas periféricas da podoplanina membranosa com a ezrin foi analisada pelo teste de correlação de Spearman com nível de significância de 5%.

Houve uma correlação positiva, mas não estatisticamente significativa, entre a expressão da podoplanina membranosa com a ezrin membranosa ($r=0,100$, $p=0,500$) e citoplasmática ($r=0,145$, $p=0,324$).

Tabela 7 - Associação entre a expressão da ezrin membranosa e a expressão da podoplanina membranosa e citoplasmática nas células neoplásicas da periferia e do centro dos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

CEC	Ezrin		Podoplanina		EM		EM		EM		EM	
					X		X		X		X	
					PMP		PMC		PCP		PCC	
	Membrana		Membrana		Citoplasma							
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)						
Periferia	30	18	3	45	9	39	p<0,001		p=0,072		p<0,001	
Centro	30	18	38	10	39	9					p=0,041	

CEC: carcinoma espinocelular de lábio; EM: ezrin membranosa; PMP: podoplanina membranosa periférica; PCP: podoplanina citoplasmática periférica; PMC: podoplanina membranosa central; PCC: podoplanina citoplasmática central; (-): número de tumores negativos para marcação especificada; (+): número de tumores positivos para marcação especificada; p: nível de significância no teste de qui-quadrado.

Gráfico 3 - Quantidade de carcinomas espinocelulares positivos a imunomarcção da podoplanina e da ezrin membranosa.

Tabela 9 - Correlação entre a expressão periférica da podoplanina membranosa e ezrin membranosa/citoplasmática nos 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior. Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, SP, 1990 a 2012.

Imunomarcadores	Coeficiente de correlação	p
PM x EM	$r = 0,100$	$p = 0,500$
PM X EC	$r = 0,145$	$p = 0,324$

PM: podoplanina membranosa; EM: ezrin membranosa; EC: ezrin citoplasmática; r: coeficiente de correlação de Spearman; p: nível de significância no teste de correlação de Spearman.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas muitas pesquisas com foco no papel da podoplanina em neoplasias malignas e particularmente no carcinoma espinocelular de boca foram realizadas (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013), no entanto, estudos que analisaram particularmente os tumores de lábio são escassos, ainda que esta neoplasia permaneça como uma das mais frequentemente encontradas na cavidade bucal (KYZAS; STEFANO; AGNANTIS, 2004; VUKADINOVIC et al., 2007; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2011).

O lábio se diferencia dos outros epitélios bucais por ser recoberto em sua maior parte por queratina, e não por paraqueratina como a maioria das áreas bucais (BARRETT et al., 2005) e os CEC nesta região se caracterizam por serem neoplasias de comportamento clínico indolente, com crescimento lento, bom prognóstico e poucas metástases (VUKADINOVIC et al., 2007; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012).

A podoplanina humana é uma glicoproteína que foi utilizada inicialmente para diferenciar vasos linfáticos de vasos sanguíneos, devido a sua afinidade somente a células endoteliais linfáticas (BREITENEDER-GELEFF et al., 1999; WENINGER et al., 1999; BIRNER et al., 2000; BIRNER et al., 2001). No entanto, pesquisas recentes demonstraram que a forte expressão dessa proteína em células malignas de diversos tipos de neoplasias, inclusive da cavidade bucal, estava associada com um pior prognóstico e uma menor sobrevida para os pacientes (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; BARTULI et al., 2012).

Devido ao fato da podoplanina ser transmembrana, ela pode se ligar a proteínas citoplasmáticas e transduzir sinais do meio extracelular para o interior da célula. Interessantemente, foi demonstrada a conexão da podoplanina com as

proteínas do complexo ERM (*ezrin, radixin, moesin*), que estão envolvidas na ligação direta ao citoesqueleto de actina, e consequentemente, participam do processo de movimentação celular (SCHOLL et al., 1999; MARTIN-VILLAR et al., 2005; WICKI; CHRISTOFORI, 2007).

Por estar envolvida no processo de manutenção da forma e polaridade das células, a ezrin se localiza em um estado funcional ativo na periferia celular junto à membrana citoplasmática das células escamosas que não estão em proliferação (MADAN et al., 2006; SAITO et al., 2013)

Algumas investigações recentes demonstraram um aumento da expressão citoplasmática da ezrin em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, o que foi correlacionado com um maior índice de metástases e com a menor sobrevida livre de doença do paciente (MADAN et al., 2006; MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2007; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013; WU et al., 2013). Além disso, Saito et al. (2013) demonstrou *in vitro* que a inibição da expressão de ezrin em células tumorais altera a remodelação da actina do citoesqueleto reduzindo assim a mobilidade e o potencial de invasão das células malignas.

O papel biológico exato e o significado clínico da expressão da ezrin nas neoplasias malignas, bem como de sua possível ligação com a podoplanina nestes tumores, não está totalmente esclarecido. Assim sendo, o foco do presente estudo foi investigar, por meio da imuno-histoquímica, a localização e a correlação entre a expressão de ambas as proteínas no processo de invasão dos CECs de lábio.

A amostra dos 48 carcinomas espinocelulares localizados no lábio inferior, pertencentes ao arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, mostrou um perfil clínico e demográfico já bem estabelecido para os pacientes com esta neoplasia maligna (OCHSENIUS et al., 2003; ABREU et al., 2004; SALGARELLI et al., 2009; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012).

Com relação à idade, os indivíduos eram predominantemente idosos, com média de idade de 63 anos, e somente cinco pacientes com menos de 50 anos. Os homens foram afetados quase quatro vezes mais que as mulheres, com 79,2% e 20,8%, respectivamente. A raça predominantemente encontrada foi a branca com

92% da amostra, e o tempo de evolução médio dos tumores analisados foi de quatro meses (Tabela 1).

Os carcinomas espinocelulares de lábio são geralmente tumores bem diferenciados, com formação de pérolas de queratina, baixo grau de pleomorfismo nuclear, escassas mitoses atípicas, discreto hiperchromatismo nuclear e, frequentemente apresentam ulcerações (GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012). A classificação microscópica encontrada nos laudos histopatológicos foi compatível com a descrição acima e a análise das lâminas na coloração de Hematoxilina/Eosina confirmou as características apresentadas (Figura 4B e 4C).

O infiltrado inflamatório mononuclear permeando a área neoplásica foi encontrado em todos os CECs de lábio (Figura 4D) e o infiltrado inflamatório polimorfonuclear foi encontrado em 73% da amostra, associado principalmente as áreas ulceradas (Tabela 2).

Clinicamente, os CECs de lábio apresentam um bom prognóstico, com metástases tardias e uma alta taxa de cura (VUKADINOVIC et al., 2007; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012). Este perfil poderia explicar porque, embora a expressão de biomarcadores como a podoplanina e a ezrin em carcinomas espinocelulares de boca vem sendo muito estudada nos últimos anos (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; HUBER et al., 2011), os estudos destas proteínas, especificamente em CEC de lábio, são escassos.

Nossos resultados mostraram que a mucosa bucal, localizada nas margens cirúrgicas das áreas neoplásicas, apresentava uma forte expressão da podoplanina predominantemente na membrana citoplasmática e, ocasionalmente, em menor intensidade no citoplasma das células da camada basal do epitélio (Figura 5A). Esses achados reforçam aqueles descritos por Margaritescu et al. (2010); Funayawa et al. (2011) e Vormittag et al. (2009), que também demonstraram a expressão membranosa da podoplanina em mucosa bucal.

Nas áreas de displasia epitelial da mucosa bucal, adjacente ao CEC de lábio, também se observou uma forte expressão membranosa e, algumas vezes, citoplasmática da podoplanina, sendo este padrão de imunomarcacão também encontrado por (KAWAGUCHI et al., 2008; DE VICENTE et al., 2013), em lesões potencialmente malignas como as leucoplasias bucais com displasia epitelial. Tem

sido sugerido que a expressão membranosa da podoplanina em células supra-basais da mucosa bucal parece refletir lesões com maior grau de displasia epitelial e com maior possibilidade de transformação maligna (INOUE et al., 2012; DE VICENTE et al., 2013).

Assim como detectados em outros estudos de CEC de boca (CUENI et al., 2010; MARGARITESCU et al., 2010; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013) os vasos linfáticos do estroma tumoral foram fortemente marcados pela podoplanina sendo utilizados, no presente estudo, como controle interno positivo da técnica imuno-histoquímica.

Em relação às células malignas do *front* de invasão do CEC de lábio, nossos resultados demonstraram uma intensa marcação da podoplanina nas células periféricas e ausência de imunomarcação nas células centrais das ilhotas e cordões tumorais (Figura 5B e 5C), sendo esta diferença entre a expressão periférica e central da podoplanina, tanto membranosa como citoplasmática, estatisticamente significativa (Tabela 4).

Esses resultados concordam com os encontrados na literatura (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; BARTULI et al., 2012) onde foi relatado um aumento da expressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca e particularmente nos trabalho de Cueni et al. (2010) e Inoue et al. (2012) onde foi evidenciada uma forte expressão membranosa da podoplanina nas células neoplásicas no *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca. Além disso, nossos resultados em câncer de lábio reforçam a constatação de que a expressão predominante da marcação membranosa da podoplanina está associada a carcinomas espinocelulares de boca bem diferenciados (HUBER et al., 2011), pois nossa amostra estava constituída por tumores com alto grau de diferenciação celular.

Evidências de que a podoplanina pode se ligar a ezrin (SCHOLL et al., 1999; MARTIN-VILLAR et al., 2005; WICKI et al., 2006) citoplasmática, e com isso, participar, via citoesqueleto, da movimentação celular e de que a invasão de células neoplásicas depende da remodelação ativa do citoesqueleto (WICKI; CHRISTOFORI, 2007) constituíram a base da presente investigação sobre a participação conjunta dessas proteínas neste estudo de CEC de lábio.

A expressão da ezrin, assim como a podoplanina, também foi detectada tanto na mucosa bucal das margens cirúrgicas como nas células malignas do carcinoma espinocelular de lábio. No epitélio da mucosa bucal observou-se a presença da ezrin na membrana das células da camada espinhosa e por vezes, no citoplasma das células da camada basal (Figura 6A). Esse mesmo padrão de expressão da ezrin foi descrito por outros autores (MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013), que verificaram a presença desta proteína em células epiteliais escamosas mais diferenciadas e que não estavam em proliferação.

Como a proteína ezrin faz parte do complexo ERM associado à membrana citoplasmática e ao citoesqueleto (SATO et al., 1992; TSUKITA et al., 1994; FIEVET; LOUVARD; ARPIN, 2007; ARPIN et al., 2011), a expressão membranosa desta proteína na mucosa bucal ou em células malignas, como observado no presente estudo, reforça sua participação no controle do fenótipo celular.

Por outro lado, o aumento da expressão citoplasmática de ezrin em áreas epiteliais displásicas, juntamente com o forte padrão citoplasmático encontrado (Gráfico 2) nos carcinomas espinocelulares de lábio (Figura 6B e 6C e Tabela 6) do presente estudo, sugere que essa proteína provavelmente está participando indiretamente de outras vias de sinalização celular envolvidas em processos de proliferação, migração, invasão e metástase, conforme descrito por outros autores (TRAN QUANG et al., 2000; NESTL et al., 2001; WICK et al., 2001).

Como já descrito anteriormente, a ezrin faz parte do complexo ERM sendo composta por três domínios funcionais: FERM, N- terminal e C-terminal. Ela se conecta a proteínas da membrana plasmática através do domínio N-terminal e FERM e ao citoesqueleto de actina através do domínio C-terminal (RECZEK; BERRYMAN; BRETSCHER, 1997; BRETSCHER; EDWARDS; FEHON, 2002; MORALES et al., 2004). Em outras palavras, a ezrin é capaz de receber comandos da membrana plasmática e transduzi-los para o citoesqueleto, controlando a movimentação da célula (Figura 1). Desta forma, a ezrin atua em diversos processos celulares tais como migração, proliferação, invasão, metástase (TRAN QUANG et al., 2000; NESTL et al., 2001; ARPIN et al., 2011).

Uma dessas vias de sinalização que vem sendo muito investigada é a atuação da ezrin desbloqueando o inibidor da GTPase Rho que promove a

transcrição de genes importantes na regulação dos processos de movimentação, divisão e migração celular (TAKAHASHI et al., 1997; BRETSCHER; EDWARDS; FEHON, 2002).

Em carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, incluindo aqueles de boca (MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013), a expressão da ezrin vem sendo associada a um pior prognóstico, maior índice de metástases e menor sobrevida livre de doença.

Nossos resultados demonstraram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre a associação da expressão da ezrin membranosa e da podoplanina periférica (membranosa ou citoplasmática), conforme descrito na Tabela 7. Na maioria dos CEC de lábio, houve uma predominância da forte expressão da podoplanina pelas células periféricas das ilhotas tumorais, em comparação com a pouca expressão da ezrin membranosa tanto na periferia como no centro das ilhotas tumorais (Tabela 7 e Gráfico 3).

Quando analisamos a ezrin citoplasmática e sua associação com a expressão da podoplanina, encontramos uma diferença, sem significância estatística na periferia das ilhotas e cordões tumorais, porém esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na região central dos tumores (Tabela 8).

A interpretação desses resultados permite verificar que nas células presentes em áreas tumorais mais invasivas, ou seja, na periferia dos cordões e ilhotas, a expressão tanto da podoplanina (membranosa e citoplasmática) como da ezrin citoplasmática foi sempre marcante. Por outro lado, em áreas tumorais centrais, mesmo com a presença da ezrin citoplasmática houve pouca expressão de podoplanina (membranosa ou citoplasmática). Portanto, este padrão de expressão proteico confirma a localização predominante da ezrin no citoplasma das células neoplásicas, independente da localização no *front* de invasão, e a presença da podoplanina principalmente nas células periféricas das ilhotas tumorais.

A mudança de localização da ezrin encontrada da membrana de células epiteliais para o citoplasma nos carcinomas espinocelulares de lábio concorda com outros estudos realizados em neoplasias malignas (MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012; SAITO et al., 2013). Estaria a perda da ezrin membranosa nas células periféricas das ilhotas tumorais associadas com um fenótipo mais agressivo do CEC

de lábio? A resposta a esta pergunta requer uma análise mais ampla desta proteína na evolução tumoral e/ou no prognóstico dos pacientes com CEC de lábio.

Em nosso estudo, o teste de correlação de Spearman mostrou uma correlação positiva, mas sem significância estatística, entre a expressão membranosa da podoplanina e a ezrin (membranosa e citoplasmática) localizadas na região periférica das ilhotas tumorais, conforme ilustrado na Tabela 9. Esses resultados sugerem que ambas as proteínas se comportam de forma semelhante nas células dos CECs de lábio, entretanto outros estudos são necessários para confirmarem estes achados e também averiguar o papel exato deste complexo no comportamento da célula neoplásica ou no fenótipo mais agressivo das neoplasias malignas.

A presente investigação foi pioneira na análise da imunolocalização da podoplanina e da ezrin em carcinomas espinocelulares localizados exclusivamente na região do lábio inferior.

As observações imuno-histoquímicas da forte expressão de podoplanina e ezrin nas células periféricas das ilhotas tumorais, encontradas neste estudo, sugerem uma participação conjunta dessas proteínas no processo de invasão dos CECs de lábio. Entretanto, outros estudos com métodos de biologia molecular se fazem necessários para esclarecer o papel exato e o significado clínico destas proteínas nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise imuno-histoquímica de 48 carcinomas espinocelulares de lábio inferior demonstrou:

- uma forte expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina nas células periféricas e ausência desta proteína nas células centrais das ilhotas tumorais;
- uma forte expressão, predominantemente citoplasmática, da ezrin pelas células do *front* de invasão tumoral, periféricas e centrais;
- uma diferença, estatisticamente significativa, na expressão membranosa e citoplasmática da podoplanina nas áreas central e periférica dos tumores ($p < 0,001$);
- uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão membranosa e citoplasmática da ezrin nas células do *front* de invasão tumoral ($p < 0,001$);
- uma correlação positiva, porém sem significância estatística, entre a expressão da podoplanina membranosa e a ezrin membranosa ou citoplasmática nas células neoplásicas periféricas.

Estes resultados comprovam que a podoplanina e ezrin são fortemente expressas pelas células neoplásicas do front de invasão tumoral e sugerem que ambas as proteínas podem estar participando conjuntamente do processo de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio.

Referências

REFERÊNCIAS

ABREU, M. A. M. M. et al. Carcinoma espinocelular do lábio: avaliação de fatores prognósticos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 765-770, 2004.

AL-RAWI, M. A.; MANSEL, R. E.; JIANG, W. G. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. **Eur J Surg Oncol**, v. 31, n. 2, p. 117-21, Mar 2005.

ARPIN, M.; ALGRAIN, M.; LOUVARD, D. Membrane-actin microfilament connections: an increasing diversity of players related to band 4.1. **Curr Opin Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 136-41, Feb 1994.

ARPIN, M. et al. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration. **Cell Adh Migr**, v. 5, n. 2, p. 199-206, Mar-Apr 2011.

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.

BARRETT, A. W. et al. The differentiation profile of the epithelium of the human lip. **Arch Oral Biol**, v. 50, n. 4, p. 431-8, Apr 2005.

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

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.

BRAMBILLA, D.; FAIS, S. The Janus-faced role of ezrin in "linking" cells to either normal or metastatic phenotype. **Int J Cancer**, v. 125, n. 10, p. 2239-45, Nov 15 2009.

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.

BREITENEDER-GELEFF, S. et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. **Am J Pathol**, v. 154, n. 2, p. 385-94, Feb 1999.

BRETSCHER, A.; EDWARDS, K.; FEHON, R. G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 8, p. 586-99, Aug 2002.

CARVALHO, F. M. et al. Prognostic value of podoplanin expression in intratumoral stroma and neoplastic cells of uterine cervical carcinomas. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 65, n. 12, p. 1279-83, 2010.

CHAO, Y. K. et al. Prognostic significance of high podoplanin expression after chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma patients. **J Surg Oncol**, v. 105, n. 2, p. 183-8, Feb 2012.

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.

CUI, Y. et al. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. **Int J Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1614-21, Apr 1 2009.

DE VICENTE, J. C. et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: Tumorigenic role. **Oral Oncol**, Mar 5 2013.

DUMOFF, K. L. et al. Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. **Mod Pathol**, v. 19, n. 5, p. 708-16, May 2006.

DURCHDEWALD, M. et al. Podoplanin is a novel fos target gene in skin carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 68, n. 17, p. 6877-83, Sep 1 2008.

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

FIEVET, B.; LOUVARD, D.; ARPIN, M. ERM proteins in epithelial cell organization and functions. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 5, p. 653-60, May 2007.

FOSCHINI, M. P. et al. Podoplanin and E-cadherin Expression in Preoperative Incisional Biopsies of Oral Squamous Cell Carcinoma Is Related to Lymph Node Metastases. **Int J Surg Pathol**, Jan 24 2013.

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

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

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.

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

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

ITO, M. et al. Prognostic impact of cancer-associated stromal cells in patients with stage I lung adenocarcinoma. **Chest**, v. 142, n. 1, p. 151-8, Jul 2012.

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.

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

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.

KYZAS, P. A.; STEFANOUE, D.; AGNANTIS, N. J. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 squamous cell carcinoma (SCC) of the lower lip. **Oral Oncol**, v. 40, n. 9, p. 941-7, Oct 2004.

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

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

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

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 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.

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

MORALES, F. C. et al. Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 51, p. 17705-10, Dec 21 2004.

NEISCH, A. L.; FEHON, R. G. Ezrin, Radixin and Moesin: key regulators of membrane-cortex interactions and signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 23, n. 4, p. 377-82, Aug 2011.

NESTL, A. et al. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. **Cancer Res**, v. 61, n. 4, p. 1569-77, Feb 15 2001.

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.

OCHSENIUS, G. et al. [A retrospective study of 232 cases of lip cancer and pre cancer in Chilean patients. Clinical-histological correlation]. **Rev Med Chil**, v. 131, n. 1, p. 60-6, Jan 2003.

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

POLESELLO, C.; PAYRE, F. Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 294-302, Jun 2004.

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.

RECZEK, D.; BERRYMAN, M.; BRETSCHER, A. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. **J Cell Biol**, v. 139, n. 1, p. 169-79, Oct 6 1997.

SALGARELLI, A. C. et al. Surgical treatment of lip cancer: our experience with 106 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 67, n. 4, p. 840-5, Apr 2009.

SAITO, S. et al. Mechanisms underlying cancer progression caused by ezrin overexpression in tongue squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54881, 2013.

SARRIO, D. et al. Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. **Breast Cancer Res Treat**, v. 98, n. 1, p. 71-9, Jul 2006.

SATO, N. et al. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. **J Cell Sci**, v. 103 (Pt 1), p. 131-43, Sep 1992.

SCHACHT, V. et al. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. **Am J Pathol**, v. 166, n. 3, p. 913-21, Mar 2005.

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

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

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.

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.

SOINI, Y. et al. Endothelial nitric oxide synthase is strongly expressed in malignant mesothelioma but does not associate with vascular density or the expression of VEGF, FLK1 or FLT1. **Histopathology**, v. 39, n. 2, p. 179-86, Aug 2001.

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

TAKAHASHI, K. et al. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. **J Biol Chem**, v. 272, n. 37, p. 23371-5, Sep 12 1997.

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

TRAN QUANG, C. et al. Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. **EMBO J**, v. 19, n. 17, p. 4565-76, Sep 1 2000.

TSUKITA, S.; YONEMURA, S. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. **Curr Opin Cell Biol**, v. 9, n. 1, p. 70-5, Feb 1997.

TSUKITA, S. et al. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. **J Cell Biol**, v. 126, n. 2, p. 391-401, Jul 1994.

TSUNEKI, M. et al. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, Mar 26 2013.

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

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

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.

WICK, W. et al. Ezrin-dependent promotion of glioma cell clonogenicity, motility, and invasion mediated by BCL-2 and transforming growth factor-beta2. **J Neurosci**, v. 21, n. 10, p. 3360-8, May 15 2001.

WINCKLER, B. et al. Analysis of a cortical cytoskeletal structure: a role for ezrin-radixin-moesin (ERM proteins) in the marginal band of chicken erythrocytes. **J Cell Sci**, v. 107 (Pt 9), p. 2523-34, Sep 1994.

WU, G. et al. Ezrin Gene Expression and Protein Production in the CD44(+) Subpopulation of SCC-9 Cells in a Malignant Oral Cancer Cell Line In Vitro. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 71, n. 3, p. e151-7, Mar 2013.

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

YONEMURA, S. et al. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. **J Cell Biol**, v. 140, n. 4, p. 885-95, Feb 23 1998.

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

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

Anexo

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Alexandre Simões Garcia

Versão: 1

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru-USP

CAAE: 01594912.2.0000.5417

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 17194

Data da Relatoria: 02/05/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto encontra-se bem apresentado referindo-se à padoplanina que é uma glicoproteína transmembrana que se expressa no epitélio e vem sendo reconhecida como um potencial biomarcador de carcinoma espinocelular bucais agressivos, associados à pacientes com pior tipo de prognóstico.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar e expressão da padoplanina no carcinoma espinocelular de lábio, correlacionando-o com a evolução tumoral e o prognóstico para esses pacientes. A população deste estudo será constituída por pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos a tratamento no Hospital A.C.Camargo, São Paulo, no período de 1970 a 1999, sendo que as informações clínicas e microscópicas referentes aos pacientes, assim como a peça cirúrgica (corte microscópicos de 3 micrometros, obtidos de carcinoma espinocelular, fixados em formalina) serão obtidas a partir do banco de dados pertencentes ao Hospital.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trabalho bastante interessante sob o ponto de vista médico-científico pois poderão surgir associação entre esse tipo de carcinoma e a presença da padoplanina, o que deverá contribuir no futuro para o tratamento mais eficaz desse tipo de tumor.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram cumpridos de acordo com as normas estabelecidas

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem comentários

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não